

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

EFEITO DO TRATAMENTO COM PROGESTERONA E DO DIÂMETRO
FOLICULAR NAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E MOLECULARES
UTERINAS EM VACAS NELORE EM ANESTRO PÓS-PARTO

OCILON GOMES DE SÁ FILHO

BOTUCATU-SP

Janeiro/2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

EFEITO DO TRATAMENTO COM PROGESTERONA E DO DIÂMETRO
FOLICULAR NAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E MOLECULARES
UTERINAS EM VACAS NELORE EM ANESTRO PÓS-PARTO

OCILON GOMES DE SÁ FILHO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia, Área de Concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos

BOTUCATU-SP

Janeiro/2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Sá Filho, Ocilon Gomes de, 1981-
S111e Efeito do tratamento com progesterona e do diâmetro folicular nas características histológicas e moleculares uterinas em vacas Nelore em anestro pós-parto / Ocilon Gomes de Sá Filho. - Botucatu : [s.n.], 2010.
v, 183 f. : fots. color., tabs., gráfs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010
Orientador: José Luiz Morais Vasconcelos
Inclui bibliografia.

1. Nelore. 2. Anestro. 3. Endométrio. 4. Luteólise prematura. I. Vasconcelos, José Luiz Morais. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CONSTITUIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Nome: SÁ FILHO, Ocilon Gomes de

Título: Efeito do tratamento com progesterona e do diâmetro folicular nas características histológicas e moleculares uterinas em vacas Nelore em anestro pós-parto.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia, Área de Concentração: Nutrição e Produção Animal.

Data: 20/01/2010

Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos (FMVZ/UNESP/Botucatu)

Prof. Dr. Ciro Moraes Barros (IBB/UNESP/Botucatu)

Prof. Dr. José Buratini Junior (IBB/UNESP/ Botucatu)

Prof. Dr. Mario Binelli (FMVZ/USP/Pirassununga)

Prof^a. Dr^a. Paula de Carvalho Papa (FMVZ/USP/São Paulo)

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Ocilon e Creuza, por incentivarem e investirem na minha formação, sempre apoiando a realização dos meus sonhos.

Ao meu filho João Davi, por todos os momentos felizes que proporciona e por ser um motivo a mais na busca pela evolução profissional e pessoal.

À minha querida Marina, por todo o amor e carinho que transmite e ensina. Além disso, é para mim um exemplo de integridade, honestidade e profissionalismo.

Saibam que a distância e ausência também doeram em mim, porém foram por um motivo muito nobre, que certamente me ajudará a recompensar toda a vossa paciência.

Agradecimentos

Ao grande amigo Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos, por todos os ensinamentos e exemplos que me ajudam crescer não apenas tecnicamente, mas principalmente como pessoa.

Ao Fernando Aono e à Fernanda Abreu, por auxiliarem com muita competência nas coletas de material a campo.

Ao Diego Guerra pela realização dos ensaios de RT-PCR em tempo real.

Ao colega Glen Allen Bridges, por auxiliar nas dúvidas que surgiram no decorrer dos experimentos.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Eunice Oba e Renée Laufer Amorim e ao Prof. Dr. José Buratini Jr. por disponibilizarem seus laboratórios quando requisitados.

Ao Prof. Dr. Francisco Stefano Weschler por todos os ensinamentos e orientações em análise estatística.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu pela oportunidade de realização do curso.

A todos os professores da graduação e pós-graduação que contribuíram para minha formação.

A todos os amigos de pós-graduação com quem convivi, por tudo o que aprendemos juntos.

A toda equipe da Pecuária Novo Horizonte (Coxim-MS), em especial ao Moacir, por sempre compreenderem a importância da relação entre a pesquisa e a realidade do campo, e enxergarem os frutos que podem render dessa interação.

Aos funcionários do Departamento de Produção e Exploração Animal, Barbosa e Solange, pela amizade e atenção de sempre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

E a Deus por estar sempre presente.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE FIGURAS	16
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	26
1. Introdução	26
2. Revisão da Literatura	28
2.1. Luteinização	28
2.2. Luteólise	29
2.2.1. Síntese intracelular de prostaglandinas	30
2.2.2. Atuação da ocitocina na luteólise	31
2.2.3. Estrutura molecular dos receptores de ocitocina, estradiol e progesterona.....	32
2.2.4. Regulação dos receptores de ocitocina por estradiol e progesterona	34
2.3. Luteólise prematura.....	38
2.3.1 Características dos corpos lúteos que regridem prematuramente.....	39
2.3.2. Efeito do útero na ocorrência de luteólise prematura	40
2.3.3. Hipóteses para explicar a luteólise prematura	40
2.3.3.1. Hipótese da ausência de pré-exposição à progesterona	41
2.3.3.2. Hipótese da concentração insuficiente de estradiol pré-ovulatório.....	42
2.3.3.3. Associação entre progesterona e estradiol	45

2.3.4. Luteólise prematura em vacas ciclando	46
2.4. Efeitos dos esteróides ovarianos na morfologia uterina	47
CAPÍTULO 2 – Experimento 1: Características histológicas e moleculares	
uterinas de vacas Nelore em anestro pós-parto	49
Resumo	49
Abstract	51
1. Justificativa	53
2. Materiais e métodos	53
2.1. Animais e manejo reprodutivo	53
2.2. Remoção temporária de bezerras	54
2.3. Ultrassonografia das estruturas ovarianas	55
2.4. Colheitas e análises de sangue	55
2.4.1. Dosagem de progesterona	55
2.4.2. Dosagem de estradiol	56
2.5. Colheita, manipulação e análises dos tecidos uterinos	57
2.5.1. Laparotomia e histerectomia unilateral	57
2.5.2. Manipulação dos tecidos uterinos	59
2.5.3. Análises dos tecidos uterinos	60
2.5.3.1. Avaliação histomorfométrica	60
2.5.3.2. Receptores de estradiol e progesterona	63
2.5.3.3. Expressão gênica de ER, PR, OTR e das enzimas COX-1 e COX-2	68
2.6. Análise estatística	72

3. Resultados e discussão	73
3.1. Esteróides e estruturas ovarianas	73
3.2. Aspectos moleculares relacionados à luteólise.....	75
3.3. Histomorfometria uterina	77
4. Conclusões	79
CAPÍTULO 3 – Experimento 2: Efeito do tratamento com progesterona nas características histológicas e moleculares uterinas de vacas Nelore em anestro pós-parto	80
Resumo	80
Abstract	82
1. Justificativa	84
2. Materiais e métodos	84
2.1. Animais e manejo reprodutivo	84
2.2. Aspirações foliculares	85
2.3. Remoção temporária de bezerras	86
2.4. Ultrassonografia das estruturas ovarianas	86
2.5. Colheitas e análises de sangue	87
2.5.1. Dosagem de progesterona	87
2.5.2. Dosagem de estradiol	87
2.6. Colheitas e análises de tecidos uterinos	88
2.7. Resumo do delineamento experimental	88
2.8. Análise estatística	89

3. Resultados e discussão	90
3.1. Esteróides e estruturas ovarianas	90
3.2. Aspectos moleculares relacionados à luteólise.....	92
3.3. Histomorfometria uterina	108
4. Conclusões	116
CAPÍTULO 4 – Experimento 3: Efeito do diâmetro folicular nas características histológicas e moleculares uterinas de vacas Nelore em anestro pós-parto tratadas com progesterona	117
Resumo	117
Abstract	119
1. Justificativa	121
2. Materiais e métodos	121
2.1. Animais e manejo reprodutivo	121
2.2. Aspirações foliculares	122
2.3. Remoção temporária de bezerras	122
2.4. Ultrassonografia das estruturas ovarianas	122
2.5. Colheitas e análises de sangue	123
2.5.1. Dosagem de progesterona	123
2.5.2. Dosagem de estradiol	123
2.6. Colheitas e análises de tecidos uterinos	123
2.7. Resumo do delineamento experimental	124
2.8. Análise estatística	124

3. Resultados e discussão	126
3.1. Esteróides e estruturas ovarianas	126
3.2. Aspectos moleculares relacionados à luteólise.....	128
3.3. Histomorfometria uterina	139
4. Conclusões	143
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES..	144
1. Discussão geral	144
1.1. Aspectos moleculares relacionados à luteólise	144
1.2. Histomorfometria uterina	150
2. Conclusões e implicações	154
3. Referências bibliográficas	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	do inglês “antisense”
A	adenina
AA	ácido aracdônico
Asp	aspiração folicular guiada por ultrassom
BSA	albumina sérica bovina
°C	graus Celsius
C	citossina
CIDR [®]	dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de progesterona
CL	corpo lúteo
CLG	células luteais grandes
CLP	células luteais pequenas
cm	centímetro
CoA	coenzima A
COX	ciclooxigenase
COX-1	ciclooxigenase 1
COX-2	ciclooxigenase 2
CYC-A	ciclofilina A
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
E2	estradiol

EGF	fator de crescimento epidermal
End	colheita de tecido endometrial
EPM	erro padrão da média
ER	receptor de estradiol
<i>g</i>	gravidade
G	guanina
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLM	modelo linear geral
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HE	hematoxilina-eosina
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina 1
LH	hormônio luteinizante
mg	miligrama
MHz	megahertz
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mm ²	milímetro quadrado
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
n	número de repetições ou elementos
ng	nanograma

n ^o	número
OT	ocitocina
OTR	receptor de ocitocina
P	probabilidade de se rejeitar a hipótese de nulidade (nível de significância)
P4	progesterona
pb	par(es) de bases
pg	picograma
PGF2 α	prostaglandina F2 α
PGFM	13,14-dihidro-15-ceto-prostaglandina F2 α
PGH2	prostaglandina H2
pH	potencial hidrogeniônico
PR	receptor de progesterona
PROC	procedimento
RB	remoção de bezerros
RNA	ácido ribonucléico
RNase	enzima que degrada o ácido ribonucléico
RT-PCR	reação de transcrição reversa seguida por reação em cadeia pela polimerase
S	do inglês “sense”
Sg	colheita de amostra de sangue
T	timina
TGF α	fator de crescimento transformador α
TW	do inglês “temporary weaning”; desmame temporário

UA	unidade arbitrária
US	ultrassonografia ovariana
v/v	volume sobre volume
μL	microlitro
μm	micrômetro
%	por cento
=	igual
<	menor
>	maior
\leq	menor ou igual
\geq	maior ou igual

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídios iniciadores para CYC-A, ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2 (S: oligonucleotídeo iniciador “sense”; A: oligonucleotídeo iniciador “antisense; pb: pares de base)	71
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Diagrama esquemático dos eventos endócrinos e moleculares endometriais relacionados à luteólise, baseados no conhecimento atual (ver texto). AA: ácido aracdônico; CL: corpo lúteo; ER: receptor endometrial de estradiol; E2: estradiol; OTR: receptor endometrial de ocitocina; PR: receptor endometrial de progesterona; PGF2 α , prostaglandina F2 α : PGF sintase: prostaglandina F sintase; PGH2: prostaglandina H2; P4: progesterona; $\cdots \blacktriangleright$: “leva a”, “induz”; \uparrow : efeito estimulatório; \top : efeito inibitório. Painel A: início do ciclo estral. Painel B: metade do ciclo estral. Painel C: terço final do ciclo estral. Painel D: Momento da luteólise (1: secreção inicial de OT em pulsos de baixa amplitude e alta frequência; 2) secreção endometrial de PGF2 α em resposta ao evento 1; 3) secreção de OT luteal em resposta ao evento 2; 4) secreção endometrial de PGF2 α em resposta ao evento 3, estabelecendo-se um ciclo de retroalimentações positivas entre OT luteal e PGF2 α , e subsequente luteólise 37

Figura 2: Diagrama esquemático dos possíveis mecanismos endócrinos e moleculares endometriais que causam e previnem a luteólise prematura, baseados no conhecimento atual (ver texto). AA: ácido aracdônico; CL: corpo lúteo; ER: receptor endometrial de estradiol; E2: estradiol; OTR: receptor endometrial de ocitocina; PR: receptor endometrial de progesterona; PGF2 α , prostaglandina F2 α : PGF sintase:

prostaglandina F sintase; PGH2: prostaglandina H2; P4: progesterona; ...►: “leva a”, “induz”; ↑: efeito estimulatório; ⊥: efeito inibitório. Painel A: modelo hipotético em que os eventos que normalmente ocorrem no final do ciclo estral são antecipados; Painel B: modelo hipotético proposto por Zollers et al. (1993), no qual a pré-exposição à P4 é o fator mais importante na prevenção da luteólise prematura; Painel C: Modelo hipotético proposto por Mann & Lamming (2000), no qual a concentração circulante de E2 no período pré-ovulatório é o fator mais importante na prevenção da luteólise prematura 44

CAPÍTULO 2

Figura 3: A) Lâmina de tecido uterino corada pela técnica de hematoxilina-eosina. EL: epitélio luminal; ES: estroma subepitelial superficial; GS: ducto glandular superficial; EP: estroma subepitelial profundo; GP: ducto glandular profundo. B) Lâmina de tecido uterino corada pela técnica de imunohistoquímica; P: núcleo imunorreativo (positivo); N: núcleo não-imunorreativo (negativo). C) Controle negativo do ensaio para receptor de estradiol; D) Controle negativo do ensaio para receptor de progesterona..... 68

CAPÍTULO 3

Figura 4: Diagrama esquemático do delineamento experimental. US: Ultrassonografia da estruturas ovarianas; Sg: Colheita de sangue; End: Biópsia uterina para colheita de tecido endometrial; Asp: Aspiração guiada por ultrassom dos

foliculos ovarianos ≥ 6 mm; CIDR[®]: Dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de progesterona; RB: Remoção de bezerros (48 horas) 88

Figura 5: Expressão gênica de receptores endometriais de estradiol α (ER) relativa ao gene constitutivo ciclofilina A (CYC-A; média dos quadrados mínimos \pm EPM), quantificada por RT-PCR em tempo real, em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 93

Figura 6: Expressão gênica de receptores endometriais de ocitocina (OTR) relativa ao gene constitutivo ciclofilina A (CYC-A; média dos quadrados mínimos \pm EPM), quantificada por RT-PCR em tempo real, em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 94

Figura 7: Expressão gênica endometrial da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) relativa ao gene constitutivo ciclofilina A (CYC-A; média dos quadrados mínimos \pm EPM), quantificada por RT-PCR em tempo real, em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença

significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 95

Figura 8: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α em células endometriais epiteliais luminais (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 96

Figura 9: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α no estroma subepitelial uterino superficial (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008

97

Figura 10: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α no estroma subepitelial uterino profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008..... 98

Figura 11: Porcentagem de núcleos com imunomarcação positiva para receptor de progesterona no estroma subepitelial superficial (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 101

Figura 12: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de progesterona em células endometriais epiteliais glandulares profundas (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008..... 102

Figura 13: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de progesterona no estroma subepitelial superficial (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 103

Figura 14: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de progesterona no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo

intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 104

Figura 15: Altura das células endometriais epiteliais glandulares profundas (média dos quadrados mínimos \pm EPM) em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 110

Figura 16: Área endometrial em relação à área uterina (média dos quadrados mínimos \pm EPM) em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 111

Figura 17: Perímetro dos ductos glandulares endometriais profundos (média dos quadrados mínimos \pm EPM) em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008..... 112

CAPÍTULO 4

Figura 18: Diagrama esquemático do delineamento experimental. US: Ultrassonografia da estruturas ovarianas; Sg: Colheita de sangue; End: Biópsia uterina para colheita de tecido endometrial; Asp: Aspiração guiada por ultrassom dos folículos ovarianos ≥ 6 mm; CIDR[®]: Dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de progesterona; RB: Remoção de bezerros (48 horas) 124

Figura 19: Expressão gênica de receptores endometriais de ocitocina (OTR) relativa ao gene constitutivo ciclofilina A (CYC-A; média dos quadrados mínimos \pm EPM), quantificada por RT-PCR em tempo real, em vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 .. 128

Figura 20: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α em células epiteliais luminais (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 132

Figura 21: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008..... 133

Figura 22: Porcentagem de núcleos com imunomarcção positiva para receptor de estradiol α no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 134

Figura 23: Porcentagem de núcleos com imunomarcção positiva para receptor de progesterona no estroma subepitelial superficial (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 135

Figura 24: Porcentagem de núcleos com imunomarcação positiva para receptor de progesterona no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 136

Figura 25: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de progesterona no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008 137

Figura 26: Perímetro dos ductos glandulares endometriais profundos (média dos quadrados mínimos \pm EPM) em vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008..... 140

CAPÍTULO 5

Figura 27: Diagrama esquemático dos prováveis mecanismos endócrinos e moleculares endometriais que causam e previnem a luteólise prematura em bovinos, baseado nos resultados da presente tese (ver texto). AA: ácido aracdônico; CL: corpo lúteo; ER: receptor endometrial de estradiol; E2: estradiol; OTR: receptor endometrial de ocitocina; PR: receptor endometrial de progesterona; $PGF_{2\alpha}$, prostaglandina $F_{2\alpha}$; PGF sintase: prostaglandina F sintase; PGH_2 : prostaglandina H_2 ; P4: progesterona; $\cdots \blacktriangleright$: “leva a”, “induz”; \uparrow : efeito estimulatório; \top : efeito inibitório. Painel A: durante o anestro pós-parto; Painel B: após a primeira ovulação pós-parto sem pré-exposição à P4; Painel C: no início de um ciclo estral precedido por exposição à P4, porém com ovulação de folículo de pequeno diâmetro; Painel D: no início de um ciclo estral precedido por exposição à P4 e com ovulação de folículo de diâmetro adequado 157

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

A bovinocultura de corte exige, para ser uma atividade sustentável em ambiente econômico competitivo, a obtenção de um bezerro/vaca/ano. O período médio de gestação dos bovinos *Bos indicus* é de 290 dias e, após o parto, são necessários aproximadamente 30 dias para a completa involução uterina e restabelecimento dos estoques de LH na hipófise. Assim, para se obter um intervalo entre partos de 12 meses, é necessário que a vaca fique gestante num período de no máximo 45 dias, que corresponde a três episódios de comportamento de estro. O prolongado anestro pós-parto e falhas na detecção do estro são as principais limitações para que tal objetivo seja atingido (YAVAS & WALTON, 2000).

Algumas estratégias simples, como remoção temporária de bezerros, aplicação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou associação de ambos, são eficientes em reduzir o intervalo entre o parto e a primeira ovulação (SÁ FILHO et al., 2009a; VASCONCELOS et al., 2009a). Entretanto, o primeiro ciclo estral pós-parto é caracterizado por apresentar alta incidência de regressão prematura do corpo lúteo (CL; COPELIN et al., 1987; SÁ FILHO et al., 2009a), devido à antecipação na secreção de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), e baixa taxa de concepção (VASCONCELOS et al., 2009a). A única estratégia conhecida atualmente que efetivamente previne a luteólise prematura é o tratamento com progesterona (P4) antes da ovulação (SÁ FILHO et al., 2009a). Entretanto, vacas cíclicas induzidas a ovular folículos pequenos também apresentam alta incidência de

luteólise prematura (VASCONCELOS et al., 2001; PETERS & PURSLEY, 2003; TAPONEN et al., 2003), indicando que concentrações elevadas de estradiol (E2) no período pré-ovulatório são necessárias à manutenção do corpo lúteo subsequente (MANN & LAMMING, 2001).

O útero, por ser o principal órgão produtor e secretor de $\text{PGF2}\alpha$ durante o processo luteolítico, tem fundamental atuação nesse fenômeno, porém os mecanismos que induzem a secreção prematura de $\text{PGF2}\alpha$ ainda não estão totalmente esclarecidos. A compreensão de aspectos endócrinos e moleculares relacionados ao desenvolvimento endometrial e que desencadeiam e previnem a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo útero é essencial ao desenvolvimento de tratamentos alternativos à P4 ou mesmo de tratamentos que, associados à P4, potencializem seus efeitos. No presente estudo, três experimentos foram realizados com o objetivo geral de avaliar características histológicas e moleculares uterinas potencialmente relacionadas à capacidade secretória endometrial, à causa e à prevenção da luteólise prematura em vacas Nelore em anestro antes e após a indução da ovulação. No primeiro experimento, descrito no Capítulo 2, o objetivo foi avaliar a expressão gênica endometrial de receptores de E2 subtipo α (ER), P4 (PR) e ocitocina (OT; OTR) e das enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2), a expressão protéica endometrial de ER e PR, e a histomorfometria uterina em vacas Nelore em anestro ao longo do desenvolvimento da onda folicular. No segundo experimento, descrito no Capítulo 3, o objetivo foi avaliar os efeitos do tratamento com P4 por 6 dias na expressão gênica endometrial de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2, na expressão protéica endometrial de ER e PR, e na histomorfometria uterina em vacas Nelore em anestro submetidas à indução de

ovulação. No terceiro experimento, descrito no Capítulo 4, o objetivo foi avaliar os efeitos do diâmetro folicular na expressão gênica endometrial de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2, na expressão protéica endometrial de ER e PR, e na histomorfometria uterina em vacas Nelore em anestro induzidas a ovular após tratamento com P4.

2. Revisão de literatura

2.1. Luteinização

Em animais ciclando, após a regressão do CL e sob alta concentração circulante de E2, ocorre secreção de pico de LH pela hipófise, que determina a ovulação do folículo dominante e formação do CL. Durante a ovulação, o oócito e o fluido folicular extravasam, criando uma cavidade para o desenvolvimento do CL a partir do folículo. Após a ovulação, ocorre multiplicação, reorganização e diferenciação das células da teca interna e da granulosa, além de intensa proliferação vascular, formando uma densa rede de vasos sangüíneos (DAMBER et al., 1987). O CL torna-se uma estrutura sólida e esférica, altamente vascularizada, cujo peso aumenta mais de seis vezes nos primeiros 10 dias após a ovulação (ZHENG et al., 1994). O conjunto de transformações que ocorre nas células da teca e da granulosa após a ovulação é denominado luteinização (MURPHY, 2000).

Hansel & Blair (1996) descreveram a presença de duas populações celulares histologicamente distintas no CL de vacas: uma população de células menores, as quais são denominadas células luteínicas pequenas (CLP) e uma população de células maiores, denominadas células luteínicas grandes (CLG). Tanto *in vivo* (HANSEL & BLAIR, 1996)

quanto *in vitro* (MEIDAN et al., 1990), é observado que as CLP originam-se das células da teca. Nos estágios iniciais do ciclo estral, as CLG se desenvolvem a partir de células da granulosa, porém elas também se desenvolvem pela diferenciação de CLP em estágios posteriores (LEI et al., 1991).

2.2. Luteólise

Em vacas cíclicas, o CL regride funcional e morfológicamente aproximadamente 17 a 20 dias após a ovulação. Este processo, denominado luteólise, determina a duração do ciclo estral e é caracterizado pelo cessar da produção de P4 e fragmentação dos componentes celulares, incluindo a redução do suporte vascular, proliferação do tecido conjuntivo, desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (MILVAE et al., 1996). A $PGF2\alpha$ é a substância responsável pela luteólise, sendo secretada pelo endométrio bovino num padrão pulsátil (SHEMESH & HANSEL, 1975) e atinge o CL por um sistema de transporte local veno-arterial de contracorrente (HIXON & HANSEL, 1974). O miométrio tem baixa capacidade de secretar $PGF2\alpha$ em resposta à OT e, portanto, não é considerado relevante na regulação luteolítica (ROBERTS et al., 1976). Aproximadamente 98% da $PGF2\alpha$ secretada é transformada em 13,14-dihidro-15-ceto-prostaglandina F 2α (PGFM) na primeira passagem pelos pulmões (PIPER et al., 1970). Dessa forma, a produção de $PGF2\alpha$ é geralmente mensurada, *in vivo*, através da PGFM. A concentração basal de PGFM em vacas durante a fase luteínica varia entre 10 e 100 pg/mL. No momento da luteólise, ocorrem picos de PGFM com durações variando entre 2 a 5 horas, espaçados por intervalos de 2 a 30 horas, atingindo concentrações plasmáticas de

150 a 500 pg/mL (KOTWICA et al., 1998). A OT, o E2 e a P4 são os hormônios mais importantes envolvidos na regulação deste processo (SILVIA et al., 1991).

2.2.1. Síntese intracelular de prostaglandinas

As prostaglandinas são compostos eicosanóides derivados de ácidos graxos com 20 carbonos, que desempenham funções fisiológicas e patológicas em diversos tecidos do organismo (BERGSTRON et al., 1964). De acordo com Burns et al. (1997), quando a OT se liga ao seu receptor na membrana da célula endometrial, ocorre o acoplamento deste à proteína G, ativando a fosfolipase C que cliva a molécula de fosfatidilinositol bifosfato, originando inositol trifosfato e diacilglicerol. O inositol trifosfato, ao se ligar a receptores presentes no retículo endoplasmático, causa a entrada de íons de cálcio no citosol, culminando com a ativação da proteína quinase C que fosforila a fosfolipase A2. A fosfolipase A2 e a aciltransferase acil:CoA:lisofosfolípido clivam o ácido araquidônico (AA) derivado de fosfolípídeos de membrana (BURNS et al., 2000; NORMAN & POYSER, 2000). Em seguida, o AA livre é convertido a prostaglandina H2 (PGH2) pela enzima COX. São conhecidas duas isoformas de COX que catalisam a conversão de AA a PGH2: a COX-1, que é expressa constitutivamente (COHN et al., 1997), e a COX-2, que se expressa em vários tecidos (SIMON, 1999) e é a principal responsável pela produção de PGH2 no endométrio. Finalmente, a PGH2 é convertida a $PGF2\alpha$ pela ação da enzima PGF sintase. Assim que sintetizada, a $PGF2\alpha$ é imediatamente secretada, uma vez que as prostaglandinas não são armazenadas nas células (OKUDA et al., 2002). Em vacas cíclicas, as células epiteliais endometriais luminais que se localizam na região

intercaruncular do epitélio luminal são as de maior capacidade de produção de $\text{PGF2}\alpha$, secretando-a através de sua membrana baso-lateral (SHELDRIK et al., 1993; KIM & FORTIER, 1995; ASSELIN et al., 1996; ASSELIN et al., 1998; SKARZYNSKI et al., 2000).

2.2.2. Atuação da ocitocina na luteólise

Nos ruminantes, a OT é secretada principalmente pela hipófise posterior e pelo CL. Sua atuação na luteólise ainda é controversa, entretanto alguns estudos indicaram que a OT está envolvida na regulação da luteólise em bovinos: 1) a administração de OT exógena reduziu a duração do ciclo estral (ARMSTRONG & HANSEL, 1959); 2) pulsos de OT ocorreram concomitantemente a pulsos de $\text{PGF2}\alpha$ durante a luteólise (VIGHIO & LIPTRAP, 1986); 3) a OT estimulou agudamente a produção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio de ruminantes a partir do período final da fase luteal (ROBERTS et al., 1976). A hipótese mais aceita atualmente sobre a ação da OT na luteólise foi proposta por McCracken et al. (1999), os quais consideram a OT o elemento responsável pela secreção pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$ precedente à luteólise. Segundo esses autores, próximo ao final da fase luteal, ocorre inibição dos receptores de P4 na hipófise e endométrio, permitindo a ação do E2, que estimula a hipófise a secretar pulsos de baixa amplitude e alta frequência de OT. A OT secretada pela hipófise se liga aos OTR e estimula a secreção de pequenas quantidades de $\text{PGF2}\alpha$, as quais ainda não são suficientes para causar luteólise, mas induzem a secreção da OT estocada no CL. Essa liberação suplementar de OT luteal irá amplificar a produção endometrial de $\text{PGF2}\alpha$, formando-se um ciclo de retroalimentações positivas entre OT e

PGF2 α que resulta na secreção de pulsos de PGF2 α de alta amplitude, levando à regressão do CL. Portanto, a aquisição de responsividade à OT pelo endométrio parece determinar quando a luteólise irá ocorrer, sendo esse fenômeno regulado pela P4 e pelo E2 (SILVIA et al., 1991).

2.2.3. Estrutura molecular dos receptores de ocitocina, estradiol e progesterona

Os ER são proteínas da família de receptores intracelulares nucleares de esteróides que se ligam especificamente ao E2 (DAHLMAN-WRIGHT et al., 2006). Pelo fato de ser um hormônio esteróide, o E2 tem capacidade de atravessar a membrana fosfolipídica das células para se ligar aos receptores presentes no núcleo. Após se ligar ao E2, ocorrem alterações estruturais na molécula de ER e esta se liga ao DNA, promovendo ou inibindo a transcrição de genes específicos. Entretanto, o ER também tem funções adicionais independentes de ligação a DNA (LEVIN, 2005). Além da presença clássica na membrana do núcleo celular, que representa a grande maioria dos ER expressos nas células, também foram identificados ER na membrana celular (RAZANDI et al., 1999). No caso de ER de membrana plasmática, as ações resultantes da ligação ao E2 se dão através do recrutamento de segundos mensageiros, incluindo o cálcio, que rapidamente desencadeiam eventos celulares específicos (ACCONCIA & MARINO, 2003). Há dois subtipos de ER, α e β , ambos presentes no endométrio bovino (KUIPER et al., 1996; ROSENFELD et al., 1998), entretanto o subtipo α é o mais importante na regulação das atividades uterinas (COUSE & KORACH, 1999; MURAMATSU & INOUE, 2000). Em bovinos, a expressão dos ER uterinos apresenta alterações temporais e espaciais ao longo do ciclo estral porém, de

maneira geral e simplista, a expressão dos ER uterinos é diretamente proporcional às concentrações circulantes de E2 e inversamente proporcional às concentrações circulantes de P4, estando portanto, mais expressos durante o proestro e estro do que durante a fase luteal (BOOS et al., 1996; ROBINSON et al., 2001; MARTIN et al., 2008).

Os PR pertencem à mesma família dos ER que, como todos receptores de esteróides, contêm em sua estrutura um domínio regulatório com um terminal amina e outro carboxila, um domínio de ligação a DNA e um domínio de ligação hormonal (GADKAR-SABLE et al., 2005). Após atravessar a membrana plasmática das células alvo, a P4 se liga a esses receptores no núcleo, que se ligarão ao DNA e iniciarão ou inibirão transcrições específicas. Há três subtipos de PR, A, B e C os quais possuem diferentes atividades de transcrição, porém provêm do mesmo gene (MULAC-JERICEVIC & CONNELLY, 2004). Em humanos, estudos indicaram que a isoforma A reprime a função da isoforma B e de outros receptores esteróides, principalmente do ER, enquanto a isoforma B tem como atividade principal a regulação transcripcional (FUJIMOTO et al., 1997). Entretanto, em bovinos, as interações entre os três subtipos de PR ainda não foram compreendidas, de forma que na literatura atual a maioria dos estudos não avaliou esses subtipos separadamente. Assim como nos ER, a expressão dos PR no útero se altera espacial e temporalmente durante o ciclo estral. De forma geral e simplista, os PR uterinos estão expressos em maior proporção durante o proestro, estro e nos dois terços iniciais da fase luteal, e em menor proporção no terço final da fase luteal, quando há redução drástica em suas concentrações (ROBINSON et al., 2001).

Os OTR são membros típicos da família de receptores acoplados à proteína G classe 1, que se localizam na membrana plasmática das células. Sua estrutura consiste em sete domínios transmembrana em α -hélice, com um terminal extracelular amina e um terminal intracelular carboxila. Como já discutido, após a ligação da OT ao seu receptor, este se acopla à proteína G dando início a diversas reações bioquímicas que irão permitir entrada de cálcio na célula, fator essencial à ocorrência dos efeitos biológicos da OT, entre elas a síntese e secreção de $\text{PGF}_2\alpha$ nas células endometriais. A expressão dos OTR é altamente correlacionada à expressão dos ER sendo, portanto, maior durante o proestro e estro do que durante a fase luteal (ROBINSON et al., 2001).

2.2.4. Regulação dos receptores endometriais de ocitocina por estradiol e progesterona

A P4 regula a luteólise de formas antagônicas. A exposição à P4 promove o acúmulo de AA e COX nas células endometriais que, como discutido, são essenciais à síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ (SILVIA et al., 1991). Santos et al. (2009) observaram que vacas recebendo dieta de alta densidade energética apresentaram redução nas concentrações plasmáticas de P4 e na secreção de $\text{PGF}_2\alpha$ em resposta ao estímulo com OT. A suplementação com P4 no início do ciclo estral promoveu redução na duração do ciclo estral, provavelmente devido a acúmulo precoce de AA e COX no endométrio, causando secreção prematura de $\text{PGF}_2\alpha$ (GARRET et al., 1988). Esta relação positiva entre concentração circulante de P4 e produção de $\text{PGF}_2\alpha$ é uma possível explicação para a menor taxa de concepção em receptoras de embrião com altas concentrações circulantes de

P4, relatada por Nogueira et al. (2004), e para a relação negativa entre concentração circulante de P4 e sobrevivência embrionária, encontrada por Stronge et al. (2005). Por outro lado, até a segunda metade do ciclo estral, a P4 exerce efeito supressivo à secreção de $\text{PGF2}\alpha$ (SILVIA et al., 1991) através da inibição na expressão do gene dos OTR (MANN & LAMMING, 1994). Após aproximadamente 12 dias de exposição contínua, o efeito inibitório da P4 na expressão dos OTR se reduz (LAFRANCE & GOFF, 1988), possivelmente devido à redução nas concentrações de PR causada pela própria P4, e o endométrio passa a responder à OT secretando $\text{PGF2}\alpha$ (MCCRACKEN et al., 1999).

O E2 também tem importante função na regulação da luteólise, uma vez que a remoção dos folículos ovarianos resultou em maior duração do ciclo estral (VILLAGODOY et al., 1985; ARAÚJO et al., 2009) e a administração de E2 exógeno na metade da fase luteal elevou as concentrações plasmáticas de PGFM , dando início à luteólise (HIXON & FLINT, 1987). Esse efeito do E2 é dependente da P4, pois o mesmo foi observado somente após o endométrio ter sido previamente exposto à P4 (LAFRANCE & GOFF, 1988; LAMMING & MANN, 1995a). Outro fator determinante na regulação dos OTR pelo E2 é a concentração circulante desse esteróide. Após a metade da fase luteal, as concentrações de ER aumentam, possivelmente devido a estímulo causado pelo próprio E2 (XIAO & GOFF, 1999), elevando conseqüentemente as concentrações de OTR. Já nos momentos imediatamente antecedentes à ovulação, altas concentrações de E2 secretado pelo folículo ovulatório resultam no decréscimo das concentrações dos OTR (“down regulation”), produzindo uma situação de ausência de resposta do endométrio à OT nos primeiros dias do ciclo estral (LAMMING & MANN 1995a,b).

Sugere-se, a partir desses dados, que a regulação dos OTR pode ocorrer de três formas diferentes no decorrer do ciclo estral: 1) na fase inicial, quando a P4 ainda é baixa, os OTR encontram-se em baixas concentrações devido à inibição causada pelas altas concentrações circulantes de E2 no proestro e estro (Figura 1 – Painel A); 2) na metade da fase luteal, quando a inibição do E2 pré-ovulatório possivelmente já terminou, a P4 circulante encontra-se em concentrações mais elevadas, inibindo a expressão dos OTR endometriais (Figura 1 – Painel B); 3) No final da fase luteal, os PR são inibidos pela própria P4 e o folículo dominante secreta E2 em concentrações crescentes, propiciando a expressão dos ER e OTR no endométrio e permitindo a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ em resposta à OT (Figura 1 – Painel C).

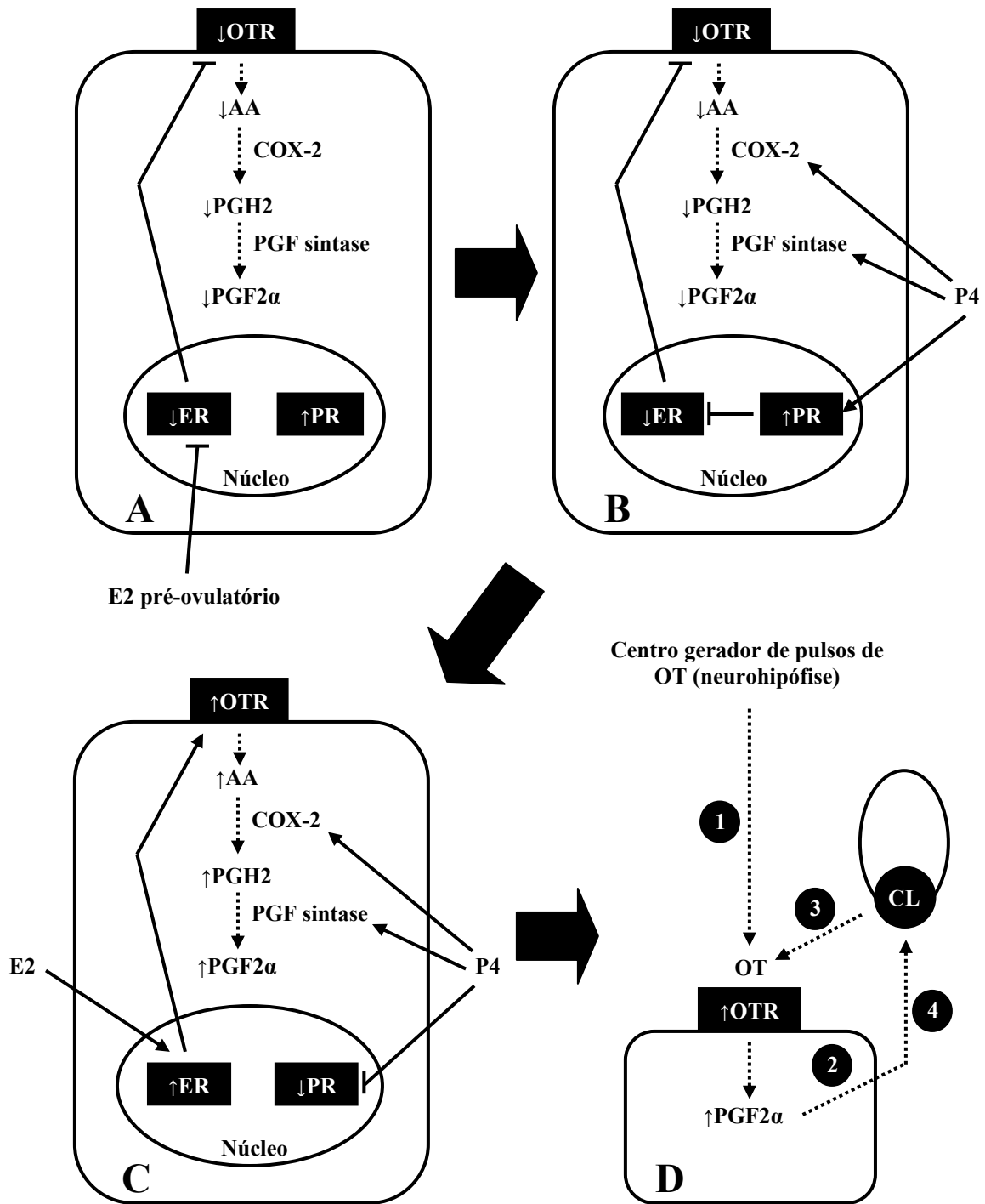


Figura 1: Diagrama esquemático dos eventos endócrinos e moleculares endometriais relacionados à luteólise, baseados no conhecimento atual (ver texto). AA: ácido aracídico; CL: corpo lúteo; ER: receptor endometrial de estradiol; E2: estradiol; OTR: receptor endometrial de ocitocina; PR: receptor endometrial de progesterona; PGF2 α , prostaglandina F2 α ; PGF sintase: prostaglandina F sintase; PGH2: prostaglandina H2; P4: progesterona; $\cdots \blacktriangleright$: “leva a”, “induz”; \uparrow : efeito estimulatório; \top : efeito inibitório. Painel A: início do ciclo estral. Painel B: metade do ciclo estral. Painel C: terço final do ciclo estral. Painel D: Momento da luteólise (1: secreção inicial de OT em pulsos de baixa amplitude e alta frequência; 2) secreção endometrial de PGF2 α em resposta ao evento 1; 3) secreção de OT luteal em resposta ao evento 2; 4) secreção endometrial de PGF2 α em resposta ao evento 3, estabelecendo-se um ciclo de retroalimentações positivas entre OT luteal e PGF2 α , e subsequente luteólise.

2.3. Luteólise prematura

De forma geral, considera-se luteólise prematura quando o ciclo estral dura menos de 17 dias (STAPLES et al., 1990). A ocorrência de luteólise prematura é bastante comum em vacas em anestro após ovulações induzidas por desmamas e/ou gonadotrofinas exógenas e em novilhas depois da primeira ovulação na puberdade (YAVAS & WALTON, 2000), sendo acompanhado por morte embrionária precoce, pois o CL regride no momento em que o embrião ainda não é suficientemente desenvolvido para produzir interferon- τ e impedir a luteólise, ocasionando mortalidade embrionária precoce. Em um estudo recente, Sá Filho et al. (2009a) avaliaram o primeiro ciclo estral pós-parto em vacas Nelore, induzindo ovulação com remoção de bezerros associada a GnRH, e constataram que 82,6% (19/23) dos animais apresentaram luteólise prematura. Considerando apenas as vacas que apresentaram luteólise prematura, em mais de 80% dos animais o CL regrediu entre o 5º e 7º dia do ciclo estral e nos demais, a luteólise ocorreu entre o 7º e 9º dia. Essa observação indica que, após a primeira ovulação pós-parto, a luteólise ocorre assim que o CL se torna responsivo à PGF2 α , ou seja, por volta do sexto dia do ciclo estral (HENRICKS et al., 1974).

A incidência de luteólise prematura parece não diferir entre bovinos de genética zebuína e taurina. Stagg et al. (1998) verificaram aproximadamente 85% (59/70) de luteólise prematura (< 16 dias) no primeiro ciclo estral pós-parto em fêmeas *Bos taurus*, valores semelhantes aos observados por Sá Filho et al. (2009a) em *Bos indicus*. Diversas hipóteses já foram propostas em estudos sobre luteólise prematura, entre elas: 1) desenvolvimento inadequado do folículo ovulatório (RAMIREZ-GODINEZ et al., 1981);

2) suporte gonadotrófico inadequado (MANNNS et al., 1983); 3) inabilidade do CL em responder às gonadotrofinas (KESLER et al., 1981); 4) estímulo luteolítico prematuro (PULGISI et al., 1979); 5) maior sensibilidade do CL a substâncias luteolíticas (TROXEL & KESLER, 1984a).

2.3.1. Características dos corpos lúteos que regridem prematuramente

Os primeiros estudos sobre luteólise prematura objetivaram determinar se a ocorrência desse fenômeno estaria relacionada a deficiências na função do CL. Observou-se que peso do CL, concentrações luteais de P4 e concentrações de receptores de LH foram semelhantes entre vacas com expectativa de luteólise prematura e vacas com expectativa de duração luteal normal (BRADEN et al., 1989a). Além disso, o número de células luteais, porcentagem de CLG e concentração de receptores de PGF2 α também foram similares nesses dois grupos experimentais. O'Shea et al. (1984) não observaram diferença na porcentagem de CLG, porém o número total e o tamanho das CLG foi menor nos CL de vacas com expectativa de luteólise prematura. Apesar da mesma quantidade de receptores de LH, houve menor resposta ao LH *in vitro* dos CL com expectativa de regressão prematura. Em outros estudos, a administração de LH ou hCG não afetou (KESLER et al., 1981; MCNEILLY et al., 1981) ou estimulou (O'SHEA et al., 1984; RUTTER et al., 1985) a secreção *in vitro* de P4 em CL cuja expectativa era de regressão prematura. Além disso, a sensibilidade à PGF2 α não diferiu entre CL com expectativa de luteólise prematura ou de duração normal (COPELIN et al., 1989).

2.3.2. Efeito do útero na ocorrência de luteólise prematura

Copelin et al. (1987) compararam a duração do primeiro ciclo estral pós-parto entre vacas intactas e histerectomizadas. Os animais intactos apresentaram o primeiro ciclo mais curto ($8,8 \pm 0,3$ dias) em relação às vacas histerectomizadas, nas quais só se observou regressão do CL após aplicação de $\text{PGF2}\alpha$. O segundo ciclo estral nas vacas intactas, entretanto, apresentou duração normal ($20,2 \pm 0,5$ dias). Esses dados confirmaram a hipótese de que a luteólise prematura é consequência de um estímulo luteolítico prematuro do útero, de acordo com o estudo prévio de Troxel & Kesler (1984b), os quais observaram que o pico de PGFM ocorre mais precocemente em vacas que apresentam luteólise prematura em comparação às que apresentam ciclo estral de duração normal. Além disso, a administração intra-uterina de indometacina, um potente inibidor da síntese de $\text{PGF2}\alpha$, prolongou a duração do primeiro CL formado pós-anestro (TROXEL & KESLER, 1984a) e a imunização ativa contra $\text{PGF2}\alpha$ em vacas em anestro reduziu a ocorrência de luteólise prematura após a ovulação (COPELIN et al., 1989). A partir desses estudos iniciais, novas pesquisas visaram determinar os mecanismos que desencadeiam e previnem o estímulo luteolítico prematuro.

2.3.3. Hipóteses para explicar a luteólise prematura

Apesar do consenso de que a luteólise prematura é consequência de uma antecipação na secreção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo útero (Figura 2 – Painel A) e que a regressão do CL ocorre assim que o mesmo fica responsivo à $\text{PGF2}\alpha$ (HENRICKS et al., 1974), ainda

há controvérsias em relação ao mecanismo causador da antecipação dos mecanismos luteolíticos. Atualmente conhecem-se duas principais hipóteses.

2.3.3.1. Hipótese da ausência de pré-exposição à progesterona

O segundo ciclo estral pós-parto, o qual sucede um ciclo de curta duração, apresentou duração normal (COPELIN et al., 1987), indicando que a exposição à P4 previamente à ovulação é um fator determinante na duração do subsequente CL.

Vasconcelos et al. (2009a) observaram que a utilização de dispositivos intravaginais de P4 por 7 dias em protocolos de indução de ciclicidade para vacas em anestro proporciona maior taxa de concepção à primeira IA. Esses resultados corroboram os trabalhos de Sá Filho et al. (2009a) em que pré-tratamentos com P4 tanto por 6 quanto por 3 dias reduziram consistentemente a ocorrência de luteólise prematura em vacas em anestro. Zollers et al. (1993) observaram redução na quantidade de OTR e incremento na quantidade de PR no endométrio de vacas pós-parto após tratamento com implante de norgestomet, sugerindo que a P4 pode apresentar efeito similar, já que o norgestomet atua através de ligação aos PR (MOFFATT et al., 1993).

Esses dados em conjunto indicam que o mecanismo pelo qual a P4 evita a luteólise prematura envolve a inibição de OTR e ativação de PR no endométrio após a ovulação (Figura 2 – Painel B).

2.3.3.2. Hipótese da concentração insuficiente de estradiol pré-ovulatório

Em diversos trabalhos verificou-se menor secreção de E2 por folículos que originaram CL de regressão prematura (GARVERICK et al., 1988; BRADEN et al., 1989a,b). Lamming & Mann (1995a,b), estudando vacas durante o ciclo estral normal, verificaram que o aumento das concentrações circulantes de E2 pré-ovulatório reduziu temporariamente a concentração endometrial de OTR e a secreção de PGF2 α no início da fase luteal. Vallet et al. (1990) e Lamming & Mann (1995a,b) observaram, em ovelhas e vacas ovariectomizadas, efeito negativo de altas doses de E2 exógeno na expressão de OTR endometriais nos dias subseqüentes ao tratamento. Mann & Lamming (2000), comparando animais ovariectomizados tratados com diferentes doses de E2 exógeno, constataram que altas concentrações desse esteróide provocaram depleção nos OTR endometriais. Entretanto, como trabalharam com vacas ovariectomizadas, não foi possível verificar a duração dos ciclos estrais. Esses dados indicam que a luteólise prematura pode resultar de uma secreção insuficiente de E2 pré-ovulatório, de forma a não haver inibição adequada dos OTR no início da fase luteal, possibilitando a secreção de PGF2 α (Figura 2 – Painel C).

Em estudos posteriores com animais intactos, no entanto, tratamentos visando elevar as concentrações pré-ovulatórias de E2 para evitar a luteólise prematura não apresentaram resultados satisfatórios. Mann & Haresign (2001) trataram ovelhas em anestro com sucessivas injeções de E2 previamente à indução da ovulação e observaram redução na secreção de PGFM no dia 4 após ovulação porém, não suficiente para evitar luteólise prematura. Sá Filho et al. (2009a) verificaram que tratamentos com 1 mg de 17 β -

estradiol ou de cipionato de estradiol previamente à ovulação induzida por GnRH não evitaram luteólise prematura em vacas Nelore em anestro.

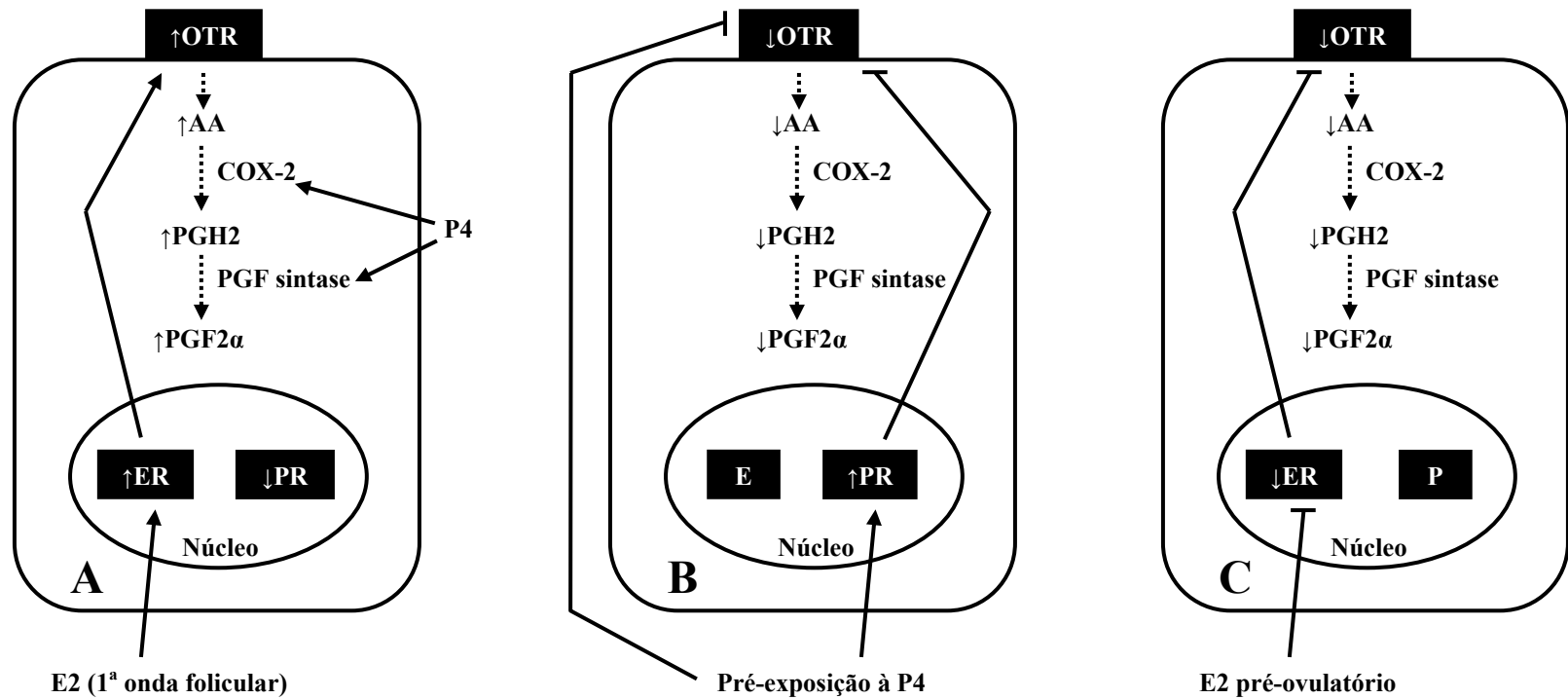


Figura 2: Diagrama esquemático dos possíveis mecanismos endócrinos e moleculares endometriais que causam e previnem a luteólise prematura, baseados no conhecimento atual (ver texto). AA: ácido aracádico; CL: corpo lúteo; ER: receptor endometrial de estradiol; E2: estradiol; OTR: receptor endometrial de ocitocina; PR: receptor endometrial de progesterona; PGF2 α , prostaglandina F2 α ; PGF sintase: prostaglandina F sintase; PGH2: prostaglandina H2; P4: progesterona; $\cdots \blacktriangleright$: “leva a”, “induz”; \uparrow : efeito estimulatório; \top : efeito inibitório. Painel A: modelo hipotético em que os eventos que normalmente ocorrem no final do ciclo estral são antecipados; Painel B: modelo hipotético proposto por Zollers et al. (1993), no qual a pré-exposição à P4 é o fator mais importante na prevenção da luteólise prematura; Painel C: Modelo hipotético proposto por Mann & Lamming (2000), no qual a concentração circulante de E2 no período pré-ovulatório é o fator mais importante na prevenção da luteólise prematura.

2.3.3.3. Associação entre progesterona e estradiol

Trabalhos com ovelhas realizados por Moore (1985) e Wilmut et al. (1986) mostraram que três estágios de exposição esteroidal são necessários para o desenvolvimento de um ambiente uterino favorável à concepção. A primeira é a fase de exposição à P4 imediatamente antes do estro, seguindo-se uma fase de concentrações crescentes de E2 no estro e, finalmente, a manutenção de concentrações de P4 suficientes no ciclo estral subsequente. Na primeira ovulação pós-parto, essa seqüência de exposição aos esteróides está alterada e as concentrações de P4 e E2 encontram-se limitadas, ao contrário do que ocorre quando vacas cíclicas ovulam folículos de tamanho adequado.

Garverick et al. (1988) observaram que o tratamento com P4 em vacas em anestro pós-parto resulta em maiores concentrações de E2 pré-ovulatório. Portanto, a prevenção da secreção prematura de PGF2 α pela pré-exposição à P4 pode não ser somente através de um mecanismo inibitório direto, mas também por um efeito indireto, devido à maior secreção de E2 pelo folículo pré-ovulatório. De fato, Kieborz-Loos et al. (2003), utilizando como modelo experimental vacas ovariectomizadas após o parto, observaram que animais tratados apenas com P4 apresentaram capacidade de secreção de PGF2 α em resposta à OT exógena mais precocemente em relação àqueles que receberam tratamento consistindo em exposição à P4, seguida por exposição ao E2 e novamente à P4. Sá Filho et al. (2009a) observaram incidência de 5,6% (1/18) de luteólise prematura ao tratarem vacas *Bos indicus* em anestro com P4 por 6 dias + estradiol-17 β antes da indução da ovulação, enquanto em vacas tratadas somente com P4 tal incidência foi de 21,9% (4/19). Isso indica que a

associação entre P4 e E2, respeitando a seqüência fisiológica, deve ser mais importante que os efeitos isolados da P4 ou do E2.

2.3.4. Luteólise prematura em vacas ciclando

Alguns trabalhos indicaram que a luteólise prematura pode ocorrer quando animais ciclando são induzidos a ovular folículos pequenos (VASCONCELOS et al., 2001; TAPONEN et al., 2003; PETERS & PURSLEY, 2003), com incidências variando entre 14,3% (3/21; VASCONCELOS et al., 2001) e 58,3% (7/12; PETERS & PURSLEY, 2003). Apesar de esse fenômeno parecer estar relacionado à ovulação de folículos menores ou menos maduros, Taponen et al. (2003) demonstraram que, similarmente ao que ocorre em animais em anestro, esses ciclos de curta duração são consequência de secreção prematura de PGF2 α pelo endométrio. Peters & Pursley (2003), ao testarem a antecipação da aplicação do segundo GnRH do protocolo Ovsynch, observaram redução nas taxas de concepção, provavelmente devido à ocorrência de luteólise prematura, já que as taxas de sincronização foram semelhantes às das vacas tratadas com o protocolo convencional. A ocorrência de luteólise prematura em animais ciclando ainda foi pouco estudada, porém reforça a idéia de que a associação entre P4 e E2 é determinante na duração do ciclo estral. Mesmo apresentando exposição prévia à P4, vacas que ovulam folículos menores apresentam menores concentrações circulantes de E2 pré-ovulatório, CL menores e menores concentrações circulantes de P4 na fase luteal subsequente (VASCONCELOS et al., 2001), fatores propícios à expressão de ER e OTR, e à luteólise prematura.

2.4. Efeitos dos esteróides ovarianos na morfologia uterina

O E2 e a P4 provocam importantes alterações fisiológicas e biossintéticas no trato reprodutivo das fêmeas mamíferas. Secreções uterinas e do oviduto moduladas por esteróides são essenciais para prover um ambiente compatível aos processos relativos à gestação, como o desenvolvimento embrionário inicial, implantação e placentação (BELL, 1988). A análise histomorfométrica tem sido utilizada com sucesso para monitorar alterações patológicas do endométrio bovino (GONZÁLEZ et al., 1985) e para estudar efeitos de drogas e hormônios no endométrio humano (JOHANISSON et al., 1991). Recentes avanços nos métodos de análise morfométrica têm permitido quantificar de forma confiável as alterações uterinas que ocorrem durante as fases dos ciclos reprodutivos em humanos e ruminantes (WAHAB et al., 1999; DHALIWAL et al., 2002) entretanto, não se encontraram na literatura dados referentes à morfologia uterina de ruminantes na condição de anestro, bem como de ruminantes em anestro induzidos à ovulação.

Em ovelhas cíclicas, elevadas concentrações pré-ovulatórias de E2 causaram aumento no peso uterino, na razão entre mRNA e DNA e na razão entre proteína total e DNA (JOHNSON et al., 1997a,b). Além disso, em ovelhas intactas, a proliferação celular no epitélio luminal, glândulas superficiais, glândulas profundas, estroma subepitelial superficial e profundo foi superior durante o estro em relação à fase luteal (JOHNSON et al., 1997a,b). Estudos em ovelhas intactas (JOHNSON et al., 1997a,b) e ovelhas ovariectomizadas tratadas com E2 exógeno (REYNOLDS et al., 1998) demonstraram que o E2 inicialmente induz hiperplasia e, em seguida, hipertrofia celular. Adicionalmente, o tratamento com E2 exógeno em ovelhas induziu hipertrofia do epitélio glandular e das

organelas citoplasmáticas sintetizadoras de proteínas, aumento do complexo de Golgi e de seus arranjos paralelos, aumento do retículo endoplasmático rugoso e dispersão da cromatina no núcleo das células, indicativos de elevação da síntese protéica (MURRAY, 1992). Coletivamente, esses dados indicam que o E2 promove proliferação celular no endométrio, aumenta sua capacidade de síntese protéica e ativa suas organelas secretoras.

Assim como o E2, a P4 também tem importante atuação na proliferação celular endometrial (GRAHAM & CLARKE, 1997). O tratamento com P4 exógena em ovelhas aumentou a produção de fatores angiogênicos endometriais (JOHNSON et al., 1997b), que são essenciais para aumentar a vascularização requerida em regiões de intensa proliferação celular. Além disso, a P4 aumenta a sensibilidade uterina ao E2, permitindo ou maximizando suas ações (JOHNSON et al., 1997b), e controla diversos fatores locais de crescimento, que mediam a proliferação celular, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento transformador α (TGF α ; GRAHAM & CLARKE, 1997). Além de efeitos na proliferação celular uterina, a P4 também atua controlando secreções uterinas que auxiliam na eclosão do embrião, nutrição embrionária pós-eclosão, implantação e placentação (GRAHAM & CLARKE, 1997). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias para prevenção da luteólise prematura não necessariamente garantirá concepção normal, pois a função secretora endometrial pode estar anormal em animais em anestro induzidos a ovular sem prévia exposição à P4 e/ou com baixas concentrações de E2. Nesse sentido, além de aspectos relacionados à luteólise em si, é essencial que também sejam estudados outros aspectos uterinos relacionados à fertilidade.

CAPÍTULO 2

EXPERIMENTO 1: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E MOLECULARES UTERINAS DE VACAS NELORE EM ANESTRO PÓS-PARTO

Resumo. O objetivo desse experimento foi avaliar a histomorfometria uterina, a expressão gênica endometrial de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2, e a expressão protéica de ER e PR (porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração dos núcleos positivos, em unidades arbitrárias [UA], à imunohistoquímica) em vacas em anestro ao longo do desenvolvimento da onda folicular. Vacas Nelore primíparas em anestro pós-parto foram avaliadas diariamente por ultrassonografia ovariana, visando acompanhar o desenvolvimento folicular, e submetidas à histerectomia quando o folículo dominante atingiu o diâmetro de 7,0 mm (FP; n = 4), 8,5 mm (FM; n = 4) ou 10,0 mm (FG; n = 4). Um grupo adicional (PRO; n = 4) consistiu em vacas submetidas a remoção de bezerros (RB; 48 h) quando o folículo dominante atingiu o diâmetro de 9,5 mm e histerectomizadas ao final da RB. Os dados foram analisados pelo PROC GLM do programa SAS. A concentração sérica de estradiol no dia da histerectomia foi maior nas vacas do grupo PRO em relação aos demais grupos (FP: 0,7 pg/mL; FM: 0,8 pg/mL; FG: 1,1 pg/mL; PRO: 2,9 pg/mL; $P < 0,05$). Não houve efeito de grupo ($P > 0,1$) nas variáveis histomorfométricas e na expressão gênica endometrial de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2. As vacas do grupo PRO apresentaram maior intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER nas células epiteliais glandulares superficiais (FP: 75,9 UA; FM: 75,2 UA; FG: 71,5 UA; PRO: 88,5 UA), intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR nas células epiteliais

glandulares profundas (FP: 70,2 UA; FM: 73,1 UA; FG: 69,2 UA; PRO: 85,7 UA) e porcentagem de núcleos positivos para PR no estroma subepitelial superficial (FP: 58,2%; FM: 58,0%; FG: 57,3%; PRO: 63,4) em relação às vacas dos demais grupos ($P < 0,05$). As vacas dos grupos FG e PRO apresentaram maior porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial profundo em relação às vacas dos demais grupos (FP: 76,0%; FM: 76,4%; FG: 83,6%; PRO: 86,1%; $P < 0,05$). Nas demais regiões do endométrio, a expressão protéica de ER e PR foi semelhante entre os grupos. Ao longo do desenvolvimento folicular de 7,0 mm até 10,0 mm, em vacas em anestro, houve aumento apenas na porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial profundo, não ocorrendo alterações na histomorfometria uterina e na expressão de genes relacionados à luteólise. Após RB, vacas em anestro apresentaram elevação da expressão dos ER e PR apenas em algumas regiões específicas do endométrio, como epitélio glandular e estroma subepitelial.

Palavras-chave: Anestro, receptores de estradiol, receptores de progesterona, receptores de ocitocina, histomorfometria uterina.

Uterine Histomological and Molecular Characteristics in Postpartum Anestrus

Nelore Cows

Abstract. The objective of this study was to evaluate the uterine histomorphometry, gene expression of ER, PR, OTR, COX-1 and COX-2, and protein expressions of ER and PR (percentage of positive nuclei and staining intensity of positive nuclei, in arbitrary units [AU], at immunohistochemistry) in anestrus cows throughout the development of a follicular wave. Primiparous postpartum anestrus Nelore cows were evaluated daily by ovarian ultrasonography and submitted to hysterectomy when the dominant follicle reached the diameter of 7.0 mm (FP; n = 4), 8.5 mm (FM; n = 4), or 10.0 mm (FG; n = 4). An additional group (PRO; n = 4) consisted in cows submitted to temporary weaning (TW; 48 h) when the dominant follicle reached 9.5 mm and hysterectomized at the end of TW. Data were analyzed by PROC GLM of SAS. Serum concentration of estradiol at the day of hysterectomy was greater in cows from PRO group than in cows from the other groups (FP: 0.7 pg/mL; FM: 0.8 pg/mL; FG: 1.1 pg/mL; PRO: 2.9 pg/mL; $P < 0.05$). There were no effects of group ($P > 0.1$) on histomorphometrical variables and on endometrial gene expression of ER, PR, OTR, COX-1, and COX-2. Cows from PRO group had greater staining intensity of ER-positive nuclei in shallow glandular epithelium (FP: 75.9 AU; FM: 75.2 AU; FG: 71.5 AU; PRO: 88.5 AU), staining intensity of PR-positive nuclei in deep glandular epithelium (FP: 70.2 AU; FM: 73.1 AU; FG: 69.2 AU; PRO: 85.7 AU), and greater percentage of PR-positive nuclei in shallow subepithelial stroma (FP: 58.2%; FM: 58.0%; FG: 57.3%; PRO: 63.4%) than cows from the other groups ($P < 0.05$). Cows from

FG and PRO groups had a greater percentage of ER-positive nuclei in deep subepithelial stroma than cows from the other groups (FP: 76.0%; FM: 76.4%; FG: 83.6%; PRO: 86.1%; $P < 0.05$). In the other endometrial areas, the protein expressions of ER and PR were similar among groups. We concluded that in anestrous cows, follicular development from 7.0 mm to 10.0 mm increased only the percentage of ER-positive nuclei in the deep subepithelial stroma, with no changes on uterine histomorphometry and expression of luteolysis-related genes. After TW, there was an increase in expression of ER and PR only in specific areas of endometrium, such as glandular epithelium and subepithelial stroma.

Keywords: Anestrus, estradiol receptors, progesterone receptors, oxytocin receptors, uterine histomorphometry.

1. Justificativa

Avaliar a expressão gênica endometrial de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2, a expressão protéica de ER e PR e a histomorfometria uterina de vacas em anestro ao longo do desenvolvimento da onda folicular. A hipótese foi que em vacas em anestro, devido às baixas concentrações circulantes de P4, a expressão de enzimas e receptores endometriais relacionados à luteólise, bem como o desenvolvimento tecidual uterino, são regulados pelo E2 circulante, de acordo com o crescimento folicular.

2. Materiais e métodos

Este experimento, bem como os descritos nos Capítulos 3 e 4, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu, tendo sido aprovado pela referida comissão (Protocolo nº 40/2007-CEEA).

2.1. Animais e manejo reprodutivo

Foram utilizadas inicialmente 63 vacas primíparas Nelore em anestro, com 30 a 60 dias pós-parto e escore de condição corporal $2,93 \pm 0,01$ (escala de 1 a 5; HOUGHTON et al., 1990), mantidas a pasto (*Brachiaria humidicola*) e pertencentes à Pecuária Novo Horizonte, localizada no município de Coxim-MS. A condição de anestro foi determinada por dois exames ultrassonográficos e pelas concentrações séricas de P4, conforme será descrito a seguir. A partir do dia do segundo exame, os animais foram submetidos a exames ultrassonográficos diários a fim de se acompanhar o desenvolvimento folicular.

Após se detectar a presença de um folículo em crescimento, pela comparação de duas sucessivas imagens, os animais continuaram sendo avaliados diariamente por ultrassonografia ovariana e foram aleatoriamente distribuídos para receber um dos seguintes tratamentos: excisão cirúrgica do corno uterino ipsilateral ao folículo dominante quando o mesmo atingiu o diâmetro de 7,0 mm (FP; n = 4); excisão cirúrgica do corno uterino ipsilateral ao folículo dominante quando o mesmo atingiu o diâmetro de 8,5 mm (FM; n = 4); excisão cirúrgica do corno uterino ipsilateral ao folículo dominante quando o mesmo atingiu o diâmetro de 10,0 mm (FG; n = 4); remoção de bezerros (RB; 48 horas) quando o folículo dominante atingiu o diâmetro de 9,5 mm e excisão cirúrgica do corno uterino ipsilateral ao folículo dominante ao final da RB. O diâmetro folicular (média dos quadrados mínimos \pm EPM) das vacas do grupo PRO no momento da histerectomia foi $11,31 \pm 0,03$ mm.

2.2. Remoção temporária de bezerros

Durante 48 horas os bezerros foram separados das vacas do grupo PRO em currais de forma a não haver contato físico entre ambos. Nesse período foi fornecido água à vontade para os bezerros. O objetivo da RB foi estimular o desenvolvimento folicular de modo a se produzir um ambiente endócrino semelhante ao observado no primeiro proestro pós-parto, ou seja, elevação nas concentrações circulantes de E2 sem prévia exposição à P4.

2.3. Ultrassonografia das estruturas ovarianas

Os exames ultrassonográficos foram realizados com aparelho Aloka, modelo SSD-500 com transdutor linear retal de 7,5 MHz. A avaliação da ciclicidade foi realizada através de dois exames ultrassonográficos com intervalo de 7 dias, sendo considerados em anestro os animais que não apresentaram tecido luteal em ambos os exames. Além disso, amostras de sangue colhidas nesses dias para dosagem das concentrações séricas de P4 confirmaram a condição de anestro, conforme será descrito a seguir. A avaliação do desenvolvimento folicular foi realizada através de exames ultrassonográficos diários, os quais se iniciaram no dia da segunda avaliação ultrassonográfica para ciclicidade. O diâmetro folicular foi determinado através da média entre o maior diâmetro e o diâmetro perpendicular a ele.

2.4. Colheitas e análises de sangue

As amostras de sangue foram colhidas de vasos coccígeos em tubos tipo vacutainer sem anticoagulante e armazenadas por 24 horas em refrigerador a 4 °C, quando então foram centrifugados a 1500 x g por 10 minutos a 25 °C. O soro foi separado e armazenado a -20 °C até a realização das dosagens.

2.4.1. Dosagens de progesterona

As amostras de sangue para dosagem de P4 para confirmar a condição de anestro foram colhidas imediatamente após os dois exames ultrassonográficos em que se avaliaram presença de tecido luteal. Todas as vacas com ausência de CL ao exame ultrassonográfico

apresentaram concentrações séricas de P4 inferiores a 1,0 ng/mL em ambos os dias confirmando, portanto, a condição de anestro. A dosagem de P4 foi realizada por radioimunoensaio utilizando-se o produto comercial Coat-a-Count[®] (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) e procedimentos de acordo com as recomendações do fabricante, no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP/Botucatu. A sensibilidade do ensaio foi 0,1 ng/mL e coeficiente de variação intra-ensaio foi 6,1%.

2.4.2. Dosagens de estradiol

As amostras de sangue para dosagem de E2 foram colhidas imediatamente antes de as vacas serem submetidas à histerectomia unilateral. As dosagens de E2 foram realizadas por radioimunoensaio, utilizando-se kits comerciais de 3^a Geração da DSL-39100[®] (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, EUA), no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP/Botucatu. Todas as amostras de soro foram dosadas em duplicata, após procedimento de extração. Foram adicionados 200 µL da amostra de soro e 3 mL de solução benzeno/tolueno na proporção de 2:1 (v/v) a tubos de ensaio (vidro borossilicato 16 x 100 mm), os quais foram homogeneizados por 20 minutos em vórtex e imediatamente locados em freezer -80 °C. Após 4 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio (vidro borossilicato 12 x 75 mm) e permaneceu em capela para evaporação por 24 horas, quando os extratos foram ressuspensos em 200 µL de PBSg e o ensaio prosseguiu de acordo com as recomendações do fabricante. A curva padrão foi construída a partir de

sucessivas diluições 1:1 (v/v) do padrão 15 pg/mL com o padrão 0 ng/mL do kit, obtendo-se, assim, os padrões 0,00, 0,06, 0,12, 0,23, 0,47, 0,94, 1,87, 3,75, 7,50 e 15,00 pg/mL. Além desses padrões, a curva padrão contou ainda com amostras TC (“total count”), NSB (“non-specific binding”) e BLK (“blank”). As amostras TC consistiram na adição de 100 µL do marcador (E2 contendo moléculas de iodo radioativo) e levadas ao contador gama sem drenagem do conteúdo. Para a obtenção do NSB, pipetaram-se da 200 µL da amostra do padrão 0,00 pg/mL, porém sem adição de anticorpo primário, e os demais procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Para a obtenção do BLK, realizaram-se pipetagem inicial de 3,2 mL de solução solvente, evaporação, ressuspensão em 200 µL de PBSg e posterior prosseguimento do ensaio de acordo com as recomendações do fabricante.

As porcentagens de ligação das amostras de soro foram calculadas a partir de uma equação de regressão em relação à média das amostras BLK, enquanto a porcentagem de ligação das amostras da curva padrão foram calculadas a partir de uma equação de regressão em relação à média das amostras-padrão 0,00 pg/mL. A sensibilidade do ensaio foi 0,5 pg/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi 12,3%.

2.5. Colheita, manipulação e análises dos tecidos uterinos

2.5.1. Laparotomia e histerectomia unilateral

As amostras de tecidos uterinos foram obtidas após excisão cirúrgica do corno uterino ipsilateral ao folículo dominante. Para o procedimento cirúrgico, cada vaca foi previamente contida de forma apropriada em tronco de contenção e sedada com 0,6 mL de

cloridrato de xylazina 2% (Rompun[®], Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil). Após tricotomia da região da fossa paralombar direita (20 cm x 20 cm), com lâmina de barbear em aço inox, a mesma foi submetida a assepsia com solução de iodo 2% e, posteriormente, enxaguada com solução de álcool 70%. Em seguida, realizou-se o procedimento de anestesia local infiltrativa em “L” invertido, em que 50 mL de cloridrato de lidocaína 2% (Anestésico L Pearson[®], Eurofarma Laboratórios Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram injetados de maneira a formar duas linhas convergentes de aproximadamente 20 cm cada, sendo uma paralela à margem dorso-caudal da última costela e a outra paralela à margem ventro-lateral dos processos transversos das vértebras lombares.

No centro da fossa paralombar direita, aproximadamente 5 cm ventralmente aos processos transversos das vértebras lombares, foi realizada uma incisão da pele estendendo-se 15 cm ventralmente. Para o acesso à cavidade abdominal, foi necessário realizar incisão com tesoura da fáscia subcutânea e da túnica abdominal, dissecação manual dos músculos abdominais oblíquo externo, oblíquo interno e transversos, e posterior incisão com tesoura do peritônio. A identificação do útero foi feita por palpação e o corno uterino ipsilateral ao folículo dominante foi exteriorizado, ligado a aproximadamente 5 cm de distância da bifurcação uterina com fio catgut cromado nº 2 (Brasuture Indústria Comércio Importação e Exportação Ltda., São Sebastião da Gramma, SP, Brasil) e excisado com auxílio de tesoura. O fragmento do corno uterino excisado foi imediatamente colocado em saco plástico estéril, acondicionado em recipiente térmico contendo gelo e levado a um local fechado para adequada manipulação das amostras, conforme será descrito posteriormente.

A incisão do flanco foi suturada em 3 planos: (1) sutura contínua simples envolvendo peritônio e musculaturas com fio categute cromado nº 2; (2) sutura contínua tipo Cushing do tecido subcutâneo com fio categute cromado nº 2; (3) sutura interrompida simples da pele com fio de algodão tipo cordonê “Urso”. Após cada cirurgia, a região da incisão foi lavada com solução de álcool iodado e polvilhada com repelente de insetos (Tanidil[®], Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil). Os procedimentos pós-cirúrgicos, que se iniciaram imediatamente após as cirurgias, consistiram em: (1) tratamento diário, por 5 dias consecutivos, com flunixin meglumine (20 mL/dia de Banamine[®], Schering-Plough Saúde Animal, Cotia, SP, Brasil); (2) tratamento com duas injeções a intervalo de 48 horas de antibiótico (Pentabiótico Veterinário Reforçado[®], Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP, Brasil); (3) acompanhamento diário para detecção de míases e sua eliminação, quando detectada. A remoção dos fios de sutura da pele foi realizada 8 dias após a cirurgia.

2.5.2. Manipulação dos tecidos uterinos

Ao chegar à sala de manipulação, incisou-se com tesoura o fragmento de corno uterino longitudinalmente, expondo-se o endométrio, o qual foi lavado com solução fisiológica a 4 °C. A partir desse material duas amostras foram obtidas, sempre a uma distância de 5 a 7 cm da junção uterotubárica: 1) a primeira amostra consistiu em um fragmento da região intercaruncular contendo endométrio, miométrio e serosa, para a realização das análises histomorfométrica e imunohistoquímica. Esse fragmento foi acondicionado em cassete plástico, fixado em formol tamponado 10% durante 20 horas e,

posteriormente, mantido em etanol 70% até o momento da inclusão em parafina; 2) a segunda amostra consistiu em um fragmento de 1 cm x 1 cm de endométrio intercaruncular, o qual foi obtido através de dissecação, para a realização das análises de expressão gênica. Esse fragmento foi imediatamente acondicionado em frasco plástico tipo Eppendorf estéril e livre de RNase contendo solução RNA Later[®] (Ambion, Austin, TX, EUA) e mantido a 4 °C por 24 horas. Em seguida, o fragmento endometrial foi removido da solução RNA Later[®], transferido para outro frasco plástico tipo Eppendorf estéril e livre de RNase, e mantido a -20 °C até o momento da extração de RNA. Optou-se pela colheita de material da região intercaruncular pelo fato de essa ser a principal região produtora de PGF2 α (SKARZYNSKI et al., 2000).

2.5.3. Análises dos tecidos uterinos

2.5.3.1. Avaliação histomorfométrica

Para a avaliação das características histomorfométricas uterinas, montaram-se lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE). O protocolo de coloração HE foi realizado no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP/Botucatu e consistiu nas seguintes etapas:

1) Desidratação do material em banhos de álcool, como descrito a seguir:

- Imersão rápida em álcool 85%;
- Imersão rápida em álcool 95%;
- Imersão em álcool absoluto I por 5 minutos;
- Imersão em álcool absoluto II por 5 minutos;

- Imersão em álcool absoluto III por 5 minutos;
 - Imersão em Xilol I por 5 minutos;
 - Imersão em Xilol II por 5 minutos;
- 2) Inclusão do tecido desidratado em parafina;
 - 3) Microtomia do bloco de parafina em cortes de 3 μm ;
 - 4) Acondicionamento dos cortes (três por vaca) em lâminas histológicas;
 - 5) Desparafinização do material, como descrito a seguir:
 - Incubação das lâminas a 57 °C por 30 minutos em cuba de vidro contendo xilol;
 - Incubação das lâminas à temperatura ambiente por 20 minutos em uma nova solução de xilol;
 - 6) Secagem das lâminas com papel filtro;
 - 7) Re-hidratação do material em banhos de álcool, como descrito a seguir:
 - Imersão rápida em álcool 95%;
 - Imersão em álcool absoluto I por 5 minutos;
 - Imersão em álcool absoluto II por 5 minutos;
 - Imersão em álcool absoluto III por 5 minutos;
 - Imersão em álcool 95% por 5 minutos;
 - Imersão em álcool 85% por 5 minutos;
 - 8) Imersão em solução de hematoxilina por 4 minutos, com posterior remoção do excesso de corante por lavagem em água corrente;

- 9) Imersão em solução de álcool etílico 70% contendo 0,3% (v/v) de ácido clorídrico por 2 segundos, com posterior remoção do excesso de corante por lavagem em água corrente;
- 10) Imersão em solução de eosina por 2 minutos, com posterior remoção do excesso de corante por lavagem em água corrente;
- 11) Desidratação do material como descrito a seguir:
 - Imersão rápida em álcool 85%;
 - Imersão rápida em álcool 95%;
 - Imersão em álcool absoluto I por 1 minuto;
 - Imersão em álcool absoluto II por 1 minuto;
 - Imersão em Xilol I por 2 minutos;
 - Imersão em Xilol II por 2 minutos;
- 12) Colagem de lamínulas com resina sintética.

Imagens digitais de cada lâmina foram obtidas com auxílio de câmera fotográfica. Para a análise morfométrica utilizou-se o programa ImageJ (National Institutes of Health, disponível em www.rsbl.info.nih.gov/ij/). Determinaram-se a altura média das células epiteliais luminais, glandulares superficiais e glandulares profundas, a área endometrial percentual, o número de ductos glandulares por unidade de área endometrial, o perímetro dos ductos glandulares e a área ocupada por ductos glandulares por unidade de área endometrial e por unidade de área total de tecido uterino. Para a determinação da área endometrial percentual, considerou-se o endométrio inteiro, incluindo os estromas

subepiteliais superficial e profundo. Os cinco principais tecidos presentes no endométrio (epitélio luminal, estroma subepitelial superficial e profundo, e epitélio glandular superficial e profundo) estão demonstrados na Figura 3-A.

Quando a glândula endometrial é seccionada histologicamente, diversos ductos glandulares são observados, podendo ou não representar a mesma glândula. Por essa razão, no presente estudo, utiliza-se a referência “ductos glandulares” ao invés de “glândula”.

2.5.3.2. Receptores de estradiol e progesterona

Para a avaliação de ER e PR nos tecidos uterinos, montaram-se lâminas coradas pela técnica de imunohistoquímica, de acordo com os procedimentos validados e descritos por Martin et al. (2008). Os protocolos de imunohistoquímica foram realizados no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP/Botucatu e consistiram nas seguintes etapas:

- 1) Desidratação do material em banhos de álcool, de maneira semelhante à descrita no item anterior;
- 2) Inclusão do tecido desidratado em parafina;
- 3) Microtomia do bloco de parafina em cortes de 3 μ m;
- 4) Acondicionamento dos cortes (três por vaca) em lâminas histológicas previamente preparadas com organossilano (A3648, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- 5) Desparafinização do material, de maneira semelhante à descrita no item anterior;
- 6) Secagem das lâminas com papel filtro;
- 7) Re-hidratação do material em banhos de álcool, como descrito a seguir:

- Imersão rápida em álcool 95%;
 - Imersão em álcool absoluto I por 5 minutos;
 - Imersão em álcool absoluto II por 5 minutos;
 - Imersão em álcool absoluto III por 5 minutos;
 - Imersão em álcool 95% por 5 minutos;
 - Imersão em álcool 85% por 5 minutos;
- 8) Recuperação antigênica, como descrito a seguir:
- Receptores de estradiol: incubação das lâminas imersas em solução de citrato de sódio 10 mM (pH = 6,0) em forno microondas durante 15 minutos;
 - Receptores de progesterona: incubação das lâminas imersas em solução de EDTA 10 mM (pH = 8,0) com incubação em banho-maria a 96 °C durante 40 minutos;
- 9) Lavagem das lâminas em água corrente durante 10 minutos e subsequente passagem das lâminas por dois banhos de água destilada;
- 10) Bloqueio da peroxidase endógena, através da imersão das lâminas em solução de metanol contendo 3% de água oxigenada 3% durante 30 minutos, renovando-se a solução aos 15 minutos;
- 11) Lavagem das lâminas em água corrente durante 10 minutos e subsequente passagem das lâminas por dois banhos de água destilada;
- 12) Dupla lavagem do material em solução tampão TRIS (pH = 7,4) por 5 minutos cada;

- 13) Alocação das lâminas em câmara úmida e incubação das mesmas em solução tampão TRIS contendo 5% de albumina sérica bovina (BSA; A7906, Sigma-Aldrich) durante 1 hora em temperatura ambiente;
- 14) Incubação com o anticorpo primário diluído em solução de BSA 5% à proporção de 1:50 (v/v) durante 18 horas a 4 °C. Para a avaliação de ER utilizou-se um anticorpo policlonal obtido em coelho anti-receptor de estrógeno humano com reatividade cruzada para a espécie bovina (Estrogen Receptor Ab-17[®] Rabbit Polyclonal Antibody, Neomarkers, Fremont, CA, EUA; MARTIN et al., 2008) e para a avaliação de PR utilizou-se um anticorpo monoclonal obtido em camundongo anti-receptor de progesterona humano com reatividade cruzada para a espécie bovina (Progesterone Receptor Ab-8 Clone hPRa 2+hPRa 3[®] Mouse Monoclonal Antibody, Neomarkers; MARTIN et al., 2008);
- 15) Dupla lavagem do material em solução tampão TRIS por 5 minutos cada;
- 16) Incubação das amostras com o anticorpo secundário por 30 minutos a temperatura ambiente, seguida por incubação com complexo ABC (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante;
- 17) Lavagem do material em solução tampão TRIS por 5 minutos;
- 18) Tratamento das lâminas com o cromógeno DAB (Liquid DAB Cromogen[®], Dako Cytomation) durante 2 minutos ao abrigo da luz, para revelação da reação;
- 19) Interrupção da reação de revelação, como descrito a seguir:
 - Dupla imersão rápida em solução tampão TRIS;
 - Lavagem em água corrente por 10 minutos;

- Dupla imersão rápida em água destilada;
- 20) Contracoloração com Hematoxilina de Mayer por 3 minutos;
- 21) Interrupção da reação de coloração, como descrito a seguir:
- Lavagem em água corrente por 10 minutos;
 - Dupla imersão rápida em água destilada;
- 22) Desidratação do material como descrito a seguir:
- Imersão rápida em álcool 85%;
 - Imersão rápida em álcool 95%;
 - Imersão em álcool absoluto I por 1 minuto;
 - Imersão em álcool absoluto II por 1 minuto;
 - Imersão em Xilol I por 2 minutos;
 - Imersão em Xilol II por 2 minutos;
- 23) Colagem de lâminulas com resina sintética Permound (UN1294, Fisher Scientific Co., Fair Lwan, NJ, EUA).

Os controles negativos do ensaio para ER consistiram em lâminas onde a incubação com o anticorpo primário foi substituída pela incubação com imunoglobulina de coelho (Rabbit Immunoglobulin – Negative Control, Dako; Figura 3-C), enquanto os controles negativos do ensaio para ER consistiram em lâminas onde a incubação com o anticorpo primário foi substituída pela incubação com imunoglobulina de camundongo (Mouse Immunoglobulin – Universal Negative Control, Dako; Figura 3-D). Os demais procedimentos foram realizados de forma semelhante à descrita acima.

Utilizaram-se dois métodos para a avaliação da imunomarcção nas células endometriais epiteliais luminais, glandulares superficiais e glandulares profundas e nos estromas subepiteliais superficial e profundo. No primeiro método, contou-se o número de núcleos positivos (marrons; Figura 3-B) ou negativos (azuis; Figura 3-B), independente da intensidade de marcação, até que o total de núcleos alcançasse 200. No segundo método, a intensidade de coloração dos núcleos positivos contados pelo método analítico anterior foi analisada usando o programa ImageJ (BRIDGES, 2007). Os núcleos foram contornados em limiar mínimo e a intensidade de coloração da área contornada foi determinada usando a opção de análise de partículas. A intensidade de coloração do material de lâmina (“background”) foi determinada previamente e utilizada para ajustar os valores de cada amostra. Os valores de intensidade de coloração reportados nos resultados são ajustados. Adotaram-se unidades arbitrárias (UA) para os dados de intensidade de coloração.

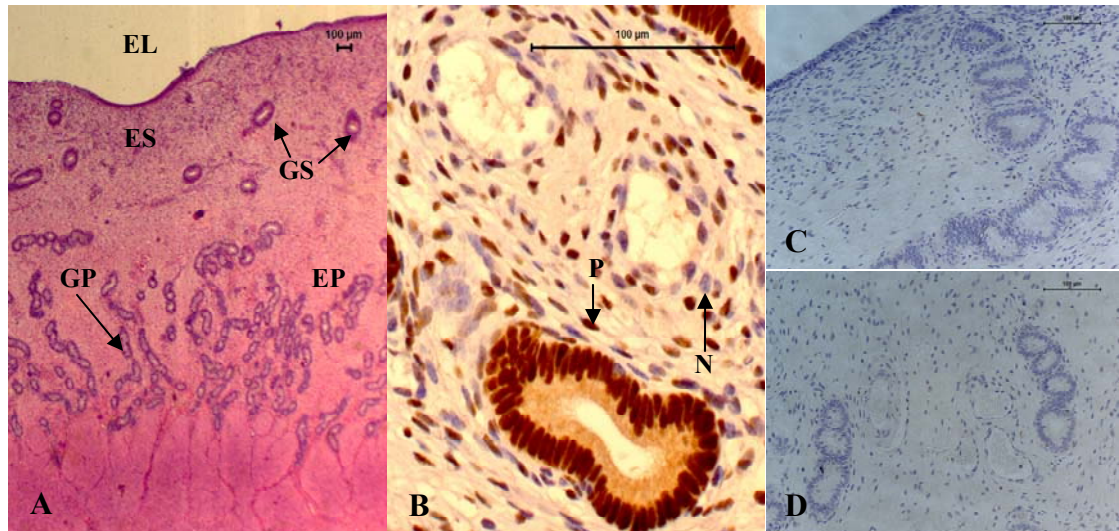


Figura 3: A) Lâmina de tecido uterino corada pela técnica de hematoxilina-eosina. EL: epitélio luminal; ES: estroma subepitelial superficial; GS: ducto glandular superficial; EP: estroma subepitelial profundo; GP: ducto glandular profundo. B) Lâmina de tecido uterino corada pela técnica de imunohistoquímica; P: núcleo imunorreativo (positivo); N: núcleo não-imunorreativo (negativo). C) Controle negativo do ensaio para receptor de estradiol; D) Controle negativo do ensaio para receptor de progesterona.

2.5.3.3. Expressão gênica de ER, PR, OTR e das enzimas COX-1 e COX-2

Para a avaliação da expressão gênica de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2, utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real, após transcrição reversa (RT-PCR em Tempo Real). Os protocolos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana do Departamento de Fisiologia do IBB/UNESP/Botucatu e consistiram nas seguintes etapas:

- 1) Descongelamento das amostras;
- 2) Imersão de fragmentos das amostras (50 a 100 mg) em 1 mL de solução Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA);

- 3) Trituração das amostras em homogeneizador de tecidos (Polytron UltraTurrax T-25) e aplicação do protocolo Trizol[®], de acordo com as especificações do fabricante, para extração de RNA total;
- 4) Solubilização das amostras de RNA em 20 µL de água destilada;
- 5) Mensuração das concentrações das amostras de RNA total por espectrofotometria (BioPhotometer[®], Eppendorf, Westbury, NY, EUA);
- 6) Tratamento das amostras de RNA total com DNase, seguindo o protocolo DNase I – Amplification Grade[®] (Invitrogen), como descrito a seguir:
 - Cálculo do volume da solução de RNA total a ser tratada, visando-se conter 1 µg de RNA total;
 - Adição de 1 µL de tampão DNase;
 - Adição de 1 µL de DNase I;
 - Adição de água destilada livre de RNase, de forma a completar um volume final de 10 µL;
 - Incubação à temperatura ambiente por 15 minutos;
 - Adição de 1 µL de EDTA (25 mM);
 - Incubação a 65 °C por 10 minutos;
 - Transferência das amostras para gelo;
- 7) Reação de transcrição reversa, utilizando-se o protocolo comercial SuperScript III[®] (Invitrogen), como descrito a seguir:
 - Transferência de 8 µL da solução de RNA total tratada com DNase para tubo estéril;

- Adição de 1 μ L de oligonucleotídeo iniciador Oligo (dT; 500 μ g/mL);
 - Adição de 1 μ L de DNTP Mix (10 nM);
 - Adição de 3 μ L de água destilada;
 - Incubação a 65 °C por 5 minutos;
 - Incubação em gelo por 1,5 minuto;
 - Adição de 4 μ L de tampão “First Strand” 5X;
 - Adição de 1 μ L de DTT (0,1 M);
 - Adição de 1 μ L de “RNase OUT Inhibitor” (40 unidades/ μ L);
 - Adição de 1 μ L SuperScript III[®] (transcriptase reversa);
 - Incubação a 50 °C por 50 minutos;
 - Incubação a 70 °C por 15 minutos;
 - Incubação em gelo por 2 minutos;
- 8) Aplicação do protocolo de amplificação do produto comercial Power Sybr Green Master Mix[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em placas de 96 poços contendo 12,5 μ L de Power Sybr Green Master Mix[®], 1 μ L de cDNA (diluição 1:5) e 11,5 μ L de oligonucleotídeos iniciadores bovino-específicos. Os genes GAPDH, ciclofilina (CYC-A) e histona foram testados através do programa GeNorm[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) para seleção do controle endógeno mais estável e a CYC-A foi o melhor controle endógeno. Por esse motivo, em todos os experimentos descritos na presente tese, os resultados referentes a expressões gênicas estão descritos como média dos quadrados mínimos (\pm EPM) dos níveis

expressos do gene alvo em relação aos níveis expressos do gene constitutivo CYC-A e, portanto, não possuem unidade.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores para CYC-A, ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2 (S: oligonucleotídeo iniciador “sense”; A: oligonucleotídeo iniciador “antisense”; pb: pares de base).

Gene	Seqüência iniciadora (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Eficiência de amplificação	[] final (nM)
CYC-A	S- GCCATGGAGCGCTTTGG	65	60,0	96,0%	300 nM
	A- CCACAGTCAGCAATGGTGATCT				
ER	S- GGGAAGCTCCTATTTGCTCC	233	56,0	96,7%	250 nM
	A- CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT				
PR	S- AGAACTCATCAAGGCAATTGG	226	56,0	91,0%	300 nM
	A- CACCATCCCTGCCAATATCTT				
OTR	S- CTCCAGCCAGAGAAGATGCT	107	60,0	93,0%	300 nM
	A- GCCACCAAGAACCAGAGTGT				
COX-1	S- TGCCTTCTTTGCCCAACTTCAC	150	60,0	98,6%	300 nM
	A- TTAAAGAGCCGCGCTGATACCGA				
COX-2	S- TGCTGAGTTTAACACGCTTACCA	125	60,0	87,5%	300 nM
	A- TGAGACCATGTTCCAGTAAGACAGA				

As condições para amplificação dos genes foram: 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C (desnaturação) e 1 minuto à temperatura específica de anelamento (Tabela 1), seguido de curva de dissociação padrão. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão no ABI Prism 7500[®] Sequence Detection System (Applied Biosystems).

A eficiência de amplificação de cada gene analisado foi estimada utilizando-se o programa LinRegPCR[®] (RAMAKERS et al., 2003), considerando-se a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra. A determinação do “threshold” de cada gene considerou as médias de no mínimo 4 pontos da curva de amplificação durante a fase exponencial das amostras analisadas. Os valores de expressão

gênica foram normalizados pela expressão do gene da CYC-A pela seguinte equação (PFAFFL et al., 2001):

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}(\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{CYC-A}})^{\Delta\text{CP}_{\text{CYC-A}}(\text{controle} - \text{amostra})}}$$

em que E_{alvo} é a eficiência do transcrito do gene alvo, $E_{\text{CYC-A}}$ é a eficiência do transcrito gene referência (CYC-A); $\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}$ é desvio do ponto de cruzamento (CP) do gene alvo transcrito; $\Delta\text{CP}_{\text{CYC-A}}$ é desvio de CP do gene referência transcrito.

Para cada primer, a linha de “threshold” foi fixada no ponto médio da janela de linearidade, determinada pelos valores mínimos e máximos de fluorescência. Uma amostra foi escolhida aleatoriamente e foi utilizada como controle.

2.6. Análise estatística

As variáveis dependentes foram analisadas pelo procedimento GLM do programa SAS. Para cada variável, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Quando os dados não obedeceram às premissas para a análise, foram submetidos à transformação logarítmica ou inversa e re-analisados. As médias ajustadas foram re-expressas na escala original.

Para a análise das variáveis dependentes concentração sérica de E2 no dia da histerectomia, morfometria uterina (altura das células epiteliais luminais, altura das células epiteliais glandulares superficiais, altura das células epiteliais glandulares profundas, área endometrial percentual, densidade de ductos glandulares, perímetro dos ductos glandulares superficiais e profundos, área ocupada por ductos glandulares por unidade de área

endometrial e área ocupada por ductos glandulares por unidade de área total de tecido uterino), ER (porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração), PR (porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração) e expressão gênica (ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2), o modelo incluiu os efeitos de grupo e escore de condição corporal (covariável).

As médias gerais foram desdobradas e comparadas somente quando detectado efeito ou tendência a efeito de grupo. Utilizou-se o teste t para comparação de médias, e considerou-se significância quando $P < 0,05$ e tendência a significância quando $0,1 > P \geq 0,05$.

3. Resultados e discussão

As variáveis contínuas descritas a seguir estão expressas como média dos quadrados mínimos \pm EPM.

3.1. Estruturas e esteróides ovarianos

A concentração sérica de E2 no dia da histerectomia foi influenciada por grupo, sendo maior nas vacas do grupo PRO em relação aos demais grupos (FP: 0,71 pg/mL; FM: 0,77 pg/mL; FG: 1,09 pg/mL; PRO: 2,91 pg/mL; EPM = 0,29; $P < 0,05$). Esse resultado contrariou em parte a expectativa inicial, uma vez que estudos prévios demonstraram que a capacidade esteroideogênica folicular está positivamente relacionada ao seu tamanho (VASCONCELOS et al., 2001; SÁ FILHO et al., 2009a). Essa diferença pode ter ocorrido devido à utilização vacas primíparas amamentando não pré-expostas à P4, enquanto os

estudos encontrados na literatura utilizaram vacas múltiparas cíclicas ou vacas múltiparas em anestro tratadas com P4.

Em vacas de corte primíparas em sistemas de pastejo exclusivo, a ingestão de nutrientes não é suficiente para atender à demanda para crescimento e lactação, implicando em balanço energético negativo mais severo que em vacas múltiparas (JOLLY et al., 1995), e conseqüentemente menor secreção pulsátil de LH (BUTLER, 2000). Stagg et al. (1995) compararam padrões de desenvolvimento folicular em vacas de corte em anestro pós-parto alimentadas com dietas para ganho ou perda de peso e observaram que as concentrações circulantes de E2 nas vacas perdendo peso permaneceram baixas mesmo com o folículo dominante em crescimento, indicando que o balanço energético negativo pode comprometer a secreção de E2, aumentar sua metabolização, ou ambos. É provavelmente por esse motivo que vacas em anestro pós-parto chegam a apresentar folículos com diâmetro adequado, porém não ovulam, já que a concentração circulante de E2 é insuficiente para induzir pico de LH (WILTBank et al., 2002). Entretanto, as vacas do grupo PRO, as quais foram submetidas a remoção de bezerros, apresentaram maior concentração sérica de E2 que as vacas dos demais grupos, provavelmente porque a restrição do estímulo da amamentação na vaca reduziu a sensibilidade hipotalâmica à retroalimentação negativa do E2 (ACOSTA et al., 1983; ZALESKY et al., 1990), permitindo maior frequência de pulsos de LH, crescimento do folículo dominante e secreção de E2 (EDWARDS, 1985; VASCONCELOS et al., 2009b).

3.2. Aspectos moleculares relacionados à luteólise

Discordando da hipótese inicial, não houve efeito de grupo ($P > 0,1$) na expressão gênica de ER ($7,25 \pm 1,66$), PR ($5,42 \pm 1,83$), OTR ($15,12 \pm 2,42$), COX-1 ($2,19 \pm 0,86$) e COX-2 ($1,20 \pm 0,42$). Houve efeito de grupo ($P < 0,05$) na intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER nas células epiteliais glandulares superficiais, sendo maior nas vacas do grupo PRO em relação às vacas dos demais grupos (FP: 75,88 UA; FM: 75,17 UA; FG: 71,49 UA; PRO: 88,54 UA; EPM = 5,32), e na porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial profundo, sendo maior nas vacas dos grupos FG e PRO em relação às vacas dos grupos FP e FM (FP: 75,96% UA; FM: 76,40% UA; FG: 83,62% UA; PRO: 86,13% UA; EPM = 3,25). A porcentagem de núcleos positivos e a intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER nas demais regiões endometriais não foram influenciadas por grupo (porcentagem de núcleos positivos no epitélio luminal: $94,64 \pm 1,88\%$; intensidade de coloração dos núcleos positivos do epitélio luminal: $86,35 \pm 2,49$ UA; porcentagem de núcleos positivos no epitélio glandular superficial: $95,97 \pm 0,95\%$; porcentagem de núcleos positivos no epitélio glandular profundo: $95,55 \pm 1,27\%$; intensidade de coloração dos núcleos positivos do epitélio glandular profundo: $94,92 \pm 1,13$ UA; porcentagem de núcleos positivos no estroma subepitelial superficial: $94,84 \pm 1,55\%$; intensidade de coloração dos núcleos positivos do estroma subepitelial superficial: $96,03 \pm 1,09$ UA; intensidade de coloração dos núcleos positivos do estroma subepitelial profundo: $96,24 \pm 1,49$ UA).

Foram observados efeitos de grupo ($P < 0,05$) na intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR nas células epiteliais glandulares profundas, sendo maior nas

vacas do grupo PRO em relação às vacas dos demais grupos (FP: 70,22 UA; FM: 73,15 UA; FG: 69,19 UA; PRO: 85,74 UA; EPM = 1,92), e na porcentagem de núcleos positivos para PR no estroma subepitelial superficial, sendo maior nas vacas do grupo PRO em relação às vacas dos grupos FP e FM (FP: 58,19%; FM: 58,03%; FG: 57,35%; PRO: 63,42%; EPM = 1,17). A porcentagem de núcleos positivos e a intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR nas demais regiões endometriais não foram influenciadas por grupo (porcentagem de núcleos positivos no epitélio luminal: $94,85 \pm 0,68\%$; intensidade de coloração dos núcleos positivos do epitélio luminal: $90,04 \pm 2,29$ UA; porcentagem de núcleos positivos no epitélio glandular superficial: $95,39 \pm 0,83\%$; intensidade de coloração dos núcleos positivos no epitélio glandular superficial: $90,57 \pm 0,95$ UA; porcentagem de núcleos positivos no epitélio glandular profundo: $90,26 \pm 1,01\%$; intensidade de coloração dos núcleos positivos do estroma subepitelial superficial: $87,67 \pm 1,12$ UA; porcentagem de núcleos positivos no estroma subepitelial profundo: $47,75 \pm 1,03\%$; intensidade de coloração dos núcleos positivos do estroma subepitelial profundo: $83,57 \pm 1,26$ UA).

Os resultados do presente experimento corroboram parcialmente a hipótese experimental inicial, uma vez que os efeitos observados ocorreram apenas na expressão protéica de ER e PR em algumas regiões endometriais, como epitélio glandular e estroma superficial, e em estágios avançados do desenvolvimento folicular. De forma geral, há consenso na literatura de que ocorre estímulo à expressão de ER e OTR durante o proestro e estro (MEYER et al., 1988; BOOS et al., 1996; ROBINSON et al., 2001), levando diversos autores a sugerir que o E2 é responsável por esse efeito. De fato, a remoção dos

foliculos ovarianos resultou em maior duração do ciclo estral (VILLA-GODOY et al., 1985; ARAÚJO et al., 2009) e a administração de E2 exógeno na metade da fase luteal elevou as concentrações plasmáticas de PGFM, dando início à luteólise (HIXON & FLINT, 1987). Uma das possibilidades acerca da diferença entre os resultados do Experimento 1 e os relatos de literatura em vacas cíclicas seria a de que, na vaca em anestro, as concentrações circulantes de E2 seriam insuficientes para causar alterações significativas no endométrio. Em fêmeas murinas ovariectomizadas, o tratamento com E2 exógeno elevou drasticamente a expressão gênica e protéica de OTR no útero (ZINGG et al., 1998). No entanto, o E2 sem pré-exposição à P4 não foi capaz de ativar a resposta do endométrio a injeções de OT em vacas e ovelhas ovariectomizadas (HOMANICS & SILVIA, 1988; MANN et al., 2001). Alguns experimentos indicaram inclusive um possível efeito inibitório do E2 nos OTR na ausência de pré-exposição à P4 (VALLET et al., 1990; ZHANG et al., 1992), enquanto o E2 após exposição à P4, causa grande estímulo à expressão de OTR e à secreção de $\text{PGF2}\alpha$ estimulada pela OT em bovinos e ovinos (LAU et al., 1993; KAMINSKI et al., 1997; WALKER et al., 1997). É possível, portanto, que a pré-exposição à P4 seja necessária para que o E2 exerça seus efeitos clássicos mais relevantes sobre o endométrio.

3.3. Histomorfometria uterina

Não houve efeito de grupo ($P > 0,1$) nas variáveis histomorfométricas avaliadas (altura das células epiteliais luminais: $22,92 \pm 1,75 \mu\text{m}$; altura das células epiteliais glandulares superficiais: $30,68 \pm 3,26 \mu\text{m}$; altura das células epiteliais glandulares profundas: $28,62 \pm 2,94 \mu\text{m}$; área endometrial em relação à área uterina: $35,14 \pm 3,85\%$;

densidade de ductos glandulares: $18,07 \pm 4,21$ ductos/mm²; perímetro dos ductos glandulares superficiais: $240,65 \pm 21,36$ μ m; perímetro dos ductos glandulares profundos: $222,06 \pm 18,48$ μ m; área glandular em relação à área endometrial: $6,26 \pm 0,87\%$; área glandular em relação à área uterina: $2,35 \pm 0,72\%$).

Estudos avaliando a histomorfologia uterina em ruminantes têm utilizado como modelo experimental fêmeas cíclicas em diferentes fases do ciclo estral (WANG et al., 2007), fêmeas em início de gestação (GUILLOMOT & GUAY, 1982) ou fêmeas ovariectomizadas e suplementadas com E2 e P4 exógenos (MURRAY, 1992; JOHNSON et al., 1997a). Entretanto, o presente experimento é o primeiro de nosso conhecimento que avaliou parâmetros histomorfométricos uterinos em vacas *Bos indicus* durante a condição de anestro pós-parto.

Pelo fato de a expressão de ER ter sido elevada em todas as regiões endometriais para todos os grupos, a ausência de efeito de grupo na histomorfometria uterina indica que durante a condição de anestro as concentrações endógenas de E2 podem não ser suficientes para causar alterações morfológicas no útero. Em ovelhas cíclicas, concentrações elevadas de E2 pré-ovulatório causaram aumento no peso uterino, na proporção RNA:DNA e na proporção proteína:DNA (JOHNSON et al., 1997a,b). São escassos, no entanto, trabalhos avaliando os efeitos do E2 na morfologia uterina de ruminantes em anestro. Em um estudo prévio (MURRAY, 1992), ovelhas ovariectomizadas e tratadas com implante que forneceu 5 a 10 pg/mL de E2 circulante apresentaram hipertrofia do epitélio uterino no segundo dia do tratamento. Além disso, ratos modificados geneticamente para não expressarem PR apresentaram hipertrofia do epitélio uterino, como resultado de uma maior expressão de

ER decorrente da ausência de inibição da P4 (LYDON et al., 1995). Em vacas intactas em anestro, portanto, é possível que existam outros fatores influenciando o efeito do E2 na proliferação celular endometrial, que sejam necessárias concentrações mais elevadas de E2 circulante para causar tal efeito, ou ainda que seja necessária pré-exposição à P4 para que o E2 exerça suas ações.

4. Conclusões

De acordo com os resultados do presente experimento, conclui-se que, em vacas em anestro pós-parto:

- o diâmetro folicular e o proestro, induzido pela remoção de bezerros, não alteraram as características histomorfométricas uterinas e as expressões gênicas de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2;

- a remoção de bezerros causou elevação na expressão endometrial de ER e PR restrita a algumas regiões, como epitélio glandular e estroma subepitelial.

CAPÍTULO 3

EXPERIMENTO 2: EFEITO DO TRATAMENTO COM PROGESTERONA NAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E MOLECULARES UTERINAS DE VACAS NELORE EM ANESTRO PÓS-PARTO

Resumo. O objetivo desse experimento foi avaliar os efeitos do tratamento com P4 por 6 dias na histomorfometria uterina, expressão gênica endometrial de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2, e na expressão protéica de ER e PR (porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração dos núcleos positivos, em unidades arbitrárias [UA], à imunohistoquímica) em vacas em anestro submetidas à indução de ovulação. Vacas Nelore primíparas em anestro pós-parto foram submetidas à aspiração guiada por ultrassom dos folículos ovarianos ≥ 6 mm no Dia -8 e aleatoriamente distribuídas para receber RB entre os Dias -2 e 0 (48 h) e GnRH no Dia 0 (CONTROLE; n = 15) ou um dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de P4 entre os dias -8 e -2, seguido por tratamento idêntico ao descrito para o CONTROLE (CIDR; n = 15). Dentro de cada tratamento, as vacas foram aleatoriamente distribuídas para serem submetidas à histerectomia no Dia -2, 0 ou 5 (n = 5/tratamento/dia). Os dados foram analisados pelo PROC GLM do programa SAS. As vacas do tratamento CIDR apresentaram maior altura das células epiteliais luminiais (36,8 vs. 30,0 μm ; $P < 0,05$), área glandular em relação à área endometrial (21,3 vs. 15,9%; $P < 0,1$), área glandular em relação à área uterina total (9,3 vs. 6,4%; $P < 0,05$), altura das células epiteliais glandulares profundas nos Dias -2 (31,8 vs. 23,4 μm ; $P < 0,05$) e 0 (28,2 vs. 21,4 μm ; $P < 0,05$), área endometrial percentual nos Dias -2 (41,1 vs. 34,6%; $P < 0,05$)

e 0 (52,7 vs. 43,3%; $P < 0,05$) e perímetro dos ductos glandulares profundos nos Dias -2 (270,8 vs. 226,3 μm ; $P < 0,05$) e 0 (249,8 vs. 191,1 μm ; $P < 0,05$) em relação às vacas do tratamento CONTROLE, e menor ($P < 0,05$) expressão gênica (em relação à expressão do gene constitutivo ciclofilina A) de ER nos Dias -2 (2,5 vs. 6,8), 0 (3,5 vs. 6,6) e 5 (2,1 vs. 4,5), expressão gênica de OTR nos Dias -2 (3,8 vs. 14,4), 0 (7,7 vs. 14,7) e 5 (3,6 vs. 7,0), porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial superficial (77,6 vs. 95,6%) e profundo (63,1 vs. 88,0%), intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no epitélio glandular superficial (82,6 vs. 93,3 UA), epitélio luminal nos Dias -2 (69,1 vs. 84,3 UA) e 0 (54,5 vs. 87,7 UA), estroma subepitelial superficial nos Dias -2 (76,6 vs. 97,1 UA) e 0 (74,7 vs. 95,7 UA) e estroma subepitelial profundo nos Dias -2 (76,6 vs. 95,6 UA) e 0 (84,7 vs. 97,0 UA). Apesar de não ter sido observado efeito de tratamento na expressão gênica de PR, as vacas do tratamento CIDR apresentaram maior ($P < 0,05$) porcentagem de núcleos positivos para PR no epitélio glandular profundo (95,1 vs. 91,1%), estroma subepitelial profundo (75,3 vs. 53,0%) e estroma subepitelial superficial nos Dias -2 (75,6 vs. 54,2%) e 0 (84,4 vs. 69,5%), e maior ($P < 0,05$) intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no epitélio glandular profundo no Dia -2 (86,9 vs. 66,9 UA) e no estroma subepitelial profundo no Dia 0 (88,3 vs. 77,8 UA). Conclui-se que o tratamento com P4 causou alterações temporais e locais no endométrio que podem favorecer o desenvolvimento embrionário, como proliferação do tecido glandular, e desfavorecer a secreção de $\text{PGF2}\alpha$, reduzindo o risco potencial de luteólise prematura.

Palavras-chave: Anestro, progesterona, receptores de estradiol, receptores de progesterona, receptores de ocitocina, histomorfometria uterina.

Effect of Treatment with Progesterone on Uterine Histological and Molecular Characteristics in Postpartum Anestrus Nelore Cows

Abstract. The objective of this study was to evaluate the effects of a 6-d treatment with P4 on the uterine histomorphometry, the gene expression of ER, PR, OTR, COX-1 and COX-2, and the protein expressions of ER and PR (percentage of positive nuclei and staining intensity of positive nuclei, in arbitrary units [AU], at immunohistochemistry) in anestrus cows submitted to induction of ovulation. Primiparous postpartum anestrus Nelore cows were submitted to ultrasound-guided aspiration of ≥ 6 mm follicles on Day -8 and randomly assigned to receive TW between Days -2 and 0 (48 h) and GnRH on Day 0 (CONTROLE; n = 15) or an intravaginal insert containing 1.9 g of progesterone between Days -8 and -2, followed by a treatment similar to the described for the CONTROLE (CIDR; n = 15). Within each treatment, cows were randomly distributed to receive hysterectomy either on Day -2, 0, or 5 (n = 5/treatment/day point). Data were analyzed by PROC GLM of SAS. Cows from treatment CIDR had greater luminal epithelial cell height (36.8 vs. 30.0 μm ; $P < 0.05$), gland duct area by endometrial area (21.3 vs. 15.9%; $P < 0.1$), gland duct area by total uterine area (9.3 vs. 6.4%; $P < 0.05$), deep glandular epithelial cell height on Days -2 (31.8 vs. 23.4 μm ; $P < 0.05$) and 0 (28.2 vs. 21.4 μm ; $P < 0.05$), percentual endometrial area on Days -2 (41.1 vs. 34.6%; $P < 0.05$) and 0 (52.7 vs. 43.3%; $P < 0.05$) and deep gland duct perimeter on Days -2 (270.8 vs. 226.3 μm ; $P < 0.05$) and 0 (249.8 vs. 191.1 μm ; $P < 0.05$) than cows from CONTROLE treatment, and lower ($P < 0.05$) ER gene expression (relative to cyclophilin A mRNA) on Days -2 (2.5 vs. 6.8), 0

(3.5 vs. 6.6) and 5 (2.1 vs. 4.5), OTR gene expression (relative to cyclophilin A mRNA) on Days -2 (3.8 vs. 14.4), 0 (7.7 vs. 14.7) and 5 (3.6 vs. 7.0), percentage of ER-positive nuclei in shallow (77,6 vs. 95,6%) and deep (63.1 vs. 88.0%) subepithelial stroma, staining intensities of ER-positive nuclei in shallow glandular epithelium (82.6 vs. 93.3 AU), luminal epithelium on Days -2 (69.1 vs. 84.3 AU) and 0 (54.5 vs. 87.7 AU), shallow subepithelial stroma on Days -2 (76.6 vs. 97.1 AU) and 0 (74.7 vs. 95.7 AU) and deep subepithelial stroma on Days -2 (76.6 vs. 95.6 AU) and 0 (84.7 vs. 97.0 AU). Although no effect of treatment on PR gene expression was found, cows from treatment CIDR had greater ($P < 0.05$) percentages of PR-positive nuclei in deep glandular epithelium (95.1 vs. 91.1%), deep subepithelial stroma (75.3 vs. 53.0%) and shallow subepithelial stroma on Days -2 (75.6 vs. 54.2%) and 0 (84.4 vs. 69.5%), and greater ($P < 0.05$) staining intensities of PR-positive nuclei in deep glandular epithelium on Day -2 (86.9 vs. 66.9 AU) and in deep subepithelial stroma on Day 0 (88.3 vs. 77.8 AU). In conclusion, treatment with P4 caused temporal and local changes in the endometrium that might benefit early embryonic development, such as glandular tissue proliferation, and delay the secretion of $\text{PGF2}\alpha$, reducing the potential risk of premature luteolysis.

Keywords: Anestrus, progesterone, estradiol receptors, progesterone receptors, oxytocin receptors, uterine histomorphometry.

1. Justificativa

Avaliar a histomorfometria uterina, a expressão gênica endometrial de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2, e a expressão protéica de ER e PR em vacas em anestro submetidas à indução de ovulação pré-tratadas ou não com P4 exógena. A hipótese desse experimento foi que o tratamento com P4 em vacas em anestro reduz a expressão de enzimas e receptores endometriais que propiciam a luteólise e causa alterações proliferativas nos tecidos uterinos.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais e tratamentos

Foram utilizadas inicialmente 45 vacas primíparas Nelore em anestro, com 30 a 60 dias pós-parto e escore de condição corporal $3,00 \pm 0,01$ (escala de 1 a 5; HOUGHTON et al., 1990), mantidas a pasto (*Brachiaria humidicola*) e pertencentes à Pecuária Novo Horizonte, localizada no município de Coxim-MS. A condição de anestro foi determinada por dois exames ultrassonográficos e pelas concentrações séricas de P4, conforme descrito no Capítulo 2. No dia do segundo exame de ciclicidade (Dia -8), as vacas que não apresentaram tecido luteal em ambos os exames ultrassonográficos foram submetidas à aspiração guiada por ultrassom dos folículos ovarianos ≥ 6 mm e aleatoriamente distribuídas para receber um dos seguintes tratamentos (Figura 4): RB entre os dias -2 e 0 (48 horas), seguido por tratamento com 200 µg de GnRH (2 mL de Fertagyl[®], Intervet, Cruzeiro, SP, Brasil), via intramuscular, ao final da RB (CONTROLE; n = 15); dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de P4 (CIDR[®], Pfizer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil)

entre os Dias -8 e -2, seguido por tratamento semelhante ao descrito para o CONTROLE (CIDR; n = 15). Dentro de cada tratamento, as vacas foram aleatoriamente distribuídas para serem submetidas à excisão cirúrgica do corno uterino ipsilateral ao folículo dominante nos Dias -2 (n = 5) ou 0 (n = 5) ou do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo no Dia 5 (n = 5) e cada vaca foi retirada do experimento imediatamente após a realização de sua histerectomia. O objetivo desse delineamento foi evitar biópsias repetidas em um mesmo animal, o que poderia eventualmente acarretar reação inflamatória, com potencial efeito nos resultados. Os Dias -2, 0 e 5 foram escolhidos por consistirem, respectivamente, no último dia de tratamento com P4 (imediatamente antes do início do proestro), no dia da indução da ovulação (final do proestro), e no último dia de secreção luteal normal de P4 (COPELIN et al., 1987; SÁ FILHO et al., 2009a) e de refratariedade do CL à PGF2 α (HENRICKS et al., 1974).

2.2. Aspirações foliculares

Para a realização das aspirações foliculares, as vacas foram contidas e receberam anestesia epidural baixa, por aplicação de 3,5 mL de lidocaína a 2% (Anestésico Pearson[®]), e anti-sepsia da região do períneo, por lavagem com solução de álcool etílico a 70%. Utilizou-se aparelho Aloka modelo SSD-500 equipado com um transdutor convexo de 5,0 MHz com cabo estendido contendo a sonda vaginal e a guia da agulha. Uma agulha de 50 cm de comprimento e calibre 18 foi acoplada a uma seringa de 10 mL, a qual foi utilizada para aspirar o fluido dos folículos de diâmetro ≥ 6 mm. O objetivo da aspiração folicular foi sincronizar a onda folicular.

2.3. Remoção temporária de bezerras

O procedimento e objetivo da RB realizada no presente experimento foram semelhantes ao descrito no Capítulo 2.

2.4. Ultrassonografia das estruturas ovarianas

Os exames ultrassonográficos foram realizados com aparelho Aloka, modelo SSD-500 com transdutor linear retal de 7,5 MHz. A avaliação da ciclicidade foi realizada através de dois exames ultrassonográficos nos Dias -15 e -8, sendo considerados em anestro os animais que não apresentaram tecido luteal em ambos os exames. Além disso, amostras de sangue colhidas nesses dias para dosagem das concentrações séricas de P4 confirmaram a condição de anestro, conforme será descrito a seguir. No Dia -2, as vacas a serem submetidas à histerectomia nos Dias -2, 0 e 5 foram avaliadas por ultrassonografia ovariana, visando-se determinar o lado em que o folículo dominante se encontrava e o seu diâmetro, através da média entre o maior diâmetro e o diâmetro perpendicular a ele. No Dia 0, avaliou-se o diâmetro folicular das vacas a serem submetidas à histerectomia nos Dias 0 e 5. A ovulação foi avaliada apenas nas vacas designadas a receber histerectomia no Dia 5, através da comparação das imagens ultrassonográficas dos Dias 0 e 2. Considerou-se ovulação quando a vaca apresentou um folículo de diâmetro $\geq 8,5$ mm no Dia 0 e ausência do mesmo no Dia 2. As vacas designadas a receber histerectomia no Dia 5 que não ovularam ao tratamento com GnRH foram excluídas do experimento. As vacas que ovularam foram avaliadas por ultrassonografia ovariana nos Dias 2 e 5, visando-se determinar o lado em que o CL se encontrava e o seu diâmetro.

2.5. Colheitas e análises de sangue

Os procedimentos de colheita, manipulação e armazenamento de soro realizados no presente experimento foram semelhantes aos descritos no Capítulo 2.

2.5.1. Dosagens de progesterona

Amostras de sangue para dosagem de P4 para confirmar a condição de anestro foram colhidas nos Dias -15 e -8, imediatamente após os dois exames ultrassonográficos em que se avaliou a presença de tecido luteal. Todas as vacas com ausência de CL ao exame ultrassonográfico apresentaram concentrações séricas de P4 inferiores a 1,0 ng/mL em ambos os dias confirmando, portanto, a condição de anestro. Além das amostras para verificar a ciclicidade, também foram realizadas colheitas de sangue para dosagem de P4 nos Dias -2, 2 e 5. A dosagem de P4 do presente experimento foi realizada no mesmo ensaio descrito no Capítulo 2, cuja sensibilidade foi 0,1 ng/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi 6,1%.

2.5.2. Dosagens de estradiol

Amostras de sangue para dosagem de E2 foram colhidas nos Dias -2 e 0. A dosagem de E2 do presente experimento foi realizada no mesmo ensaio descrito no Capítulo 2, cuja sensibilidade foi 0,5 pg/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi 12,3%.

2.6. Colheitas e análises de tecidos uterinos

Os procedimentos de colheita, manipulação, armazenamento dos tecidos uterinos realizados no presente experimento foram semelhantes aos descritos no Capítulo 2. As análises laboratoriais (coloração HE para avaliação morfológica, imunohistoquímica para ER e PR e RT-PCR em Tempo Real para ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2) das amostras uterinas coletadas no presente experimento foram realizadas nos mesmos ensaios descritos no Capítulo 2.

2.7. Resumo do delineamento experimental

Na Figura 4 está resumido o delineamento do presente experimento:

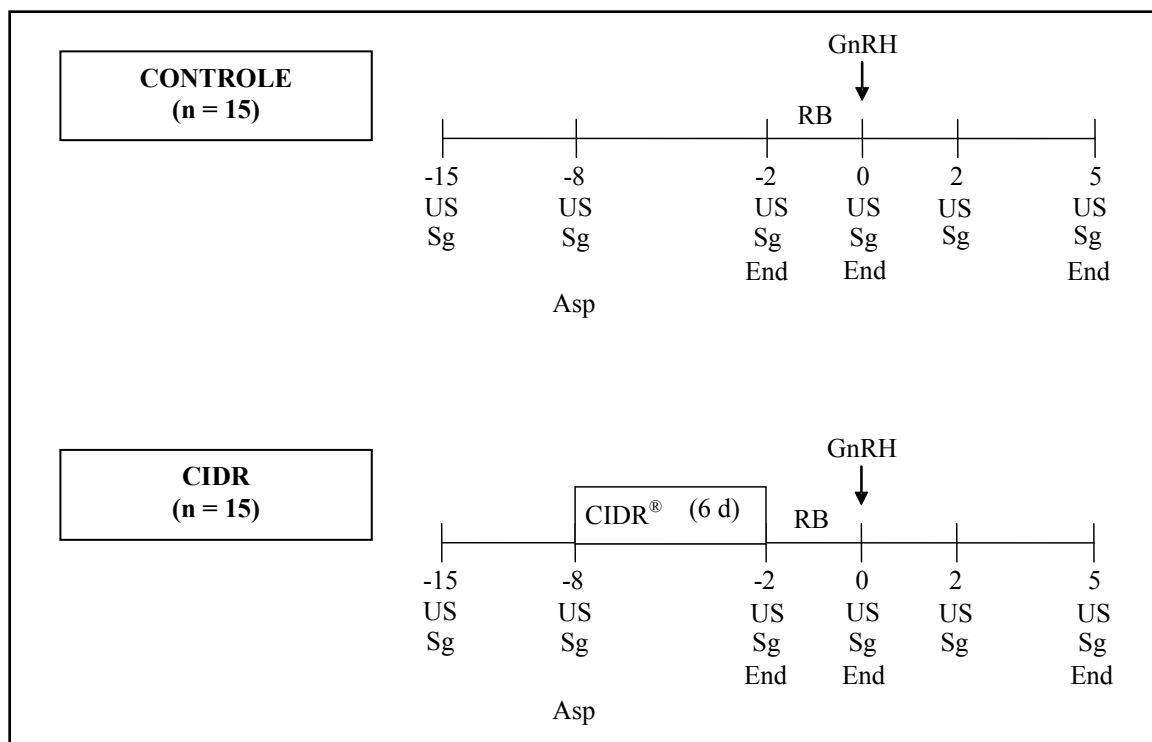


Figura 4: Diagrama esquemático do delineamento experimental. US: Ultrassonografia das estruturas ovarianas; Sg: Colheita de sangue; End: Colheita de tecido endometrial; Asp: Aspiração guiada por ultrassom dos folículos ovarianos ≥ 6 mm; CIDR®: Dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de progesterona; RB: Remoção de bezerras (48 horas).

2.8. Análise estatística

As variáveis dependentes foram analisadas pelo procedimento GLM do programa SAS. Para cada variável, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Quando os dados não obedeceram às premissas para a análise, foram submetidos à transformação logarítmica ou inversa e re-analisados. As médias ajustadas foram re-expressas na escala original.

Para a análise das variáveis dependentes diâmetro folicular no Dia -2, diâmetro folicular no Dia 0, concentração sérica de E2 no Dia -2, concentração sérica de E2 no Dia 0, diâmetro do CL no Dia 5, concentração sérica de P4 no Dia 2 e concentração sérica de P4 no Dia 5, o modelo incluiu os efeitos de tratamento e escore de condição corporal (covariável). Para a análise das variáveis dependentes relacionadas à morfometria uterina (altura das células epiteliais luminais, altura das células epiteliais glandulares superficiais, altura das células epiteliais glandulares profundas, área endometrial percentual, densidade de ductos glandulares, perímetro dos ductos glandulares, área ocupado por ductos glandulares por unidade de área endometrial, área ocupado por ductos glandulares por unidade de área total de tecido uterino), ER (porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração), PR (porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração) e expressão gênica (ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2), o modelo incluiu os efeitos de tratamento, dia, interação entre tratamento e dia, e escore de condição corporal (covariável).

As médias gerais foram desdobradas e comparadas somente quando detectado efeito ou tendência a efeito de pelo menos uma das variáveis incluídas nos modelos.

Quando detectado efeito de dia, as médias foram comparadas pelo teste t. Quando detectada interação entre tratamento e dia, as médias foram comparadas por contrastes ortogonais considerando os efeitos de dia dentro de cada tratamento e de tratamento dentro de cada dia. Considerou-se significância quando $P < 0,05$ e tendência a significância quando $0,1 > P \geq 0,05$.

3. Resultados e discussão

As variáveis contínuas descritas a seguir estão expressas como média dos quadrados mínimos \pm EPM.

3.1. Esteróides e estruturas ovarianas

A concentração sérica de P4 no Dia -2 foi superior nas vacas do tratamento CIDR em relação às do tratamento CONTROLE (3,77 ng/mL vs. 0,32 ng/mL; EPM = 0,24; $P < 0,01$). A concentração circulante de P4 observada nas vacas do tratamento CIDR é próxima à relatada por Meneghetti et al. (2009) no nono dia de tratamento com CIDR[®] em vacas *Bos indicus* em anestro, os quais observaram 3,02 ng/mL. Entretanto, não houve efeito de tratamento no diâmetro folicular nos Dias -2 ($9,47 \pm 0,33$ mm) e 0 ($10,94 \pm 0,30$ mm), nas concentrações séricas de E2 nos Dias -2 ($1,11 \pm 0,58$ pg/mL) e 0 ($3,05 \pm 0,82$ pg/mL), no diâmetro do CL no Dia 5 ($14,37 \pm 1,01$ mm), e nas concentrações séricas de P4 nos Dias 2 ($0,36 \pm 0,07$ ng/mL) e 5 ($1,31 \pm 0,13$ ng/mL), concordando com um estudo prévio em vacas *Bos indicus* realizado no Brasil (SÁ FILHO et al., 2009a), em que o pré-tratamento com P4 não alterou essas variáveis. A ausência de efeito do pré-tratamento com P4 no

desenvolvimento folicular observada no Experimento 2 e no estudo de Sá Filho et al. (2009a) contradiz relatos em vacas *Bos taurus* em anestro de que o pré-tratamento com progestágenos resultou em maior crescimento folicular e secreção pré-ovulatória de estradiol (GARCIA-WINDER et al., 1986; GARCIA-WINDER et al., 1987; INSKEEP et al., 1988; RHODES et al., 2002). Esses autores sugeriram que o tratamento com progestágenos em vacas em anestro aumenta a expressão de receptores de LH nas células foliculares, potencializando os efeitos dessa gonadotrofina, e eleva a frequência de secreção de LH pela hipófise, possivelmente por minimizar a retroalimentação negativa do E2 na secreção de GnRH, como demonstraram Day & Anderson (1998).

Para que haja estímulo à secreção pulsátil de LH é necessário que as concentrações circulantes de P4 estejam entre 1 e 2 ng/mL (STOCK & FORTUNE, 1993). No Experimento 2, utilizaram-se dispositivos intravaginais que fornecem, nos primeiros seis dias após inserção, concentrações circulantes de P4 sempre acima de 2,5 ng/mL (SANTOS et al., 2004) e isso, portanto, pode explicar a similaridade nos diâmetros foliculares e nas concentrações séricas de E2 nos Dias -2 e 0 entre vacas pré-tratadas ou não com CIDR[®]. Outra importante possibilidade a ser considerada é que ambos os tratamentos do Experimento 2 foram associados à remoção de bezerros, com o intuito de maximizar o desenvolvimento folicular e a probabilidade de ovulação (SÁ FILHO et al., 2009b), enquanto nos trabalhos em *Bos taurus*, os efeitos do pré-tratamento com P4 no desenvolvimento folicular foram estudados em vacas com presença de bezerro. É possível, portanto, que o estímulo gonadotrófico gerado pela remoção de bezerros nas vacas do Experimento 2 tenha permitido que folículos de fêmeas pré-tratadas ou não com P4

atingissem diâmetros e produção de E2 semelhantes. Mesmo assim, é importante ressaltar que o diâmetro folicular e a concentração sérica de E2 no Dia -2, quando ainda não havia se iniciado a remoção de bezerros, foram semelhantes entre os tratamentos, indicando que a P4 realmente não exerceu efeito positivo no desenvolvimento folicular como foi demonstrado em vacas *Bos taurus*.

Mann & Lamming (2000), utilizando vacas *Bos taurus* ovariectomizadas, sugeriram que a prevenção da secreção prematura de PGF2 α pela pré-exposição à P4 seria por um efeito indireto, devido à maior secreção folicular de E2 e, conseqüentemente, maior inibição dos OTR endometriais. Entretanto, Sá Filho et al. (2009a) estudando vacas em anestro pré-tratadas ou não com P4 verificaram que, apesar da ausência de efeito no desenvolvimento folicular e na secreção pré-ovulatória de E2, o tratamento com P4 foi altamente eficiente em prevenir luteólise prematura. Adicionalmente, o fato de que no Experimento 2 não houve efeito do tratamento com P4 no desenvolvimento folicular e luteal subsequente é mais um indicativo de que a hipótese proposta por Mann & Lamming (2000) não se aplica a vacas intactas.

3.2. Aspectos moleculares relacionados à luteólise

Observou-se interação entre tratamento e dia nas expressões gênicas de ER ($P < 0,05$; Figura 5), OTR ($P < 0,05$; Figura 6) e COX-2 ($P < 0,05$; Figura 7), porém não foram observados efeitos de tratamento, dia ou interação entre tratamento e dia nas expressões gênicas de PR ($5,52 \pm 1,37$) e COX-1 ($2,46 \pm 0,35$).

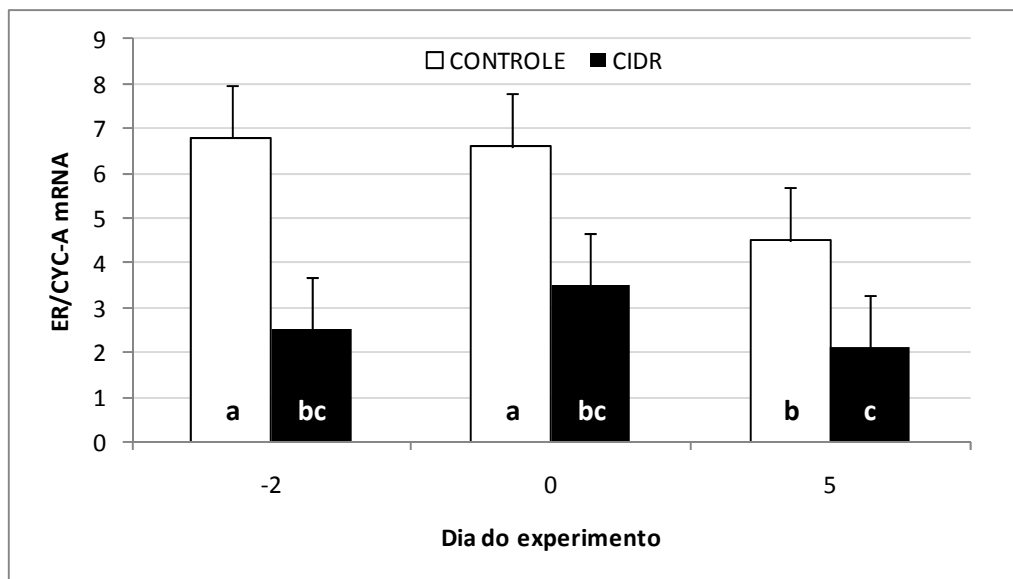


Figura 5: Expressão gênica de receptores endometriais de estradiol subtipo α (ER) relativa ao gene constitutivo ciclofilina A (CYC-A; média dos quadrados mínimos \pm EPM), quantificada por RT-PCR em tempo real, em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

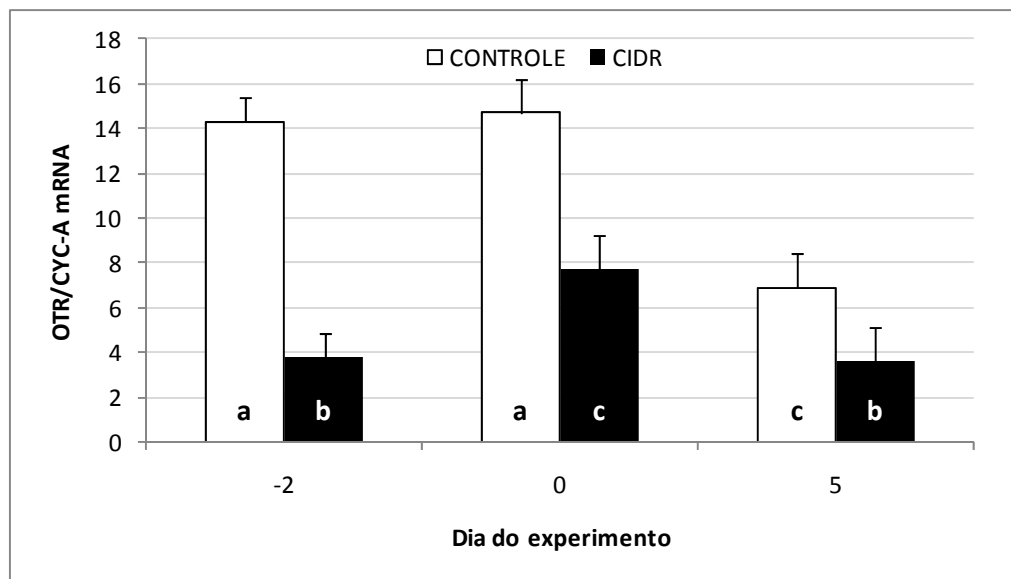


Figura 6: Expressão gênica de receptores endometriais de ocitocina (OTR) relativa ao gene constitutivo ciclofilina A (CYC-A; média dos quadrados mínimos \pm EPM), quantificada por RT-PCR em tempo real, em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

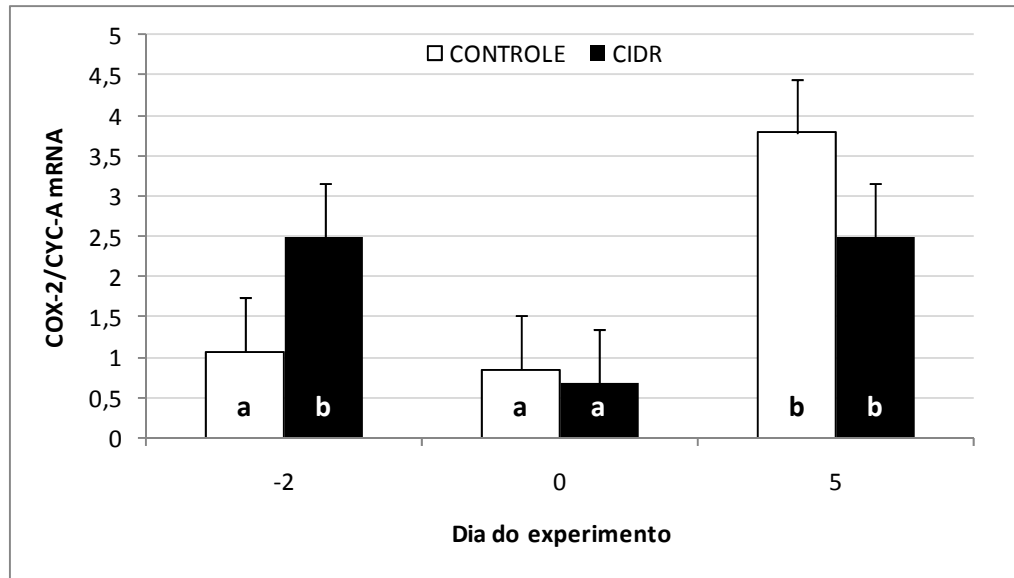


Figura 7: Expressão gênica endometrial da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) relativa ao gene constitutivo ciclofilina A (CYC-A; média dos quadrados mínimos \pm EPM), quantificada por RT-PCR em tempo real, em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

A intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no epitélio glandular superficial foi influenciada por dia, sendo menor no Dia -2 em relação aos Dias 0 e 5 (Dia -2: 82,36; Dia 0: 91,47; Dia 5: 89,98; EPM = 3,62; $P < 0,05$), e por tratamento (CONTROLE: 93,29; CIDR: 82,59; EPM = 2,92; $P < 0,05$). Verificou-se efeito de tratamento ($P < 0,05$) na porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial superficial (CONTROLE: 95,58; CIDR: 77,62; EPM = 3,59) e no estroma subepitelial profundo (CONTROLE: 87,98; CIDR: 63,06; EPM = 2,92). Houve interação entre dia e tratamento na intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no epitélio luminal ($P < 0,05$; Figura 8), estroma subepitelial superficial ($P < 0,05$; Figura 9) e estroma subepitelial profundo ($P < 0,05$; Figura 10). Não foram observados efeitos de tratamento,

dia ou interação entre tratamento e dia nas variáveis dependentes porcentagem de núcleos positivos para ER no epitélio luminal ($89,25 \pm 5,67\%$), epitélio glandular superficial ($93,32 \pm 1,92$) e epitélio glandular profundo ($91,76 \pm 3,41$) e na intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no epitélio glandular profundo ($94,11 \pm 3,96$ UA).

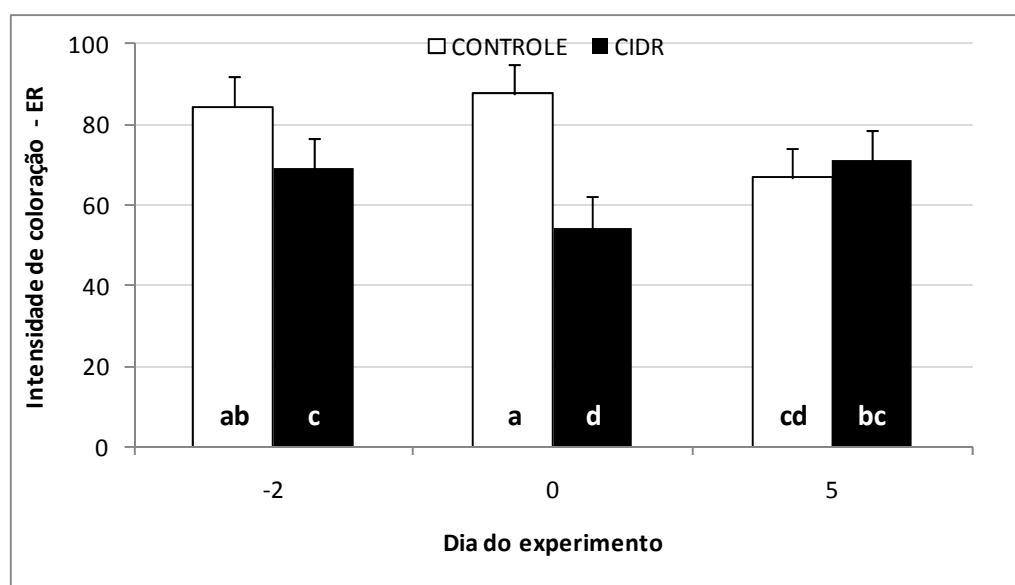


Figura 8: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α em células endometriais epiteliais luminais (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

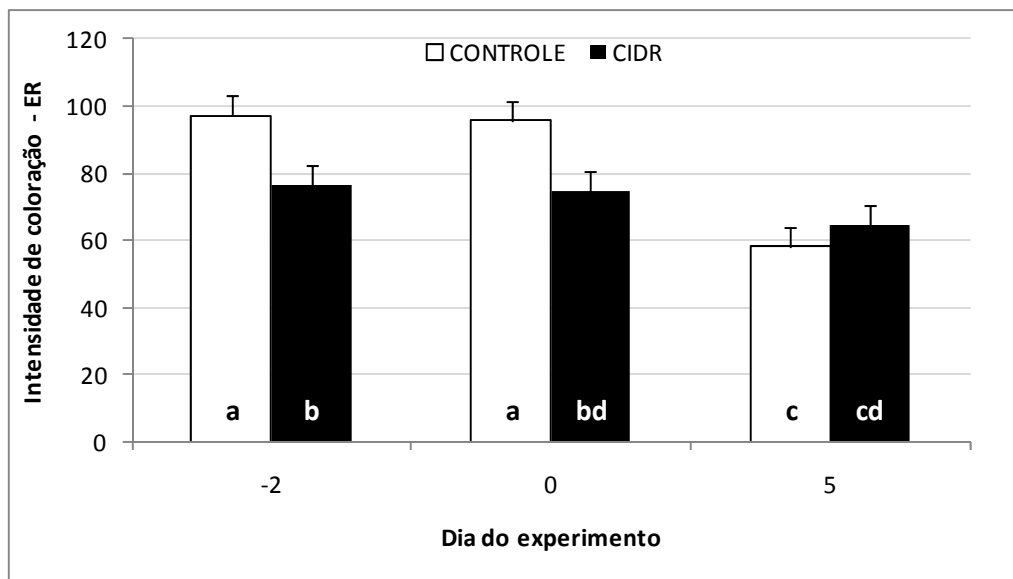


Figura 9: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α no estroma subepitelial uterino superficial (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

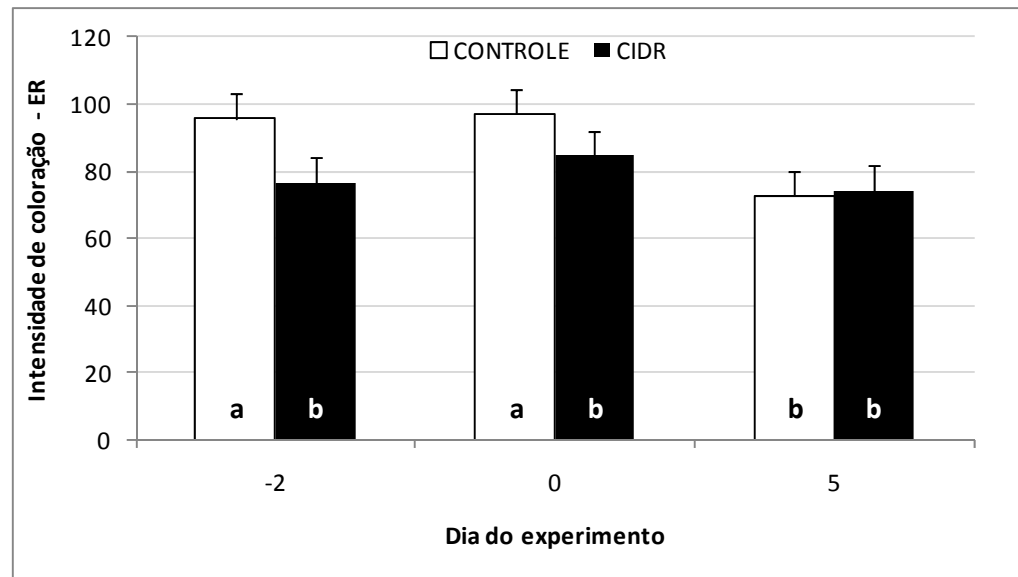


Figura 10: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α no estroma subepitelial uterino profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

Os resultados do presente experimento, associados aos resultados do Experimento 1, indicam que, de maneira geral, as expressões gênicas de ER e OTR e a expressão protéica de ER encontram-se elevadas nas vacas durante o anestro, e que o tratamento com P4 reduziu essas expressões não somente nos Dias -2 e 0, mas também no Dia 5. Os presentes estudos não apresentaram tratamentos com vacas cíclicas, porém o fato de que o tratamento com P4, de forma geral, reduziu significativamente a expressão de ER e OTR indica que provavelmente essas expressões são menores na vaca cíclica durante a fase luteal em relação às vacas em anestro, devido ao efeito de P4 endógena. Discordando dos resultados observados no presente experimento, o tratamento com dispositivo intravaginal de P4 não alterou a concentração de OTR no endométrio de vacas ovariectomizadas

(LAMMING & MANN, 1995a). É possível que fatores ovarianos além da P4 possam influenciar a regulação dos receptores endometriais relacionados à luteólise, o que explicaria as diferenças entre os resultados do presente experimento e os de Lamming & Mann (1995a). Por exemplo, Wathes et al. (1996) relataram diferenças na resposta ao tratamento com P4 entre ovelhas ovariectomizadas e cíclicas, sendo que nos animais ovariectomizados o tratamento com P4 não diminuiu a expressão de ER, ao contrário do que ocorre em ovelhas cíclicas. A maioria dos estudos, no entanto, apresentou resultados que corroboram os encontrados na presente tese. Robinson et al. (2001) encontraram redução nas expressões de ER e OTR em vacas cíclicas no decorrer da fase luteal, sendo que os OTR apresentaram-se em níveis indetectáveis a partir da metade do ciclo estral, e Horn et al. (1997) observaram que a expressão gênica endometrial de OTR em bovinos no momento do estro é maior que no sétimo dia do ciclo estral. Em ovinos, explantes de células endometriais cultivadas em meio livre de esteróides apresentam elevação significativa e espontânea das expressões gênica e protéica de OTR, mesmo quando a expressão de OTR *in vivo* encontrava-se em níveis muito baixos no momento da colheita (SHELDRIK et al., 1993; LEUNG & WATHES, 1999; LEUNG & WATHES, 2000). Em novilhas pré-púberes, a expressão uterina de OTR é maior em relação ao observado em novilhas cíclicas durante a fase luteal e equivalente aos níveis observados durante o estro (FUCHS et al., 1998). Esses dados, portanto, indicam que a P4 provavelmente exerce função constantemente reguladora inibitória sobre ER e OTR, de forma que a sua ausência pode permitir que eles se expressem intensamente.

A porcentagem de núcleos positivos para PR no epitélio glandular profundo foi influenciada por tratamento (CONTROLE: 91,07; CIDR: 95,09; EPM = 1,24; $P < 0,05$). A intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no epitélio luminal foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 68,37; Dia 0: 68,54; Dia 5: 87,02; EPM = 7,36; $P < 0,05$), e por tratamento (CONTROLE: 88,49; CIDR: 60,80; EPM = 5,95; $P < 0,05$). A porcentagem de núcleos positivos para PR no estroma subepitelial profundo foi influenciada por dia, sendo menor no Dia -2 em relação ao Dia 0 (Dia -2: 56,81%; Dia 0: 69,90%; Dia 5: 65,69%; EPM = 6,26; $P < 0,05$), e por tratamento (CONTROLE: 53,00; CIDR: 75,26; EPM = 5,07; $P < 0,05$). Houve interação entre dia e tratamento na porcentagem de núcleos positivos para PR no estroma subepitelial superficial ($P < 0,05$; Figura 11) e na intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no epitélio glandular profundo ($P < 0,05$; Figura 12), estroma subepitelial superficial ($P < 0,05$; Figura 13) e estroma subepitelial profundo ($P < 0,05$; Figura 14). Não foram observados efeitos de tratamento, dia ou interação entre tratamento e dia nas variáveis dependentes porcentagem de núcleos positivos para PR no epitélio luminal ($87,94 \pm 6,47\%$) e epitélio glandular superficial ($89,65 \pm 4,24\%$) e na intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no epitélio glandular superficial ($91,54 \pm 2,97$ UA).

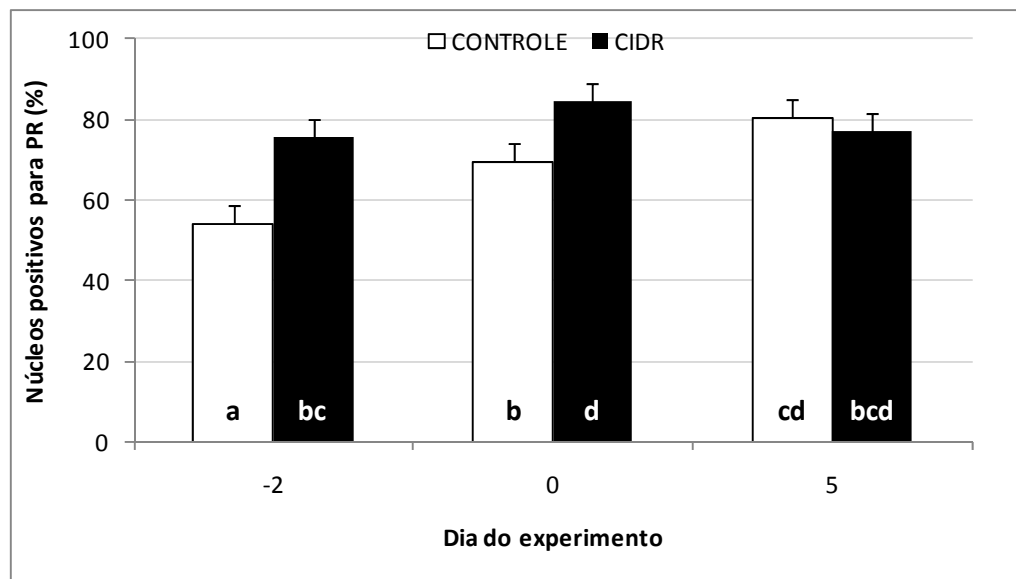


Figura 11: Porcentagem de núcleos com imunomarcção positiva para receptor de progesterona no estroma subepitelial superficial (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

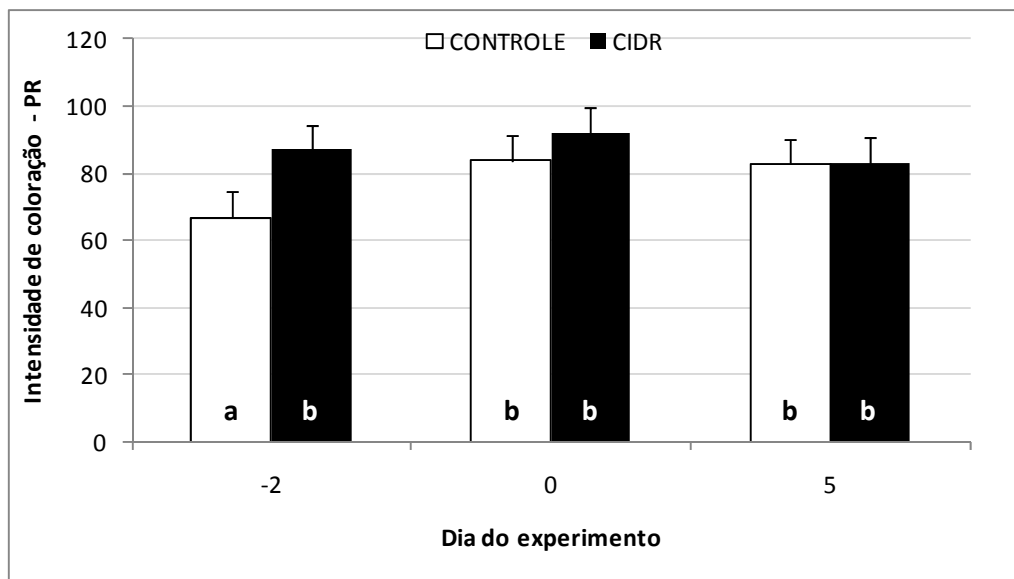


Figura 12: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de progesterona em células endometriais epiteliais glandulares profundas (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

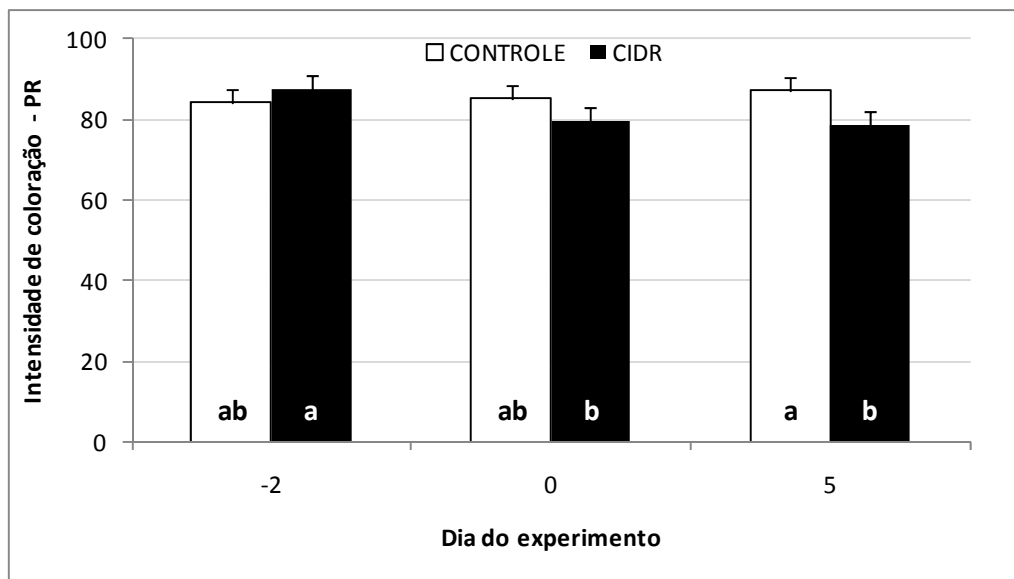


Figura 13: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de progesterona no estroma subepitelial superficial (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

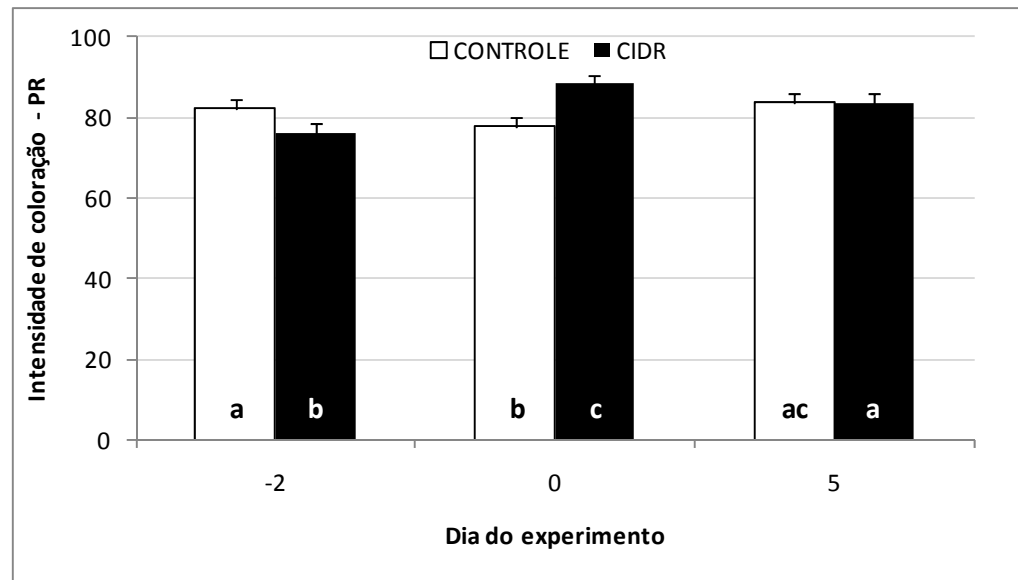


Figura 14: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de progesterona no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

Apesar de não terem sido observados efeitos de tratamento na expressão gênica de PR, a expressão protéica de PR em algumas regiões foi maior nas vacas do tratamento CIDR. Em um estudo com vacas intactas em anestro, Zollers et al. (1993) sugeriram que a pré-exposição à P4 maximiza a inibição dos OTR pela P4 na fase luteal inicial reduzindo, portanto, a responsividade uterina à OT. Nesse estudo, os animais em anestro pré-tratados com norgestomet e induzidos a ovular (Dia 0) apresentaram menor concentração de OTR e maior concentração de PR no endométrio no Dia 5 em relação aos que foram induzidos a ovular sem tratamento com progestágenos, resultados que parcialmente corroboram os obtidos no presente experimento. Concordando com esses achados, Beard & Hunter (1994) observaram que a velocidade de redução na concentração endometrial de OTR é maior

quando ovelhas em anestro são pré-tratadas com P4. Em vacas cíclicas, animais com maiores concentrações circulantes de P4 em um ciclo estral secretaram menos PGF2 α após desafio com OT no final do ciclo subsequente (SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001). Dessa forma, concentrações circulantes insuficientes de P4 no período prévio à ovulação pode reduzir a habilidade da P4 em inibir a expressão de OTR no ciclo estral subsequente (MCCRACKEN et al., 1984; VALLET et al., 1990; HUNTER, 1991; GARVERICK et al., 1992) e/ou tornar os animais mais sensíveis ao subsequente efeito estimulatório do E2 nos mecanismos luteolíticos (HUNTER, 1991; BEARD & HUNTER, 1994). Os resultados do presente experimento, portanto, corroboram diversos relatos da literatura sobre a hipótese de que a P4 apresenta uma forte influência inibitória na luteólise. Os mecanismos moleculares relacionados a esse efeito ainda não estão compreendidos, mas já foram descritas diversas formas de atuação da P4 no tecido endometrial.

Em animais cíclicos, o E2 pré-ovulatório estimula a expressão da PR no útero no início da fase luteal (OTTOBRE et al., 1984). O fato de que no presente experimento a expressão protéica de PR foi maior nas vacas do tratamento CIDR em relação às vacas do tratamento CONTROLE em diversos momentos indica que a P4 pode induzir a expressão de seus próprios receptores ou ainda que a exposição à P4 seja necessária para que o E2 possa exercer essa ação potencialmente desfavorável à luteólise prematura. Em células tumorais de mama humana, a P4 reduziu as expressões gênica e protéica de ER, provavelmente devido a uma inibição na transcrição do gene de ER, uma vez que o efeito se deu rapidamente e sem redução na meia-vida do mRNA de ER (READ et al., 1989; ALEXANDER et al., 1990). Concordando com esses autores, o tratamento com CIDR

reduziu não só a expressão gênica de ER nos Dias -2, 0 e 5, mas também influenciou negativamente a expressão protéica de ER em algumas regiões endometriais, independente de dia. Além dos efeitos inibitórios da própria P4, é possível também que os PR inibam os efeitos do E2 após sua ligação com os ER, pois diversos estudos indicam que a molécula de PR pode seqüestrar fatores de transcrição essenciais às ações moleculares do E2 (CHALBOS & GALTIER, 1994; MCDONNELL & GOLDMAN, 1994; SAVOURET et al., 1994; WEN et al., 1994; KRAUS et al., 1995).

Apesar dos possíveis efeitos da P4 sobre ER e PR, a maior parte da literatura atual se refere a efeitos sobre OTR. Em ovelhas, Vallet et al. (1990) verificaram que a exposição à P4 inibiu a síntese de OTR no endométrio. De fato, no presente experimento, a pré-exposição à P4 reduziu significativamente a expressão gênica da OTR não somente nos primeiros dias que sucederam o fim do tratamento (Dias -2 e 0) mas também no Dia 5. Contrariando esses resultados, entretanto, o tratamento com P4 causou redução marcante na expressão de OTR em fêmeas murinas ovariectomizadas sem, no entanto, alterar a expressão gênica desse receptor (ZINGG et al., 1998). Esse e outro relato semelhante (SOLOFF et al., 1983) indicam que a P4 pode inibir a expressão de OTR na membrana das células endometriais também através de mecanismos não genômicos. Interessantemente, em células endometriais cultivadas dissociadamente, Horn et al. (1998) não observaram efeitos da P4 na expressão de OTR. Entretanto, os efeitos do esteróide foram observados quando a integridade do tecido endometrial foi mantida, através do sistema de cultura de explante, indicando que algum fator presente na matriz extracelular influenciado por esteróides pode participar da regulação dos OTR (LEUNG et al., 1998). Além de efeitos

diretos e indiretos sobre as expressões de ER, PR e OTR no endométrio, é possível também que a P4 tenha capacidade de se ligar diretamente aos OTR. Grazzini et al. (1998) observaram, em células murinas *in vitro*, que a P4 se liga inespecificamente aos OTR com alta afinidade, bloqueando-os e inibindo sua função. Os autores verificaram ainda que a 5 β -pregnano-3,20-diona, um metabólito da P4, exerce o mesmo efeito sobre células humanas. Em explantes endometriais de ovelhas, observou-se o mesmo efeito, de forma que o tratamento com P4 reduziu a atividade de ligação dos OTR (SHELDRIK & FLICK-SMITH, 1993).

A ausência de efeitos de tratamento, dia ou interação entre tratamento e dia na expressão gênica de COX-1 indica que essa enzima não é a principal responsável pelo desencadeamento da luteólise prematura. Entretanto, a maior expressão gênica da enzima COX-2 no Dia -2 nas vacas do tratamento CIDR indica que a P4 influencia positivamente a transcrição dessa enzima. Em um estudo com vacas ovariectomizadas, Lamming & Mann (1995b) realizaram tratamento com P4 (dispositivo intravaginal entre os dias experimentais -15 e -1) e E2 (6 injeções com intervalos de 8 h, entre os dias experimentais -1 e 1) e não verificaram secreção de PGF2 α em resposta ao desafio com OT quando o mesmo foi realizado antes do tratamento com P4. Quando realizaram o desafio com OT após pré-exposição à P4 (dia experimental -2) houve elevada secreção de PGF2 α . Essa resposta, no entanto, foi reduzida significativamente no dia experimental 1, e no dia 4 não houve resposta significativa à OT. Além do efeito na expressão gênica da enzima COX-2, em ovelhas verificou-se que a atividade da enzima PG sintase é induzida pela P4 (SALAMONSEN et al., 1991). Enquanto a P4 apresenta efeito positivo sobre a expressão

da COX-2, o E2 parece ter efeito oposto pois, no presente experimento, a expressão gênica dessa enzima foi menor no Dia 0 em relação aos Dias -2 e 5. Essa diferença pode ter ocorrido pelo fato de que nos Dias -2 e 5 as concentrações circulantes de P4 eram superiores, como discutido acima, mas um provável efeito inibitório do E2 não pode ser descartado, uma vez que células epiteliais endometriais bovinas tratadas com E2 apresentaram redução na expressão gênica da enzima COX-2 (XIAO et al., 1998). A ausência de efeito de tratamentos na expressão gênica da enzima COX-2 no Dia 5, no entanto, indica que essa enzima não deve ter impacto significativo na causa da luteólise prematura, assim como foi verificado para a COX-1.

3.3. Histomorfometria uterina

A altura das células epiteliais luminais foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 5 em relação ao Dia 0 e no Dia 0 em relação ao Dia -2 (Dia -2: 28,29 μm ; Dia 0: 33,49 μm ; Dia 5: 38,44 μm ; EPM = 1,93; $P < 0,05$), e por tratamento (CONTROLE: 30,03 μm ; CIDR: 36,78 μm ; EPM = 1,61; $P < 0,05$). A altura das células epiteliais glandulares superficiais foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 30,52 μm ; Dia 0: 31,45 μm ; Dia 5: 39,65 μm ; EPM = 2,55; $P < 0,05$). A densidade de ductos glandulares foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 20,37 ductos/ mm^2 ; Dia 0: 24,89 ductos/ mm^2 ; Dia 5: 38,42 ductos/ mm^2 ; EPM = 3,54; $P < 0,05$). O perímetro médio dos ductos glandulares superficiais foi influenciado por dia, sendo maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 270,99 μm ; Dia 0: 274,56 μm ; Dia 5: 348,76 μm ; EPM = 14,47; $P < 0,05$). A área glandular em relação à área

endometrial foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 13,66%; Dia 0: 12,92%; Dia 5: 29,21%; EPM = 3,18; $P < 0,05$), e tendeu a ser influenciada por tratamento (CONTROLE: 15,94%; CIDR: 21,26%; EPM = 2,70; $P < 0,1$). A área glandular em relação à área uterina total foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 5,34%; Dia 0: 6,59%; Dia 5: 11,61%; EPM = 1,52; $P < 0,05$), e por tratamento (CONTROLE: 6,38%; CIDR: 9,32%; EPM = 1,24; $P < 0,05$). Houve interação entre dia e tratamento na altura das células epiteliais glandulares profundas ($P < 0,05$; Figura 15), na área endometrial percentual ($P < 0,05$; Figura 16) e no perímetro médio dos ductos glandulares profundos ($P < 0,05$; Figura 17), os quais foram maiores nas vacas do tratamento CIDR em relação às vacas do tratamento CONTROLE nos Dias -2 e 0 porém, similar entre os tratamentos no Dia 5.

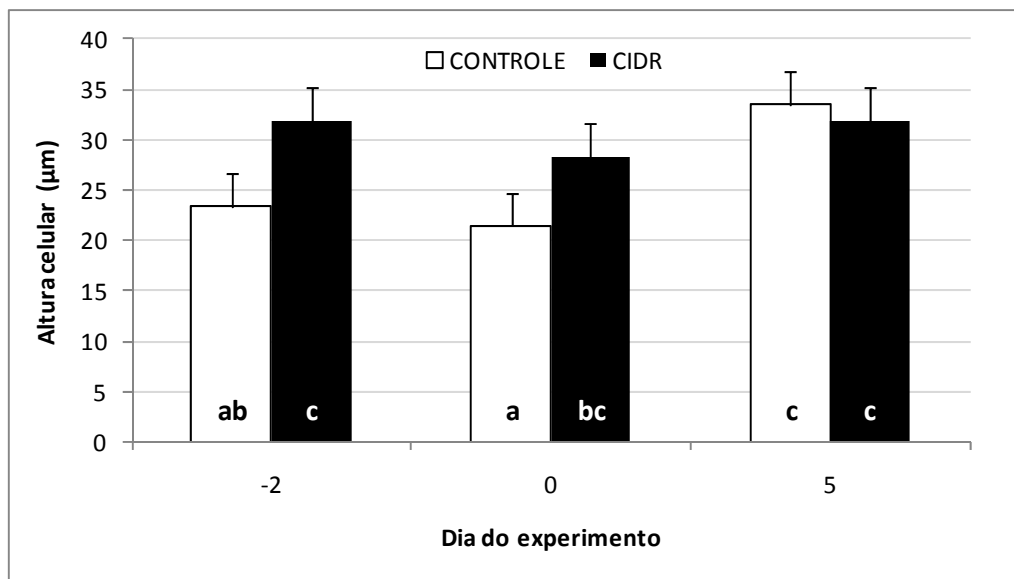


Figura 15: Altura das células endometriais epiteliais glandulares profundas (média dos quadrados mínimos \pm EPM) em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

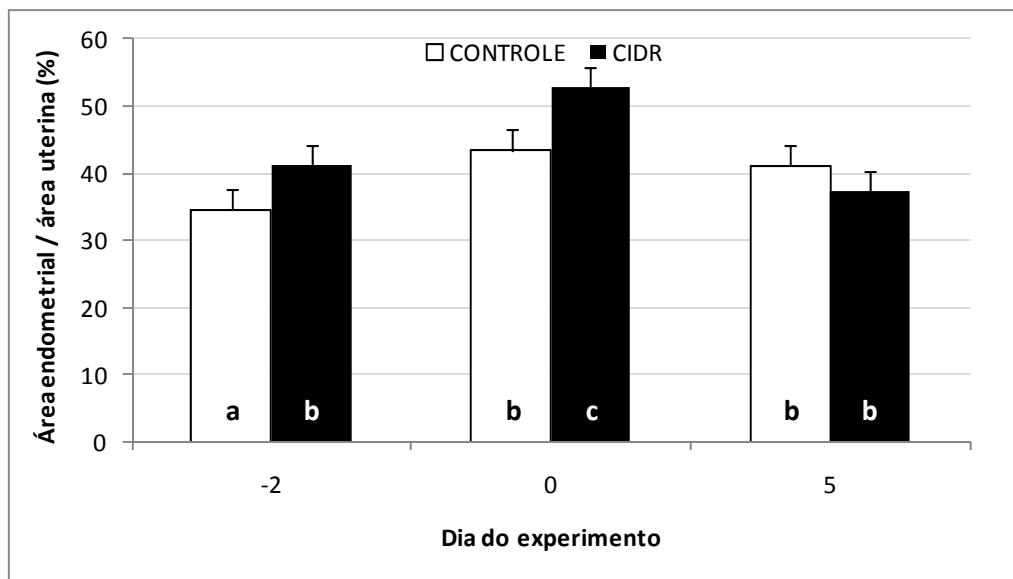


Figura 16: Área endometrial em relação à área uterina (média dos quadrados mínimos \pm EPM) em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

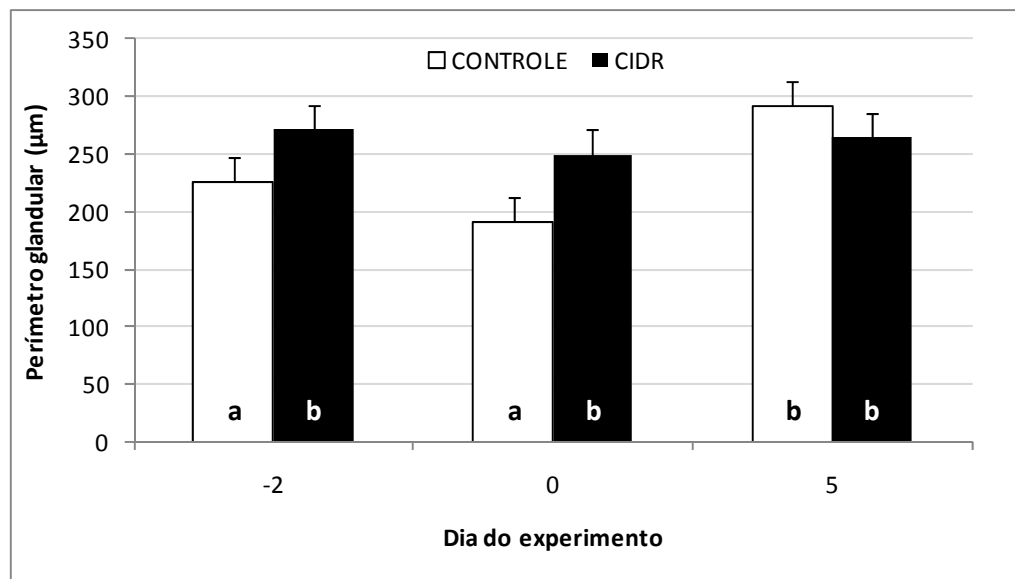


Figura 17: Perímetro dos ductos glandulares endometriais profundos (média dos quadrados mínimos \pm EPM) em vacas Nelore tratadas (CIDR) ou não (CONTROLE) com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

Trabalhos com ovelhas realizados por Moore (1985) e Wilmut et al. (1986) mostraram que três estágios de exposição esteroidal são necessários para o desenvolvimento de um ambiente uterino favorável à concepção. A primeira é a fase de exposição à P4 imediatamente antes do estro, seguindo-se uma fase de concentrações crescentes de E2 no estro e, finalmente, a manutenção de concentrações de P4 suficientes no ciclo estral subsequente. Na vaca cíclica, o endométrio apresenta uma fase proliferativa durante o proestro e estro, resultante da ação do E2 circulante em ambiente de baixa concentração de P4, e uma fase secretória durante a fase luteal, resultante da ação da P4 (GRAY et al., 2001). Durante a fase proliferativa, há um aumento na frequência de mitoses nas células epiteliais e do estroma, as células epiteliais adquirem cílios e as glândulas

endometriais ramificam-se progressivamente até o início da fase secretória, quando as células glandulares acumulam vacúolos repletos de material secretório na região basal. Em seguida, o material secretório se encontra na região apical dessas células e no lúmen das glândulas (WANG et al., 2007).

De forma geral, os efeitos de dia e de tratamento observados no presente experimento corroboram as hipóteses de que a seqüência de exposição esteroideal é essencial ao adequado desenvolvimento endometrial e de que a pré-exposição à P4 potencializa o efeito do E2 na proliferação tecidual endometrial. Entretanto, a ausência de efeitos de tratamentos na altura das células epiteliais luminais e glandulares superficiais, na densidade de ductos glandulares, no perímetro das glândulas endometriais superficiais e na área glandular em relação à área uterina indica que em algumas regiões endometriais é possível a proliferação tecidual mesmo sem pré-exposição à P4. O efeito positivo observado do tratamento com P4 no desenvolvimento das glândulas endometriais profundas difere de estudos prévios em ovelhas intactas cíclicas, prenhes e ovariectomizadas (JOHNSON et al., 1997a,b; ZHENG et al., 1996), nos quais os efeitos dos esteróides ovarianos na proliferação celular endometrial ocorreram de forma mais intensa nas regiões próximas ao lúmen uterino. Essa diferença pode ser devido a particularidades de cada espécie, apesar de bovinos e ovinos apresentarem diversas semelhanças no tocante à fisiologia reprodutiva, ou ainda a diferenças entre animais em anestro, animais cíclicos e animais castrados.

Em estudo prévio (JOHNSON et al., 1997a), ovelhas ovariectomizadas tratadas com P4 e E2 apresentaram células maiores e com maiores proporções RNA:DNA e

proteína:DNA em relação a ovelhas tratadas apenas com E2. De forma semelhante, em ovelhas cíclicas, as concentrações circulantes de P4 e E2 promoveram hipertrofia celular, elevando o peso uterino (JOHNSON et al., 1997b). Esses dados em conjunto levaram os autores a sugerir que, em ovelhas, a P4 eleva a sensibilidade dos tecidos uterinos ao E2. Interessantemente, a redução na expressão endometrial de ER observada nas vacas do tratamento CIDR indica que se, nos bovinos, a P4 também eleva a sensibilidade dos tecidos uterinos ao E2, o mecanismo provavelmente envolve maximização dos efeitos pós-ligação E2-ER. Outro achado interessante do Experimento 2 refere-se ao fato de que, independente de tratamento, as alterações temporais observadas na altura das células ocorreram principalmente nas regiões mais próximas ao lúmen uterino. Essa observação indica que a exposição ao E2 seguida por exposição à P4 pode afetar diferentemente células endometriais de acordo com sua localização e requer estudos adicionais, uma vez que há poucos relatos sobre o assunto. Wang et al. (2007), avaliando vacas intactas cíclicas, observaram que a concentração circulante de P4 relacionou-se à redução de tamanho e condensação glandular de forma mais intensa na região profunda em relação à superficial. Dentre as variáveis avaliadas no Experimento 2, as que podem ter alguma relação com essas observações são a menor intensidade de coloração nos núcleos positivos para ER no Dia -2 em relação aos Dias 0 e 5 e a maior intensidade de coloração nos núcleos positivos para PR nos Dias -2 e 0 em relação ao Dia 5.

Apesar da possibilidade de que algumas regiões endometriais se desenvolvem normalmente mesmo sem pré-exposição à P4, os resultados do Experimento 2 evidenciaram que a suplementação com P4 em vacas em anestro promoveu alterações

proliferativas potencialmente importantes para que o endométrio tenha capacidade secretória adequada à manutenção da gestação. Os diversos e complexos mecanismos de ação da P4 ainda não são compreendidos, entretanto é bastante evidente que a P4 pode estimular ou inibir a proliferação celular no útero dependendo do tipo celular ou contexto fisiológico (GRAHAM & CLARKE, 1997). Os efeitos da P4 nas funções celulares incluem estímulo à glicogênese (DEMERS et al., 1977; SHAPIRO et al., 1980), metabolismo cíclico de nucleotídeos (SAVOURET et al., 1990), síntese e eliminação de proteínas (SAVOURET et al., 1990) e regulação do ciclo celular (CLARKE & SUTHERLAND, 1990). Essas observações, adicionadas aos resultados dos Experimentos 1 e 2, indicam que a pré-exposição à P4 é essencial à concepção não só porque previne a luteólise prematura, mas também porque pode auxiliar na preparação do útero para a gestação. Isso implica que estratégias alternativas à P4 podem resultar em baixas taxas de concepção, mesmo sendo eficazes em prevenir a luteólise prematura, se não promoverem as alterações adequadas no endométrio. A busca por alternativas à P4 em programas de indução de ciclicidade de fêmeas bovinas deve, portanto, considerar mais essa variável, o que pode inviabilizá-las.

4. Conclusões

De acordo com os resultados do presente experimento, conclui-se que, em vacas em anestro pós-parto:

- o tratamento com dispositivo intravaginal de P4 antes da indução da ovulação causou alterações proliferativas no endométrio, potencialmente melhorando sua capacidade secretória no início da fase luteal;
- o tratamento com dispositivo intravaginal de P4 antes da indução da ovulação reduziu a expressão gênica de ER e OTR;
- o tratamento com dispositivo intravaginal de P4 antes da indução da ovulação reduziu a expressão protéica de ER e aumentou a expressão de PR em algumas regiões endometriais, potencialmente reduzindo a capacidade de secreção de PGF2 α no início da fase luteal.

Os dados dos Experimentos 1 e 2 em conjunto indicam que as expressões gênicas de ER, PR e OTR e as expressões protéicas de ER e PR encontram-se elevadas durante a condição de anestro, possivelmente devido às baixas concentrações circulantes de esteróides ovarianos. É provável, portanto, que na vaca em anestro as expressões dessas proteínas sejam superiores às observados na vaca cíclica.

CAPÍTULO 4

**EXPERIMENTO 3: EFEITO DO DIÂMETRO FOLICULAR NAS
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E MOLECULARES UTERINAS DE
VACAS NELORE EM ANESTRO PÓS-PARTO TRATADAS COM
PROGESTERONA**

Resumo. O objetivo desse experimento foi avaliar os efeitos do diâmetro folicular na histomorfometria uterina, expressão gênica endometrial de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2, e na expressão protéica de ER e PR (porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração dos núcleos positivos, em unidades arbitrárias [UA], à imunohistoquímica) em vacas em anestro submetidas à indução de ovulação após tratamento com P4. Vacas Nelore primíparas em anestro pós-parto receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de P4 entre os dias -8 e -2, RB entre os Dias -2 e 0 (48 h) e GnRH no Dia 0. Os tratamentos consistiram em aspiração guiada por ultrassom dos folículos ovarianos ≥ 6 mm no Dia -8 (FG; n = 15) ou no Dia -6 (FP; n = 15). Dentro de cada tratamento, as vacas foram aleatoriamente distribuídas para serem submetidas à histerectomia no Dia -2, 0 ou 5 (n = 5/tratamento/dia). Os dados foram analisados pelo PROC GLM do programa SAS. Em relação às vacas do tratamento FP, as vacas do tratamento FG apresentaram maior altura das células epiteliais glandulares profundas (33,0 vs. 28,8 μm ; $P < 0,05$), densidade de ductos glandulares (30,3 vs. 24,8 ductos/ mm^2 ; $P < 0,1$), área glandular em relação à área endometrial (26,5 vs. 18,8%; $P < 0,05$), área glandular em relação à área uterina total (11,4 vs. 8,0%; $P < 0,05$) e perímetro médio dos ductos glandulares profundos no Dia 5 (352,8

vs. 261,3 μm ; $P < 0,05$) e menor expressão gênica (em relação ao gene constitutivo ciclofilina A) de OTR no Dia 5 (2,1 vs. 4,7; $P < 0,05$). Apesar de não terem sido observados efeitos de tratamentos nas expressões gênicas de ER e PR, as vacas do tratamento FG apresentaram menor ($P < 0,05$) porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial profundo no Dia 0 (70,4 vs. 86,1%), intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no Dia 5 no epitélio luminal (70,6 vs. 83,9 UA) e no estroma subepitelial profundo (75,8 vs. 93,2 UA) e maior porcentagem de núcleos positivos para PR no epitélio glandular profundo (95,0 vs. 92,5%; $P < 0,1$), intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no epitélio glandular superficial (88,5 vs. 85,8 UA; $P < 0,1$) e profundo (89,1 vs. 81,7 UA; $P < 0,05$), intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no estroma subepitelial profundo no Dia 0 (87,5 vs. 80,3 UA; $P < 0,05$), porcentagem de núcleos positivos para PR no estroma subepitelial profundo nos Dias 0 (94,5 vs. 71,5%; $P < 0,05$) e 5 (72,7 vs. 51,8%; $P < 0,05$) e porcentagem de núcleos positivos para PR no estroma subepitelial superficial no Dia 5 (84,2 vs. 55,7%; $P < 0,05$) em relação às vacas do tratamento FP. Conclui-se que a diminuição no tamanho do folículo ovulatório causou alterações temporais e locais no endométrio que podem desfavorecer o desenvolvimento embrionário, como menor proliferação do tecido glandular, e favorecer a secreção de $\text{PGF2}\alpha$, aumentando o risco potencial de luteólise prematura.

Palavras-chave: Anestro, diâmetro folicular, receptores de estradiol, receptores de progesterona, receptores de ocitocina, histomorfometria uterina.

**Effect of Follicular Diameter on Uterine Histological and Molecular Characteristics
in Postpartum Anestrus Nelore Cows Treated with Progesterone**

Abstract. The objective of this study was to evaluate the effects of follicular diameter on the uterine histomorphometry, the gene expression of ER, PR, OTR, COX-1 and COX-2, and the protein expressions of ER and PR (percentage of positive nuclei and staining intensity of positive nuclei, in arbitrary units [AU], at immunohistochemistry) in anestrus cows submitted to induction of ovulation after a treatment with P4. Primiparous postpartum anestrus Nelore cows received an intravaginal insert containing 1.9 g of P4 between Days -8 and -2, TW between Days -2 and 0 (48 h), and GnRH on Day 0. Treatments consisted in ultrasound-guided aspiration of ≥ 6 mm follicles either on Day -8 (FG; n = 15) or Day -6 (FP; n = 15). Within each treatment, cows were randomly distributed to receive hysterectomy either on Day -2, 0, or 5 (n = 5/treatment/day point). Data were analyzed by PROC GLM of SAS. Cows from treatment FG had greater deep gland cell height (33.0 vs. 28.8 μm ; $P < 0.05$), gland duct density (30.3 vs. 24.8 ducts/ mm^2 ; $P < 0.1$), gland duct area by endometrial area (26.5 vs. 18.8%; $P < 0.05$), gland duct area by total uterine area (11.4 vs. 8.0%; $P < 0.05$) and deep gland duct perimeter on Day 5 (352.8 vs. 261.3 μm ; $P < 0.05$), and lower OTR gene expression on Day 5 (2.1 vs. 4.7; $P < 0.05$) than cows from treatment FP. Although no effects of treatment on ER and PR gene expression were found, cows from treatment FG had lower ($P < 0.05$) percentage of ER-positive nuclei in deep uterine stroma on Day 0 (70.4 vs. 86.1%), staining intensities of ER-positive nuclei on Day 5 in luminal epithelium (70.6 vs. 83.9 AU) and deep

subepithelial stroma (75.8 vs. 93.2 AU), and greater percentage of PR-positive nuclei in deep glandular epithelium (95.0 vs. 92.5%; $P < 0.1$), staining intensity of PR-positive nuclei in shallow (88.5 vs. 85.8 AU; $P < 0.1$) and deep glandular epithelia (89.1 vs. 81.7 AU; $P < 0.05$), staining intensity of PR-positive nuclei in deep subepithelial stroma on Day 0 (87.5 vs. 80.3 AU; $P < 0.05$), percentage of PR-positive nuclei in deep subepithelial stroma on Days 0 (94.5 vs. 71.5%; $P < 0.05$) and 5 (72.7 vs. 51.8%; $P < 0.05$) and percentage of PR-positive nuclei in shallow subepithelial stroma on Day 5 (84.2 vs. 55.7%; $P < 0.05$) than cows from treatment FP. In conclusion, the reduction in size of the ovulatory follicle caused temporal and local changes in the endometrium that might impair early embryonic development, such as reduced glandular tissue proliferation, and advance the secretion of $\text{PGF2}\alpha$, increasing the potential risk of premature luteolysis.

Keywords: Anestrus, follicular diameter, estradiol receptors, progesterone receptors, oxytocin receptors, uterine histomorphometry.

1. Justificativa

Avaliar a histomorfometria uterina, a expressão gênica endometrial de ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2, e a expressão protéica de ER e PR em vacas em anestro com diferentes diâmetros foliculares após tratamento com P4. A hipótese desse experimento foi que, em vacas em anestro tratadas com P4, a redução no tamanho folicular eleva a expressão de enzimas e receptores endometriais que propiciam a luteólise e reduz a proliferação tecidual uterina.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais e tratamentos

Foram utilizadas inicialmente 40 vacas primíparas Nelore em anestro, com 30 a 60 dias pós-parto e escore de condição corporal $2,89 \pm 0,01$ (escala de 1 a 5; HOUGHTON et al., 1990), mantidas a pasto (*Brachiaria humidicola*) e pertencentes à Pecuária Novo Horizonte, localizada no município de Coxim-MS. A condição de anestro foi determinada por dois exames ultrassonográficos e pelas concentrações séricas de P4, conforme descrito no Capítulo 2. No dia do segundo exame de ciclicidade (Dia -8), as vacas que não apresentaram tecido luteal em ambos os exames ultrassonográficos receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de P4 (CIDR[®], Pfizer Saúde Animal, Brasil) e foram aleatoriamente distribuídas para receber um dos seguintes tratamentos (Figura 18): aspiração guiada por ultrassom dos folículos ovarianos ≥ 6 mm no Dia -8 (FG; n = 15); aspiração guiada por ultrassom dos folículos ovarianos ≥ 6 mm no Dia -6 (FM; n = 15). No Dia -2, as vacas tiveram os dispositivos de P4 removidos e foram submetidas à RB por 48

horas (entre os Dias -2 e 0), seguido por tratamento com 200 µg de GnRH (2 mL de Fertagyl[®], Intervet, Brasil), via intramuscular, ao final da RB. Dentro de cada tratamento, as vacas foram aleatoriamente distribuídas para receber cirurgia de histerectomia unilateral nos Dias -2, 0 ou 5, conforme descrito no Capítulo 3.

2.2. Aspirações foliculares

O procedimento de aspiração folicular guiada por ultrassom realizada no presente experimento foi semelhante ao descrito no Capítulo 3. O objetivo da aspiração folicular foi sincronizar a onda folicular precisamente em dois diferentes momentos (Dia -8 ou Dia -6), de forma que os folículos subseqüentes apresentassem diferentes diâmetros à ovulação e, conseqüentemente, as vacas apresentassem diferentes concentrações circulantes de E2 no período pré-ovulatório.

2.3. Remoção temporária de bezerros

O procedimento e objetivo da RB realizada no presente experimento foram semelhantes ao descrito no Capítulo 2.

2.4. Ultrassonografia das estruturas ovarianas

Exames ultrassonográficos foram realizados nos Dias -15, -8, -2, 0, 2 e 5 de forma semelhante à descrita no Capítulo 3. As vacas a serem submetidas à histerectomia no Dia 5 foram avaliadas por ultrassonografia ovariana nesse dia visando-se mensurar o diâmetro do corpo lúteo, através da média entre o maior diâmetro e o diâmetro perpendicular a ele.

2.5. Colheitas e análises de sangue

Os procedimentos de colheita, manipulação e armazenamento de soro realizados no presente experimento foram semelhantes aos descritos no Capítulo 2.

2.5.1. Dosagens de progesterona

Amostras de sangue para dosagem de P4 foram colhidas nos Dias -15, -8, 2 e 5, de forma semelhante à descrita no Capítulo 3. A dosagem de P4 do presente experimento foi realizada no mesmo ensaio descrito no Capítulo 2, cuja sensibilidade foi 0,1 ng/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi 6,1%

2.5.2. Dosagens de estradiol

Amostras de sangue para dosagem de E2 foram colhidas nos Dias -2 e 0. A dosagem de E2 do presente experimento foi realizada no mesmo ensaio descrito no Capítulo 2, cuja sensibilidade foi 0,5 pg/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi 12,3%

2.6. Colheitas e análises de tecidos uterinos

Os procedimentos de colheita, manipulação, armazenamento dos tecidos uterinos realizados no presente experimento foram semelhantes aos descritos no Capítulo 2. As análises laboratoriais (coloração HE para avaliação morfológica, imunohistoquímica para ER e PR e RT-PCR em Tempo Real para ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2) das amostras

uterinas coletadas no presente experimento foram realizadas nos mesmos ensaios descritos no Capítulo 2.

2.7. Resumo do delineamento experimental

Na Figura 18 está resumido o delineamento do presente experimento:

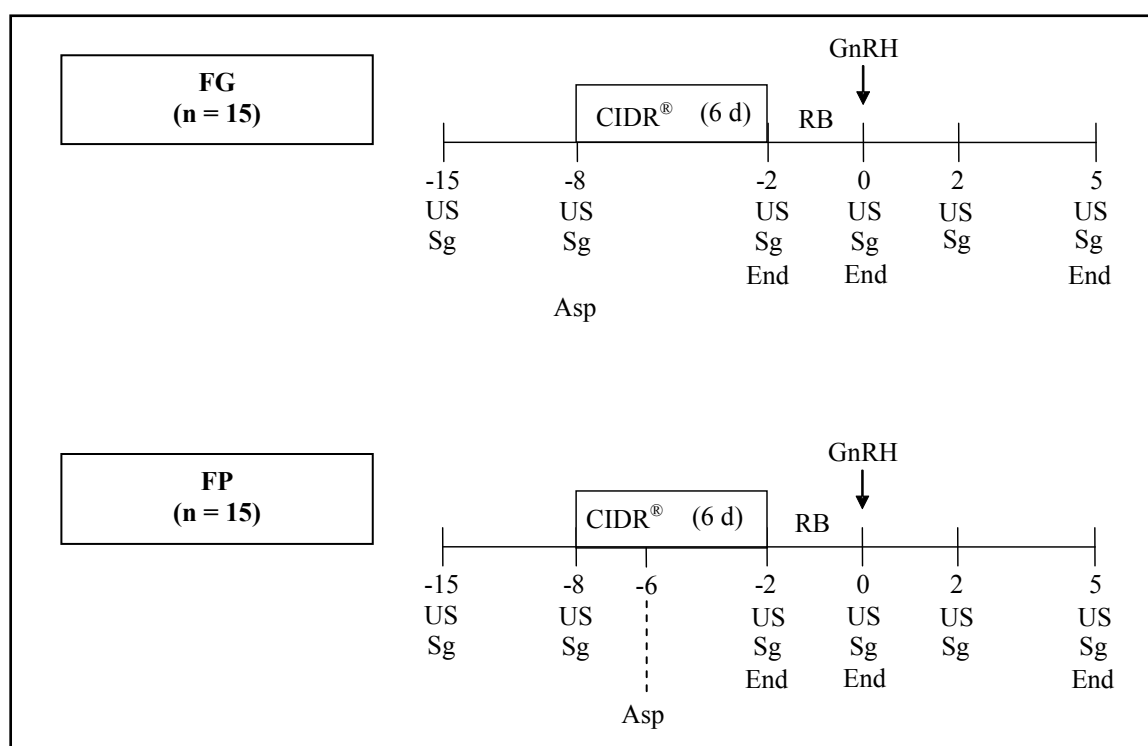


Figura 18: Diagrama esquemático do delineamento experimental. US: Ultrassonografia das estruturas ovarianas; Sg: Colheita de sangue; End: Colheita de tecido endometrial; Asp: Aspiração guiada por ultrassom dos folículos ovarianos ≥ 6 mm; CIDR®: Dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de progesterona; RB: Remoção de bezerros (48 horas).

2.8. Análise estatística

As variáveis dependentes foram analisadas pelo procedimento GLM do programa SAS. Para cada variável, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Quando os dados não obedeceram às premissas para a

análise, foram submetidos à transformação logarítmica ou inversa e re-analisados. As médias ajustadas foram re-expressas na escala original.

Para a análise das variáveis dependentes diâmetro folicular no Dia -2, diâmetro folicular no Dia 0, concentração sérica de E2 no Dia -2, concentração sérica de E2 no Dia 0, diâmetro do CL no Dia 5, concentração sérica de P4 no Dia 2 e concentração sérica de P4 no Dia 5, o modelo incluiu os efeitos de tratamento e escore de condição corporal (covariável). Para a análise das variáveis dependentes relacionadas à morfometria uterina (altura das células epiteliais luminais, altura das células epiteliais glandulares superficiais, altura das células epiteliais glandulares profundas, área endometrial percentual, densidade de ductos glandulares, perímetro dos ductos glandulares, área ocupado por ductos glandulares por unidade de área endometrial, área ocupado por ductos glandulares por unidade de área total de tecido uterino), ER (porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração), PR (porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração) e expressão gênica (ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2), o modelo incluiu os efeitos de tratamento, dia, interação entre tratamento e dia e escore de condição corporal (covariável).

Para cada variável dependente, as médias gerais foram desdobradas e comparadas somente quando detectado efeito ou tendência a efeito de pelo menos uma das classes incluídas nos modelos. Quando detectado efeito de dia, as médias foram comparadas pelo teste t. Quando detectada interação entre tratamento e dia, as médias foram comparadas por contrastes ortogonais considerando os efeitos de dia dentro de cada tratamento e de

tratamento dentro de cada dia. Considerou-se significância quando $P < 0,05$ e tendência a significância quando $0,1 > P \geq 0,05$.

3. Resultados

As variáveis contínuas descritas a seguir estão expressas como média dos quadrados mínimos \pm EPM.

3.1. Esteróides e estruturas ovarianas

As vacas do tratamento FG apresentaram maior diâmetro folicular nos Dias -2 (10,03 mm vs. 7,39 mm; EPM = 0,19; $P < 0,01$) e 0 (11,59 mm vs. 8,66 mm; EPM = 0,15; $P < 0,01$). Este experimento foi delineado para avaliar o efeito do diâmetro folicular e da concentração pré-ovulatória de E2 na histomorfometria uterina e em fatores moleculares endometriais relacionados à luteólise. Visando alterar o diâmetro folicular, realizaram-se aspirações foliculares nos Dias -8 (tratamento FG) ou -6 (tratamento FP) do experimento. O procedimento experimental de alterar o diâmetro do folículo ovulatório através da aspiração folicular guiada por ultrassom foi previamente descrito em vacas cíclicas (VASCONCELOS et al., 2001). Entretanto, o presente experimento constitui o primeiro relato da utilização dessa técnica em vacas em anestro e mostrou-se bastante eficiente, pois reduziu o diâmetro folicular em 2,64 mm e 2,93 mm no Dias -2 e 0, respectivamente. A concentração sérica de E2 no Dia -2 não foi influenciada por tratamento, porém no Dia 0 foi maior nas vacas do tratamento FG (3,22 pg/mL vs. 1,76 pg/mL; EPM = 0,25; $P < 0,01$). Assim, o tratamento reduziu a concentração circulante de E2 no Dia 0 em

aproximadamente 55%, evidenciando sua eficiência em reduzir o tamanho, idade e estado fisiológico folicular.

Como esperado, no presente experimento, a redução no diâmetro do folículo ovulatório nas vacas do tratamento FP resultou em CL de menor diâmetro no Dia 5 (15,23 mm vs. 10,49 mm; EPM = 1,48; $P < 0,01$) e menor concentração sérica de P4 no Dia 5 (1,32 ng/mL vs. 0,79 ng/mL; EPM = 0,13; $P < 0,01$) em relação às vacas do tratamento FG. Entretanto, não houve efeito de tratamento nas concentrações séricas de P4 no Dia 2 ($0,31 \pm 0,55$ ng/mL; $P > 0,1$). Dessa forma, a aspiração folicular no Dia -6 reduziu o diâmetro folicular no Dia 0 a aproximadamente 75%, o diâmetro do CL no Dia 5 a aproximadamente 69% e a concentração sérica de P4 no Dia 5 a aproximadamente 60% do observado nas vacas aspiradas no Dia -8. Esses dados estão de acordo com os relatados por Vasconcelos et al. (2001) em que o impacto do procedimento de aspiração folicular foi maior no diâmetro folicular e do CL do que na concentração circulante de P4. Em um estudo em ovelhas, Murdoch & Kirk (1998) verificaram que a indução prematura da ovulação com GnRH reduziu o diâmetro do CL subsequente, a concentração circulante de P4, a concentração luteal de P4 e o número de CLG. Além disso, observou-se redução na quantidade de células da granulosa nos folículos induzidos a ovular prematuramente. No presente experimento não foi avaliado se os tratamentos alteraram diretamente a quantidade de células da granulosa no folículo ovulatório porém, a menor concentração sérica de E2 no Dia 0 nas vacas do tratamento FP indica uma possível redução na quantidade e/ou atividade dessas células, de acordo com as observação de Murdoch & Kirk (1998).

3.2. Aspectos moleculares relacionados à luteólise

Observou-se interação entre tratamento e dia na expressão gênica de OTR ($P < 0,05$; Figura 19) e a expressão gênica da enzima COX-2 foi influenciada por dia, sendo menor no Dia 0 em relação aos Dias -2 e 5 (Dia -2: 2,52; Dia 0: 0,65; Dia 5: 2,81; EPM = 0,77; $P < 0,05$). Porém, não foram observados efeitos de tratamento, dia ou interação entre tratamento e dia nas expressões gênicas de PR ($6,12 \pm 1,84$), ER ($3,05 \pm 1,33$) e COX-1 ($2,24 \pm 0,41$).

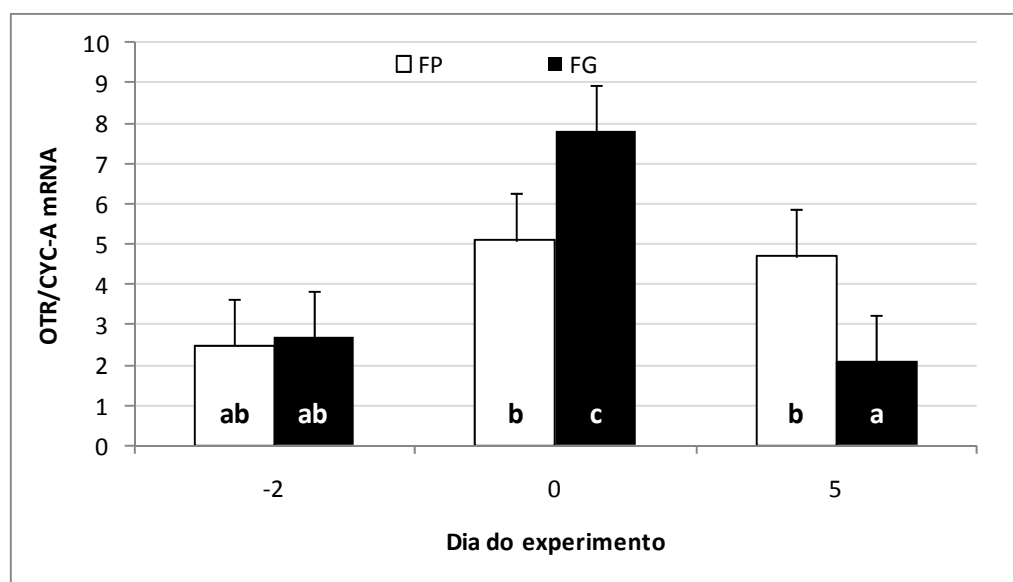


Figura 19: Expressão gênica de receptores endometriais de ocitocina (OTR) relativa ao gene constitutivo ciclofilina A (CYC-A; média dos quadrados mínimos \pm EPM), quantificada por RT-PCR em tempo real, em vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

A ausência de efeito de dia nas expressões gênicas de ER e PR discorda do que foi verificado em vacas cíclicas por Robinson et al. (2001), nas quais a expressão gênica de ambos receptores apresentou-se elevada nos períodos de proestro e estro, decrescendo em seguida. No entanto, os resultados de expressão gênica de OTR estão de acordo com a fisiologia de fêmeas ruminantes cíclicas, em que a concentração endometrial de OTR encontra-se elevada durante o estro, diminui progressivamente ao longo da fase luteal e aumenta novamente nos momentos prévios à luteólise (MIRANDO et al., 1993; STEVENSON et al., 1994). Silvia & Taylor (1989) correlacionaram uma maior produção de PGF2 α induzida pela OT a proporções crescentes da razão estradiol/progesterona no final da fase luteínica. O aumento desta razão parece também ser a causa do aumento da concentração de OTR período pré-parto (FUCHS et al., 1995).

Estudos em ovelhas demonstraram que apenas a queda na concentração circulante de P4 foi suficiente para iniciar a expressão de OTR, mas a administração de E2 no momento da retirada da P4 maximizou o estímulo à expressão gênica de OTR (LEAVITT et al., 1985; VALLET et al., 1990; ZHANG et al., 1992). Além disso, diversos estudos *in vivo* demonstraram que o E2 estimula a expressão endometrial de OTR (HIXON & FLINT, 1987; BEARD & LAMMING, 1994; SPENCER et al., 1995) e um estudo *in vitro* confirmou o efeito do E2 em acelerar a expressão gênica de OTR sem, no entanto, alterar a concentração final de mRNA de OTR (LEUNG & WATHES, 1999). De fato, no presente experimento, a expressão gênica endometrial de OTR foi maior nas vacas do tratamento FG no Dia 0. Existe também a possibilidade de o E2 exercer efeito na ativação de receptores pré-existentes (HIXON & FLINT, 1987; PARKINSON et al., 1990).

A elevação da função e expressão endometrial de OTR no proestro/estro termina dentro de 2 a 3 dias após o estro, e os OTR são inibidos, retornando aos níveis basais (MEYER et al., 1988; FUCHS et al., 1990; HORN et al., 1998). Em fêmeas ruminantes cíclicas, elevadas concentrações pré-ovulatórias de E2 resultaram em inibição da expressão de OTR no endométrio e ausência de secreção de $\text{PGF2}\alpha$ em resposta ao desafio com OT durante os primeiros dias da fase luteal (Lamming & Mann, 1995a,b). Em um estudo com vacas ovariectomizadas, Mann & Lamming (2000) verificaram que, também na ausência de pré-exposição à P4, o E2 inibiu a expressão de OTR de forma dose dependente. Vallet et al. (1990) em estudo com ovelhas ovariectomizadas, verificaram que o E2 apresenta efeitos contraditórios sobre a expressão da OTR no endométrio, variando de acordo com o tempo, de forma que inicialmente (1 a 2 dias) o efeito é estimulatório e posteriormente (5 dias) inibitório. É possível que o efeito inibitório do E2 na expressão de OTR no endométrio seja em decorrência de alterações na expressão de ER, uma vez que Cherry et al. (1991) observaram que a concentração de ER foi reduzida após o estro, antes que as concentrações circulantes de P4 se elevassem.

Observou-se efeito de dia ($P < 0,05$) nas variáveis porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial superficial e intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER nos epitélios glandulares superficial e profundo e no estroma subepitelial superficial: a porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial superficial foi maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 75,55; Dia 0: 76,24; Dia 5: 90,99; EPM = 5,10); a intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no epitélio glandular superficial foi maior no Dia 0 em relação ao Dia -2 e no Dia 5 em

relação ao Dia 0 (Dia -2: 56,55; Dia 0: 76,37; Dia 5: 86,24; EPM = 4,71); a intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no epitélio glandular profundo foi menor no Dia -2 em relação aos Dias 0 e 5 (Dia -2: 73,42; Dia 0: 93,80; Dia 5: 88,94; EPM = 3,39); a intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no estroma subepitelial superficial foi menor no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 86,00; Dia 0: 85,89; Dia 5: 68,70; EPM = 3,09). Houve interação entre dia e tratamento na intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no epitélio luminal ($P < 0,05$; Figura 20) e estroma subepitelial profundo ($P < 0,05$; Figura 21) e na porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial profundo ($P < 0,05$; Figura 22). Não foram observados efeitos de tratamento, dia ou interação entre tratamento e dia na porcentagem de núcleos positivos para ER no epitélio luminal ($91,50 \pm 6,62\%$), epitélio glandular superficial ($92,36 \pm 3,86\%$) e epitélio glandular profundo ($93,77 \pm 2,71\%$).

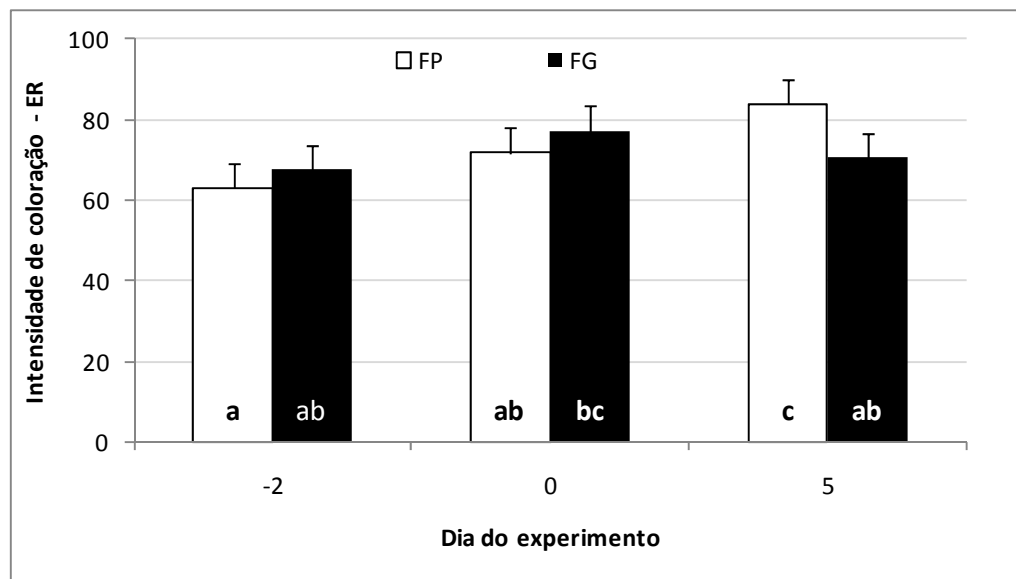


Figura 20: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α em células epiteliais luminais (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

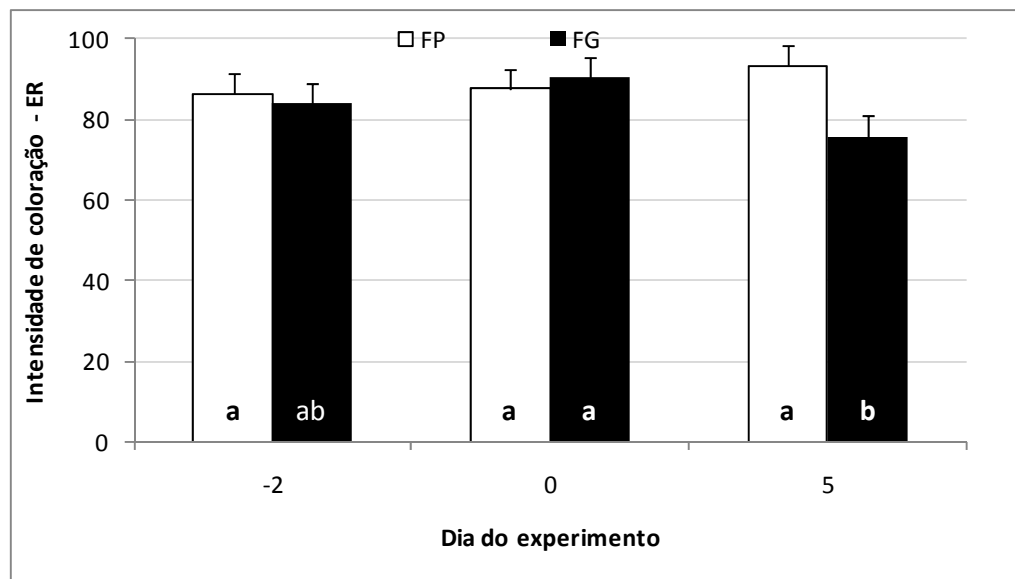


Figura 21: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de estradiol α no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

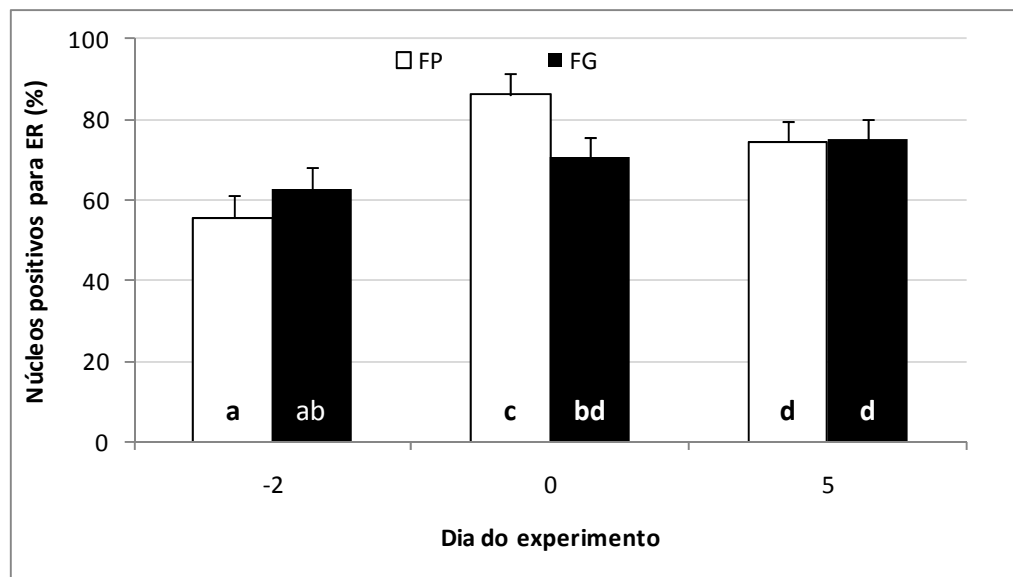


Figura 22: Porcentagem de núcleos com imunomarcção positiva para receptor de estradiol α no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

Houve tendência a efeito de tratamento ($P < 0,1$) na intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no epitélio glandular superficial (FP: 85,81; FG: 88,53; EPM = 1,89) e na porcentagem de núcleos positivos para PR no epitélio glandular profundo (FP: 92,47%; FG: 94,97; EPM = 1,26). A intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no epitélio glandular profundo foi influenciada por dia, sendo menor do Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 91,71; Dia 0: 88,47; Dia 5: 76,03; EPM = 3,54; $P < 0,05$), e por tratamento (FP: 81,72; FG: 89,10; EPM = 2,86; $P < 0,05$). Houve interação entre dia e tratamento na porcentagem de núcleos positivos para PR no estroma subepitelial superficial ($P < 0,05$; Figura 23) e no estroma subepitelial profundo ($P < 0,05$; Figura 24) e na intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no estroma subepitelial

profundo ($P < 0,05$; Figura 25). Não foram observados efeitos de tratamento, dia ou interação entre tratamento e dia na porcentagem de núcleos positivos para PR no epitélio luminal ($89,94 \pm 3,14\%$) e epitélio glandular superficial ($92,37 \pm 2,25\%$), e na intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no epitélio luminal ($66,28 \pm 4,11$ UA) e estroma subepitelial superficial ($81,12 \pm 5,66$ UA).

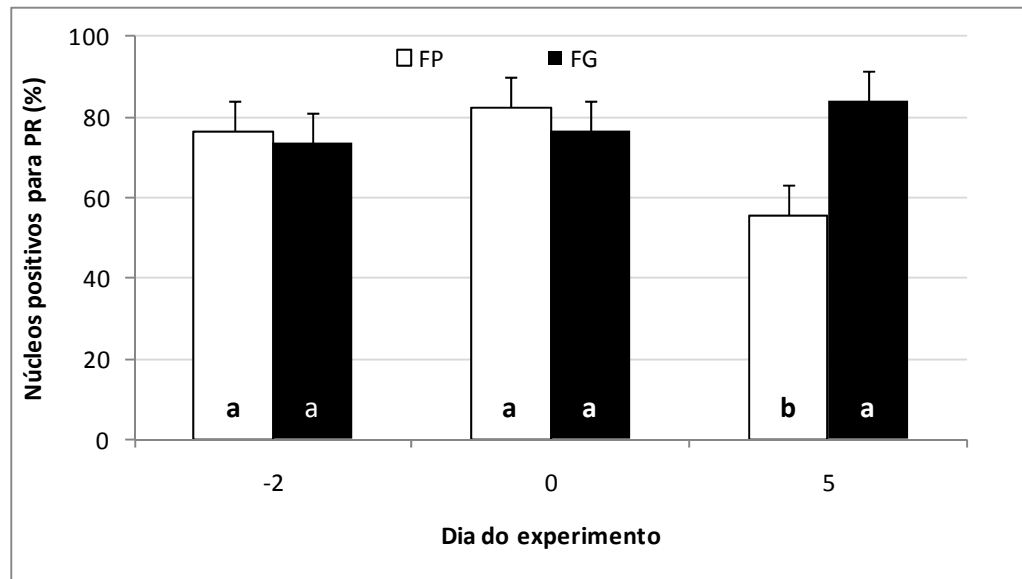


Figura 23: Porcentagem de núcleos com imunomarcção positiva para receptor de progesterona no estroma subepitelial superficial (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

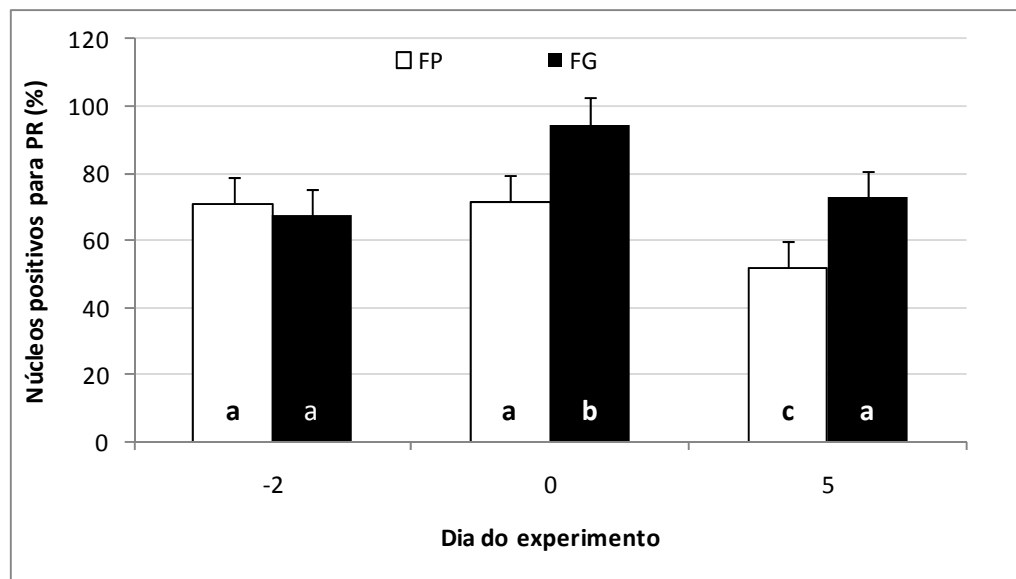


Figura 24: Porcentagem de núcleos com imunomarcção positiva para receptor de progesterona no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

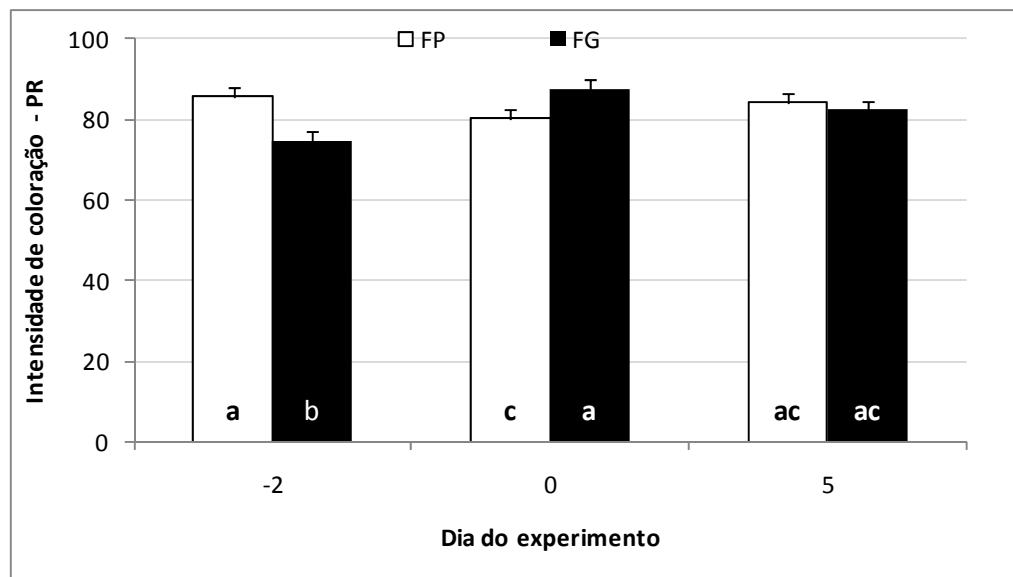


Figura 25: Intensidade de coloração dos núcleos positivos para receptor de progesterona no estroma subepitelial profundo (média dos quadrados mínimos \pm EPM) de vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

Apesar de no presente experimento não terem sido observados efeitos de tratamento e dia nas expressões gênicas de ER e PR, a expressão protéica desses receptores foi alterada em algumas regiões endometriais, sendo que os efeitos de tratamento sobre PR ocorreram em mais regiões do que sobre os ER. Esse maior efeito sobre PR pode ser devido ao fato de que o E2 pré-ovulatório estimula a expressão da PR no útero no início da fase luteal (OTTOBRE et al., 1984), como discutido anteriormente. É provável, portanto, que a luteólise prematura observada quando vacas em anestro pré-expostas à P4 ou cíclicas ovulam folículos de pequeno diâmetro (VASCONCELOS et al., 2001; TAPONEN et al., 2003; PETERS & PURSLEY, 2003) seja decorrente de elevada expressão de OTR

associada a expressão insuficiente de PR nos primeiros dias pós-ovulação, como sugerido por Zollers et al. (2003).

A localização dos OTR no endométrio não foi avaliada no presente experimento, porém em estudos com vacas cíclicas utilizando as técnicas de hibridização *in situ* e imunohistoquímica para OTR no endométrio observaram-se expressões em alta intensidade apenas nas células epiteliais luminiais e glandulares, tanto do gene (HORN et al., 1998; ROBINSON et al., 2001) como da proteína (HORN et al., 1998). Provavelmente pelos motivos discutidos previamente, as vacas do tratamento FG, que tiveram maior concentração sérica de E2 no Dia 0, apresentaram maior expressão gênica de OTR no Dia 0 e menor no Dia 5. De acordo com Kieborz-Loos et al. (2003), em animais pré-tratados com P4, o E2 pré-ovulatório seria essencial para reduzir a capacidade de secreção de PGF2 α em resposta à OT no início da fase luteal. Um possível efeito de P4 luteal na expressão gênica de OTR no Dia 5 não pode ser descartado, pois as vacas do tratamento FG apresentaram maior concentração sérica de P4 e expressão protéica de PR em algumas regiões endometriais nesse momento, entretanto o delineamento do Experimento 3 não permite essa conclusão.

No presente estudo, não foi observado efeito de tratamento nas expressões gênicas das enzimas COX-1 e COX-2, contrariando as observações de Xiao et al. (1998), os quais verificaram redução na expressão gênica da enzima COX-2 quando células epiteliais endometriais bovinas foram tratadas com E2. Assim como no Experimento 2, no presente experimento houve uma correlação positiva entre expressão gênica de COX-2 e concentração sérica de P4, concordando com Lamming & Mann (1995b), e os resultados

referentes às expressões gênicas de COX-1 e COX-2 indicam que essas enzimas provavelmente não estão relacionadas à causa da luteólise prematura.

3.3. Histomorfometria uterina

A altura das células epiteliais luminais foi influenciada por dia, sendo menor no Dia -2 em relação aos Dias 0 e 5 (Dia -2: 33,06 μm ; Dia 0: 39,13 μm ; Dia 5: 39,13 μm ; EPM = 1,33; $P < 0,05$). Similarmente, a altura das células epiteliais glandulares superficiais foi menor no Dia -2 em relação aos Dias 0 e 5 (Dia -2: 29,25 μm ; Dia 0: 31,84 μm ; Dia 5: 38,09 μm ; EPM = 2,45; $P < 0,05$). A altura das células epiteliais glandulares profundas foi influenciada por tratamento (FP: 28,80 μm ; FG: 33,00 μm ; EPM = 1,83; $P < 0,05$). A área endometrial percentual foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 0 em relação aos Dias -2 e 5 (Dia -2: 39,67%; Dia 0: 52,76%; Dia 5: 36,54%; EPM = 2,28; $P < 0,05$). A densidade de ductos glandulares foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 21,45 ductos/ mm^2 ; Dia 0: 23,38 ductos/ mm^2 ; Dia 5: 37,84 ductos/ mm^2 ; EPM = 3,31; $P < 0,05$), e tendeu a ser influenciada por tratamento (FP: 24,78 ductos/ mm^2 ; FG: 30,27 ductos/ mm^2 ; EPM = 2,70; $P < 0,1$). O perímetro médio dos ductos glandulares superficiais foi influenciado por dia, sendo maior no Dia 5 em relação ao Dia 0 e no Dia 0 em relação ao Dia -2 (Dia -2: 269,13 μm ; Dia 0: 314,47 μm ; Dia 5: 356,77 μm ; EPM = 21,02; $P < 0,05$). A área glandular em relação à área endometrial foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 19,91%; Dia 0: 17,29%; Dia 5: 30,82%; EPM = 3,62; $P < 0,05$), e por tratamento (FP: 18,82%; FG: 26,53%; EPM = 2,96; $P < 0,05$). Similarmente, a área glandular em relação à área uterina

total foi influenciada por dia, sendo maior no Dia 5 em relação aos Dias -2 e 0 (Dia -2: 8,36%; Dia 0: 9,57%; Dia 5: 11,20%; EPM = 1,30; $P < 0,05$), e por tratamento (FP: 8,04%; FG: 11,38%; EPM = 1,07; $P < 0,05$). Houve interação entre dia e tratamento no perímetro médio dos ductos glandulares profundos ($P < 0,05$; Figura 26).

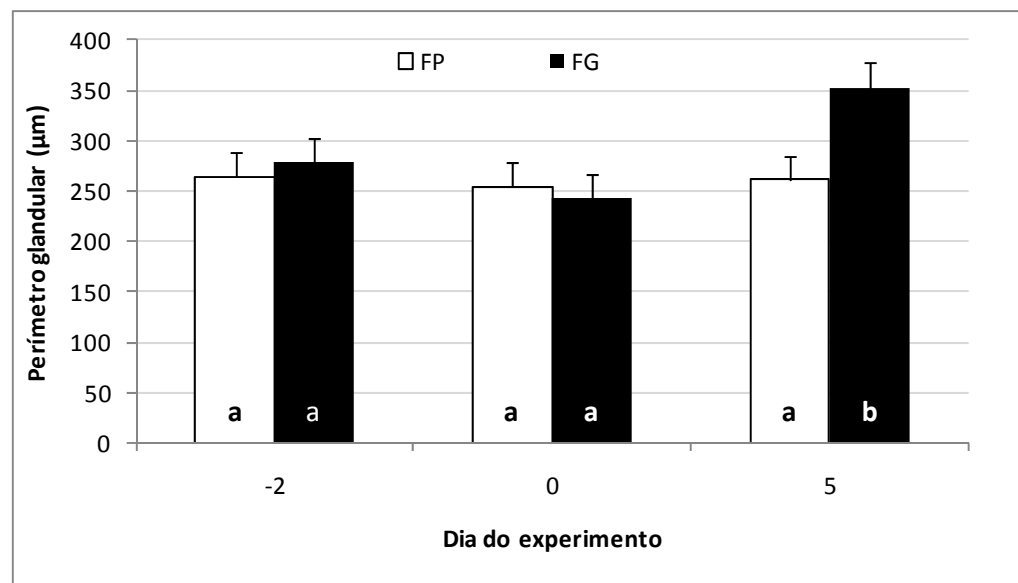


Figura 26: Perímetro dos ductos glandulares endometriais profundos (média dos quadrados mínimos \pm EPM) em vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona entre os Dias -8 e -2 e induzidas a ovular folículos de diferentes diâmetros (FP: $8,66 \pm 0,15$ mm; FG: $11,59 \pm 0,15$ mm) com GnRH no Dia 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Coxim-MS, 2008.

No presente experimento, os tratamentos simularam toda a seqüência esteroidal fisiológica hipotetizada nos trabalhos de Moore (1985) e Wilmut et al. (1986) alterando-se, no entanto, as concentrações circulantes de E2 pré-ovulatório e de P4 na fase luteal subsequente à ovulação, através da manipulação do diâmetro folicular. Considerando que as vacas do tratamento FG apresentaram maiores concentrações circulantes de E2 no Dia 0 e de P4 no Dia 5, os resultados observados nas avaliações histomorfométricas estão de

acordo com as descrições clássicas da literatura sobre os efeitos dos esteróides no desenvolvimento das glândulas endometriais. De acordo com Johnson (1965), sob influência do E2, as glândulas endometriais crescem em quantidade e comprimento e suas células aumentam em altura. A P4, por sua vez, faz com que as glândulas se tornem mais tortuosas, ramificadas e secretivas, além de reduzir o edema na região do estroma, o que aumenta a concentração glandular por unidade de área nessa região (JOHNSON, 1965; MURRAY, 1992).

Assim como observado no Experimento 2, no presente experimento, as principais alterações morfométricas causadas por tratamento ocorreram em regiões mais distantes do lúmen uterino, diferindo de estudos em ovelhas intactas cíclicas, prenhes e ovariectomizadas (JOHNSON et al., 1997a,b; ZHENG et al., 1996), como discutido previamente. Além das concentrações circulantes de esteróides nos Dias 0 e 5, diferenças na distribuição e concentração dos receptores endometriais de esteróides podem ter contribuído para o maior desenvolvimento epitelial glandular profundo nas vacas do tratamento FG pois, apesar da ausência de efeito de tratamento nos ER, as vacas do tratamento FG apresentaram maior intensidade de coloração dos núcleos positivos para RP nas células das glândulas profundas, indicando maior concentração desse receptor naquele local.

De forma geral, na maior parte das variáveis histomorfométricas avaliadas houve proliferação tecidual gradativamente progressiva do início do proestro (Dia -2) até a fase luteal inicial (Dia 5). De acordo com esses resultados, Wang et al. (2007) verificaram em vacas cíclicas que a densidade de ductos glandulares foi maior na fase luteal em relação à

fase folicular. Além disso, a densidade de ductos glandulares no oitavo dia do ciclo estral correlacionou-se positivamente à concentração plasmática de P4, concordando com os resultados do presente experimento. Entretanto, diferentemente das demais variáveis histomorfométricas avaliadas, a área endometrial percentual aumentou entre os Dias -2 e 0 e reduziu-se entre os Dias 0 e 5, discordando do relato de que o endométrio torna-se mais espesso durante a fase luteal (ROBERTS, 1971). Corroborando o resultado do presente experimento, Wang et al. (2007) observaram em vacas cíclicas que a área endometrial foi maior durante o proestro e estro em relação à fase luteal, e atribuíram tal resultado ao edema causado pelo E2 e à redução do edema causado pela P4 subseqüentemente (JOHNSON, 1965; MURRAY, 1992). Por outro lado, no estudo de Wang et al. (2007), o perímetro dos ductos glandulares não foi influenciado pelo estágio do ciclo estral e a área endometrial e o perímetro dos ductos glandulares no oitavo dia do ciclo estral foram negativamente correlacionados à concentração plasmática de P4, resultados que contrariaram os do presente experimento.

Os efeitos de dia, independente de tratamento, nas variáveis histomorfométricas observados no presente experimento indicam que, quando vacas são pré-expostas à P4, o E2 pré-ovulatório pode causar alterações em algumas regiões endometriais mesmo que em baixas concentrações circulantes, ou mesmo que o desenvolvimento tecidual nessas regiões não seja influenciado pelo E2. É possível, portanto, que a P4 possa exercer alguns efeitos diretos no tecido endometrial, independente do E2. Em trabalhos com ovelhas ovariectomizadas, a suplementação apenas com P4 exógena resultou em aumento da produção de fatores angiogênicos pelo endométrio (JOHNSON et al., 1997a) e em maior

proliferação do epitélio luminal intercaruncular (OKULICZ et al., 1993). Shaham-Albalancy et al. (1997) suplementaram ou não vacas com P4 exógena durante um ciclo estral e verificaram que, apesar de as concentrações pré-ovulatórias de E2 terem sido semelhantes, o desenvolvimento das glândulas endometriais e da vascularização no estroma subepitelial no ciclo estral subsequente foi mais rápido nos animais suplementados. Corroborando essa hipótese, no Experimento 2, observou-se que a altura das células epiteliais glandulares profundas, a área endometrial percentual e o perímetro das glândulas epiteliais profundas no Dia 0 foram maiores nas vacas do tratamento CIDR, mesmo tendo concentrações circulantes de E2 baixas e semelhantes às das vacas do tratamento CONTROLE.

4. Conclusões

De acordo com os resultados do presente experimento, conclui-se que, em vacas em anestro pré-tratadas com P4:

- a redução no diâmetro folicular no proestro diminuiu proliferações teciduais no endométrio, potencialmente limitando sua capacidade secretória no início da fase luteal;
- a redução no diâmetro do folículo ovulatório aumentou a expressão gênica de OTR no quinto dia pós-ovulação;
- a redução no diâmetro folicular no proestro aumentou a expressão protéica de ER e reduziu a expressão de PR em algumas regiões endometriais, potencialmente aumentando a capacidade de secreção de $\text{PGF2}\alpha$ no início da fase luteal.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

1. Discussão geral

1.1. Aspectos moleculares relacionados à luteólise

No presente conjunto de estudos, observou-se que: 1) a fase de desenvolvimento folicular durante o anestro não influenciou as expressões gênicas ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2 e as únicas alterações observadas na expressão protéica de ER e PR foram restritas às glândulas endometriais profundas e ao estroma subepitelial após remoção de bezerras (Experimento 1); 2) o tratamento de vacas em anestro com P4 exógena inibiu a expressão gênica OTR e as expressões gênica e protéica de ER, os quais permaneceram em níveis inferiores até o Dia 5, além de estimular a expressão protéica de PR em determinadas regiões do endométrio, principalmente até o Dia 0 (Experimento 2); 3) o diâmetro folicular, em vacas em anestro pré-tratadas com P4, influenciou negativamente a expressão gênica de OTR no Dia 5 e a expressão protéica de ER no estroma subepitelial profundo, e positivamente a expressão protéica de PR em diversas regiões endometriais (Experimento 3). Através da comparação dos resultados obtidos com os diferentes tratamentos, esse conjunto de estudos pode auxiliar na compreensão de alguns eventos relacionados à ocorrência e prevenção da luteólise prematura.

No presente estudo, a intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER e PR fornecida pelo software ImageJ foi utilizada como forma de estimar a concentração protéica (BRIDGES, 2007), pois essa metodologia é menos subjetiva que os sistemas

tradicionais de escore visual de coloração e, portanto, mais precisa. Para cada receptor avaliado, a porcentagem de núcleos positivos e a intensidade de coloração dos núcleos positivos apresentaram correlação positiva ou nula na maioria das análises referentes a células epiteliais, sendo que as únicas observações de correlação negativa ocorreram no estroma subepitelial: no Experimento 3, apenas no Dia 5, houve correlação negativa entre porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração dos núcleos positivos para ER no estroma subepitelial superficial e nos Experimentos 2 e 3, independente de dia, houve correlação negativa entre porcentagem de núcleos positivos e intensidade de coloração dos núcleos positivos para PR no estroma subepitelial profundo. O fato de que na maioria das análises foram observadas correlação positiva ou nula torna os resultados mais confiáveis e de melhor compreensão, pois uma correlação negativa causa confundimento no tocante a qual variável (porcentagem de núcleos positivos ou intensidade de coloração dos núcleos positivos) seria mais importante ou impactante, o que ainda é desconhecido.

No Experimento 1, não houve efeito da fase de desenvolvimento folicular nas expressões gênicas da ER, PR, OTR, COX-1 e COX-2. Além disso, a fase de desenvolvimento folicular influenciou poucas variáveis relacionadas à luteólise. De forma geral, há consenso na literatura de que ocorre estímulo à expressão de ER e OTR durante o proestro e estro (MEYER et al., 1988; BOOS et al., 1996; ROBINSON et al., 2001), possivelmente em resposta às concentrações circulantes de E2. Assim, é provável que, na vaca em anestro, as concentrações circulantes de E2 sejam insuficientes para causar alterações significativas no endométrio, ou ainda que a pré-exposição à P4 seja necessária

para que o E2 exerça seus efeitos clássicos mais relevantes sobre o endométrio, uma vez que em vacas e ovelhas ovariectomizadas, o tratamento com E2 elevou a resposta endometrial a injeções de OT apenas quando houve pré-exposição à P4 (HOMANICS & SILVIA, 1988; MANN et al., 2001; LAU et al., 1993; KAMINSKI et al., 1997; WALKER et al., 1997).

Em ovinos, explantes de células endometriais cultivadas em meio livre de esteróides apresentaram elevação significativa e espontânea das expressões gênica e protéica de OTR, mesmo quando a expressão de OTR *in vivo* encontrava-se em níveis muito baixos no momento da colheita (SHELDRIK et al., 1993; LEUNG & WATHES, 1999; LEUNG & WATHES, 2000). Em novilhas pré-púberes, a expressão uterina de OTR é maior em relação ao observado em novilhas cíclicas durante a fase luteal e equivalente aos níveis observados durante o estro (FUCHS et al., 1998). Esses dados, portanto, indicam que a P4 exerce função constantemente reguladora inibitória sobre ER e OTR, de forma que a sua ausência pode permitir que eles se expressem intensamente. Avaliando os dados dos Experimentos 1, 2 e 3 relativos à expressão gênica de ER e OTR, e à expressão protéica de ER verifica-se que, de maneira geral, as mesmas encontram-se elevadas nas vacas durante o anestro e que o tratamento com P4 reduziu essas expressões não somente nos Dias -2 e 0, mas também no Dia 5. Os presentes estudos não apresentaram tratamentos com vacas cíclicas, porém seus resultados indicam que provavelmente essas expressões são menores na vaca cíclica durante a fase luteal em relação às vacas em anestro, devido ao efeito de P4 endógena. De fato, Robinson et al. (2001) encontraram redução nas expressões de ER e OTR em vacas cíclicas no decorrer da fase luteal, sendo que os OTR

apresentaram-se em níveis indetectáveis a partir da metade do ciclo estral, e Horn et al. (1997) observaram que a expressão gênica endometrial de OTR em bovinos no momento do estro é maior que no sétimo dia do ciclo estral.

No Experimento 2, apesar da ausência de efeito de tratamento na expressão gênica de PR, o tratamento com P4 elevou a expressão protéica de PR em algumas regiões endometriais, concordando com um estudo prévio (ZOLLERS et al., 1993), no qual vacas intactas em anestro pré-tratadas com norgestomet e induzidas a ovular (Dia 0) apresentaram menor concentração de OTR e maior concentração de PR no endométrio no Dia 5 em relação aos que foram induzidos a ovular sem tratamento com progestágenos. Em animais cíclicos, o E2 pré-ovulatório estimula a expressão da PR no útero no início da fase luteal (OTTOBRE et al., 1984) e, portanto, é provável que a pré-exposição à P4 seja essencial para que o E2 possa exercer essa ação potencialmente desfavorável à luteólise prematura. Além dos efeitos sobre PR e OTR, o tratamento com CIDR reduziu não só a expressão gênica de ER nos Dias -2, 0 e 5, mas também influenciou negativamente a expressão protéica de ER em algumas regiões endometriais. Em células tumorais de mama humana, a P4 reduziu as expressões gênica e protéica de ER, provavelmente devido a uma inibição na transcrição do gene de ER, uma vez que o efeito se deu rapidamente e sem redução na meia-vida do mRNA de ER (READ et al., 1989; ALEXANDER et al., 1990).

No Experimento 3, a ausência de efeito de dia nas expressões gênicas de ER e PR discorda do que foi verificado em vacas cíclicas por Robinson et al. (2001), nas quais a expressão gênica de ambos receptores apresentou-se elevada nos períodos de proestro e estro, decrescendo em seguida. No entanto, a expressão gênica de OTR nas vacas do

tratamento FG foi maior no Dia 0 e menor no Dia 5 em relação às vacas do tratamento FP. Em fêmeas ruminantes cíclicas, a concentração endometrial de OTR diminui progressivamente ao longo da fase luteínica e aumenta nos momentos prévios à luteólise (MIRANDO et al., 1993; STEVENSON et al., 1994). Estudos em ovelhas demonstraram que apenas a queda na concentração circulante de P4 foi suficiente para iniciar a expressão de OTR, mas a administração de E2 no momento da retirada da P4 maximizou o estímulo à expressão gênica de OTR (LEAVITT et al., 1985; VALLET et al., 1990; ZHANG et al., 1992), pois o E2 acelera a expressão gênica de OTR (LEUNG & WATHES, 1999) e possivelmente ativa OTR pré-existentes (HIXON & FLINT, 1987; PARKINSON et al., 1990).

A elevação da expressão endometrial de OTR no proestro/estro termina dentro de 2 a 3 dias após o estro, e os OTR são inibidos, voltando aos níveis basais (MEYER et al., 1988; FUCHS et al., 1990; HORN et al., 1998). Em ruminantes cíclicos, elevadas concentrações pré-ovulatórias de E2 resultaram em inibição da expressão de OTR no endométrio e ausência de secreção de $\text{PGF2}\alpha$ em resposta ao desafio com OT durante os primeiros dias da fase luteal (Lamming & Mann, 1995a,b). Em um estudo com vacas ovariectomizadas, Mann & Lamming (2000) verificaram que, também na ausência de pré-exposição à P4, o E2 inibiu a expressão de OTR de forma dose dependente. Vallet et al. (1990), em estudo com ovelhas ovariectomizadas, verificaram que o E2 apresenta efeitos contraditórios sobre a expressão da OTR no endométrio, variando de acordo com o tempo, de forma que inicialmente (1 a 2 dias) o efeito é estimulatório e posteriormente (5 dias) inibitório.

É possível que o efeito inibitório do E2 na expressão de OTR no endométrio seja em decorrência de alterações na expressão de ER, uma vez que Cherry et al. (1991) observaram que a concentração de ER foi reduzida após o estro, antes que as concentrações circulantes de P4 se elevassem. Apesar de no Experimento 3 não terem sido observados efeitos de tratamento e dia nas expressões gênicas de ER e PR, a expressão protéica desses receptores foi alterada em algumas regiões endometriais, sendo a expressão de ER geralmente maior nas vacas do tratamento FP e a expressão de PR geralmente maior nas vacas do tratamento FG. Os efeitos de tratamento sobre PR ocorreram em mais regiões do que sobre os ER, o que pode ser devido ao fato de que o E2 pré-ovulatório estimula a expressão da PR no útero no início da fase luteal (OTTOBRE et al., 1984), como discutido anteriormente. É provável, portanto, que a luteólise prematura observada quando vacas em anestro pré-expostas à P4 ou cíclicas ovulam folículos de pequeno diâmetro (VASCONCELOS et al., 2001; TAPONEN et al., 2003; PETERS & PURSLEY, 2003) seja decorrente de elevada expressão de OTR associada a expressão insuficiente de PR nos primeiros dias pós-ovulação. Entretanto, o delineamento do Experimento 3 não permite concluir se os efeitos de tratamento observados nas variáveis no Dia 5 foram devidos diferenças nas concentrações pré-ovulatórias de E2 ou a diferenças nas concentrações circulantes de P4 após a ovulação.

Em relação às enzimas COX-1 e COX-2, os resultados de expressão gênica dos Experimentos 1, 2 e 3 indicam que essas enzimas não são as principais responsáveis pelo desencadeamento da luteólise prematura.

1.2. Histomorfometria uterina

No presente conjunto de estudos, observou-se que: 1) a histomorfometria uterina não se alterou durante o desenvolvimento folicular em vacas em anestro, nem mesmo quando as mesmas foram submetidas à remoção de bezerros (Experimento 1); 2) o tratamento com P4 em vacas em anestro provocou alterações histológicas, geralmente hipertróficas ou hiperplásicas, na maioria dos tipos celulares e estruturas endometriais (Experimento 2); 3) quando vacas em anestro foram pré-tratadas com P4 e induzidas a ovular, o diâmetro do folículo ovulatório influenciou positivamente apenas a altura das células epiteliais glandulares profundas, a quantidade de ductos glandulares por unidade de área endometrial e a área glandular percentual, de forma que a maioria das alterações morfológicas observadas foram influenciadas pelo estágio fisiológico da vaca (dia; Experimento 3).

Métodos desenvolvidos recentemente para avaliação morfométrica de tecidos têm permitido avaliar quantitativamente alterações fisiológicas cíclicas no útero de ruminantes (DHALIWAL et al., 2002). Estudos avaliando a histomorfologia uterina em ruminantes têm utilizado como modelo experimental fêmeas cíclicas em diferentes fases do ciclo estral (WANG et al., 2007), fêmeas em início de gestação (GUILLOMOT & GUAY, 1982) ou fêmeas ovariectomizadas e suplementadas com E2 e P4 exógenos (MURRAY, 1992; JOHNSON et al., 1997a). De forma geral, alterações morfológicas na espessura e nas glândulas endometriais são resultantes de efeitos diretos e interações entre esteróides ovarianos, fatores de crescimento e componentes locais presentes na matriz extracelular (GRAY et al., 2001; WANG et al., 2007). Entretanto, o presente conjunto de experimentos

é o primeiro de nosso conhecimento que avaliou parâmetros histomorfométricos uterinos em vacas *Bos indicus* em anestro e submetidas a tratamentos para alterar as concentrações circulantes de P4 e E2.

No Experimento 1, não se observou nenhum efeito da fase de desenvolvimento folicular nas variáveis morfométricas avaliadas. Em ovelhas cíclicas, concentrações elevadas de E2 pré-ovulatório causaram aumento no peso uterino, na proporção RNA:DNA e na proporção proteína:DNA (JOHNSON et al., 1997a,b). São escassos, no entanto, trabalhos avaliando os efeitos do E2 na morfologia uterina de ruminantes em anestro. Em um estudo prévio (MURRAY, 1992), ovelhas ovariectomizadas e tratadas com implante que forneceu 5 a 10 pg/mL de E2 circulante apresentaram hipertrofia do epitélio uterino no segundo dia do tratamento. Além disso, ratos modificados geneticamente para não expressarem PR apresentaram hipertrofia do epitélio uterino, como resultado de uma maior expressão de ER decorrente da ausência de inibição da P4 (LYDON et al., 1995). Pelo fato de a expressão de ER ter sido elevada em todas as regiões endometriais para todos os tratamentos, a similaridade entre os tratamentos nos resultados de histomorfometria indica que durante a condição de anestro as concentrações endógenas de E2 podem não ser suficientes para causar alterações morfológicas no útero.

Concordando com a possibilidade de que a pré-exposição à P4 potencializa o efeito do E2 na proliferação tecidual endometrial, no Experimento 2 observou-se que o tratamento com CIDR[®] aumentou a altura das células epiteliais luminiais, a área glandular relativa às áreas endometrial e uterina total e, nos Dias -2 e 0 do experimento, a altura das células epiteliais glandulares profundas, a área endometrial percentual e o perímetro das

glândulas endometriais profundas. Em estudo prévio (JOHNSON et al., 1997a), ovelhas ovariectomizadas tratadas com P4 e E2 apresentaram células maiores e com maiores proporções RNA:DNA e proteína:DNA em relação a ovelhas tratadas apenas com E2. De forma semelhante, em ovelhas cíclicas, as concentrações circulantes de P4 e E2 promoveram hipertrofia celular, elevando o peso uterino (JOHNSON et al., 1997b). Esses dados em conjunto levaram os autores a sugerir que, em ovelhas, a P4 eleva a sensibilidade dos tecidos uterinos ao E2.

Apesar da possibilidade de que algumas regiões endometriais se desenvolvem normalmente mesmo sem pré-exposição à P4, os resultados do Experimento 2 evidenciaram que a suplementação com P4 em vacas em anestro promoveu alterações proliferativas potencialmente importantes para que o endométrio tenha capacidade secretória adequada à manutenção da gestação. Os diversos e complexos mecanismos de ação da P4 ainda não são compreendidos, entretanto é bastante evidente que a P4 pode estimular ou inibir a proliferação celular no útero dependendo do tipo celular ou contexto fisiológico (GRAHAM & CLARKE, 1997). Os efeitos da P4 nas funções celulares incluem estímulo à glicogênese (DEMERS et al., 1977; SHAPIRO et al., 1980), metabolismo cíclico de nucleotídeos (SAVOURET et al., 1990), síntese e eliminação de proteínas (SAVOURET et al., 1990) e regulação do ciclo celular (CLARKE & SUTHERLAND, 1990). Essas observações, adicionadas aos resultados dos Experimentos 1 e 2, indicam que a pré-exposição à P4 é essencial à concepção não só porque previne a luteólise prematura, mas também porque pode auxiliar na preparação do útero para a gestação. Isso implica que estratégias alternativas à P4 podem resultar em baixas taxas de

concepção, mesmo sendo eficazes em prevenir a luteólise prematura, se não promoverem as alterações adequadas no endométrio.

De forma geral, na maior parte das variáveis histomorfométricas avaliadas nos Experimentos 2 e 3, houve proliferação tecidual progressiva do início do proestro (Dia -2) até a fase luteal inicial (Dia 5), concordando com Wang et al. (2007). Trabalhos com ovelhas realizados por Moore (1985) e Wilmut et al. (1986) mostraram que três estágios de exposição esteroideal são necessários para o desenvolvimento de um ambiente uterino favorável à concepção, sendo uma fase de exposição à P4 imediatamente antes do estro, seguindo-se uma fase de concentrações crescentes de E2 no estro e, finalmente, a manutenção de concentrações de P4 suficientes no ciclo estral subsequente. Essa seqüência determina diversos eventos reprodutivos e comportamentais, entre eles a dinâmica de proliferação celular e secreção endometrial (GRAY et al., 2001).

No Experimento 3, os tratamentos simularam a seqüência esteroideal fisiológica hipotetizada nos trabalhos de Moore (1985) e Wilmut et al. (1986) alterando-se, no entanto, as concentrações circulantes de E2 pré-ovulatório e de P4 na fase luteal subsequente à ovulação. Através desse delineamento, observou-se que as vacas do tratamento FG, independente de dia, apresentaram maior altura das células epiteliais glandulares profundas e densidade de ductos glandulares, resultando, portanto, em maior área glandular em relação às áreas endometrial e uterina. Além disso, o perímetro das glândulas endometriais profundas no Dia 5 foi maior nas vacas do tratamento FG em relação às vacas do tratamento FP. Esses resultados estão de acordo com as descrições clássicas da literatura sobre os efeitos dos esteróides no desenvolvimento das glândulas

endometriais, segundo as quais as glândulas endometriais crescem em quantidade e comprimento e suas células aumentam em altura sob influência do E2, enquanto as glândulas se tornam mais tortuosas, ramificadas e secretivas, e edema na região do estroma é reduzido sob influência da P4 (JOHNSON, 1965; MURRAY, 1992). Além das concentrações circulantes de esteróides nos Dias 0 e 5, diferenças na distribuição e concentração dos receptores endometriais de esteróides podem ter contribuído para a maior proliferação tecidual endometrial nas vacas do tratamento FG, já que nesse grupo, de forma geral, houve maior expressão de PR e menor de ER em relação às vacas do tratamento FP.

2. Conclusões e implicações

Considerando os resultados dos Experimentos 1, 2 e 3, conclui-se que: 1) em vacas em anestro, o desenvolvimento folicular de 7,0 mm até 10,0 mm aumentou apenas a porcentagem de núcleos positivos para ER no estroma subepitelial profundo, não alterando a histomorfometria uterina, a expressão de genes relacionados à luteólise e a expressão de PR. Após RB por 48 horas, houve elevação apenas da expressão dos ER e PR apenas em algumas regiões específicas do endométrio, como epitélio glandular e estroma subepitelial; 2) o tratamento com P4 em vacas em anestro causou alterações temporais e locais no endométrio que podem favorecer o desenvolvimento embrionário, como proliferação do tecido glandular, e desfavorecer a secreção de $\text{PGF2}\alpha$, reduzindo o risco potencial de luteólise prematura; 3) a diminuição no diâmetro do folículo ovulatório em vacas em anestro pré-tratadas com P4 causou alterações temporais e locais no endométrio que podem

desfavorecer o desenvolvimento embrionário, como menor proliferação do tecido glandular, e favorecer a secreção de $\text{PGF2}\alpha$, aumentando o risco potencial de luteólise prematura.

Com base nos presentes estudos, é possível idealizar alguns cenários fisiológicos relacionados à ocorrência e prevenção da luteólise prematura. De acordo com os resultados, os ER e OTR no endométrio estão expressos em níveis elevados durante o período do anestro, provavelmente devido às baixas concentrações circulantes de esteróides, principalmente P4 (Figura 27 – Painel A). Após a ovulação espontânea ou induzida sem pré-exposição à P4, a expressão desses receptores continua elevada nos primeiros dias pós-ovulação. A baixa concentração de E2 pré-ovulatório geralmente observada em vacas em anestro ovulando espontaneamente ou por indução sem pré-exposição à P4 pode contribuir para que a expressão dos receptores continue alta após a ovulação, entretanto esse evento não é essencial para que a luteólise prematura ocorra, uma vez que em estudos prévios o tratamento apenas com E2 previamente à indução da ovulação não foi capaz de reduzir a incidência de luteólise prematura em vacas (SÁ FILHO et al., 2009a) e ovelhas (MANN & HARESIGN, 2001). A elevação nas concentrações circulantes de P4 durante os primeiros dias do ciclo estral provavelmente aumenta a expressão da enzima COX-2 nas células endometriais. Neste momento, as células endometriais contêm ER e OTR expressos em elevadas concentrações e, portanto, são capazes de responder ao E2 produzido pelo folículo da primeira onda folicular pós-ovulação e à OT endógena, sintetizando e secretando $\text{PGF2}\alpha$. Dessa forma, assim que o CL adquire capacidade luteolítica já há concentrações circulantes de $\text{PGF2}\alpha$ suficientes

regredi-lo (Figura 27 – Painel B).

Quando vacas são pré-expostas à P4, a expressão dos ER e OTR no endométrio é reduzida, e essa menor expressão permanece durante os primeiros dias pós-ovulação, reduzindo a capacidade do endométrio em responder aos estímulos luteolíticos do E2 e da OT. Além disso, o pré-tratamento com P4 promove elevação na expressão de PR em determinadas regiões do endométrio, que potencialmente maximiza os efeitos da P4 em bloquear eventos favoráveis à luteólise. Alguns efeitos da P4 preventivos à luteólise no início da fase luteal, como redução na expressão gênica da OTR, redução da expressão protéica de ER e elevação da expressão protéica de PR em algumas regiões endometriais, podem ser maximizados através da ovulação de folículos de tamanho adequado (Figura 27 – Painel C). Provavelmente por esse motivo, a incidência de luteólise prematura em vacas cíclicas aumenta quando as mesmas ovulam folículos de pequeno tamanho (Figura 27 – Painel D). Entretanto, não foi possível determinar através desta série de estudos se esse efeito positivo do tamanho folicular é devido às maiores concentrações circulantes de E2 pré-ovulatório, de P4 no início da fase luteal, ou ambos. São necessários, portanto, estudos futuros para melhor compreensão desse fenômeno.

Os efeitos observados dos tratamentos na histomorfometria uterina indicam que pré-exposição à P4 e diâmetro folicular durante o proestro são fatores importantes à preparação uterina para a gestação. Assim, estratégias de indução de ciclicidade devem prover pré-exposição à P4 e ovulação de folículos de tamanho adequado visando não apenas prevenir a luteólise prematura, mas também proporcionar as alterações necessárias para que o endométrio esteja adequado à manutenção da gestação.

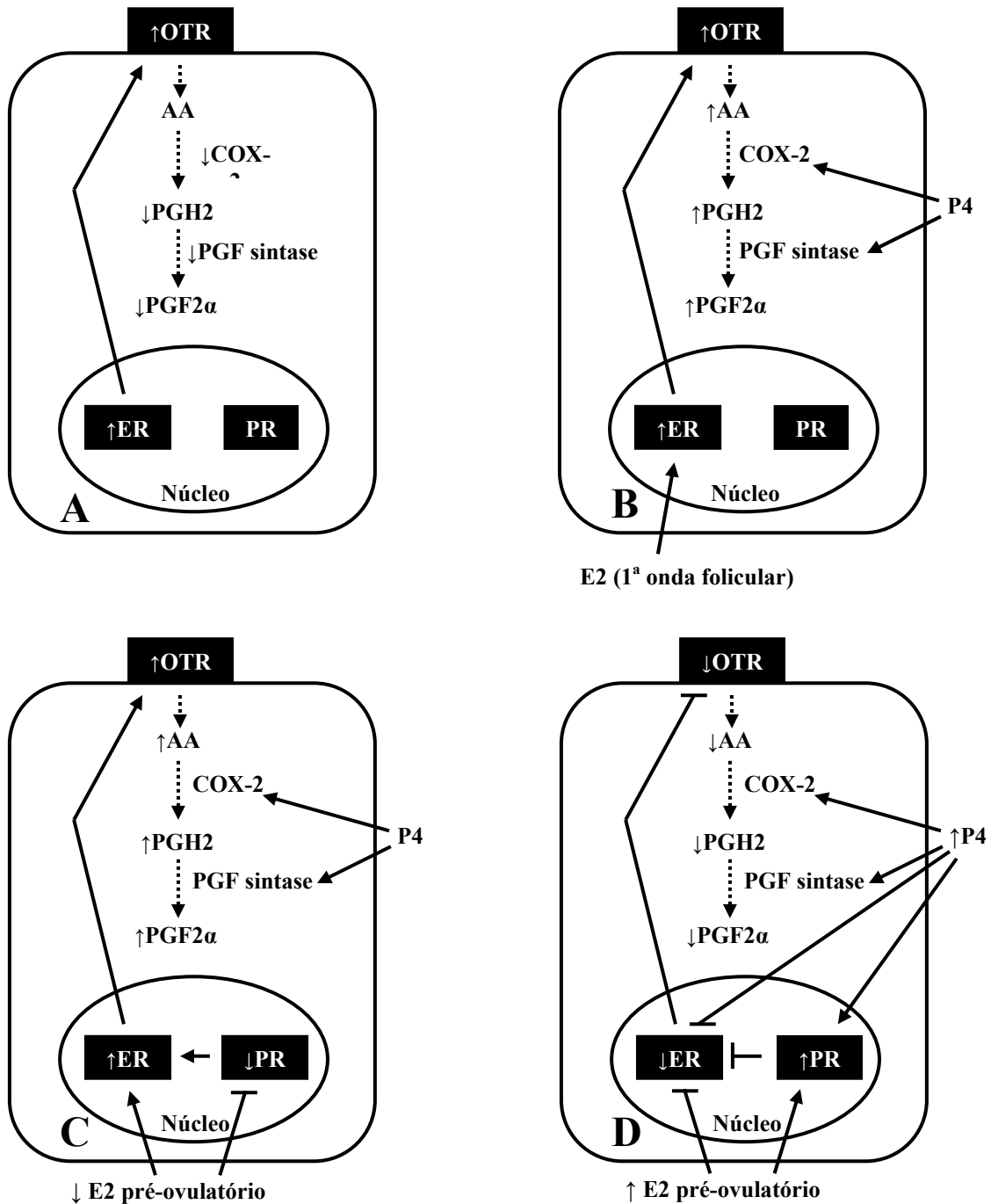


Figura 27: Diagrama esquemático dos prováveis mecanismos endócrinos e moleculares endometriais que causam e previnem a luteólise prematura em bovinos, baseado nos resultados da presente tese (ver texto). AA: ácido aracdônico; CL: corpo lúteo; ER: receptor endometrial de estradiol; E2: estradiol; OTR: receptor endometrial de ocitocina; PR: receptor endometrial de progesterona; PGF2 α , prostaglandina F2 α ; PGF sintase: prostaglandina F sintase; PGH2: prostaglandina H2; P4: progesterona; $\cdots \blacktriangleright$: “leva a”, “induz”; \uparrow : efeito estimulatório; \top : efeito inibitório. Painel A: durante o anestro pós-parto; Painel B: após a primeira ovulação pós-parto sem pré-exposição à P4; Painel C: no início de um ciclo estral precedido por exposição à P4, porém com ovulação de folículo de pequeno diâmetro; Painel D: no início de um ciclo estral precedido por exposição à P4 e com ovulação de folículo de diâmetro adequado.

3. Referências bibliográficas

- ACCONCIA, F.; MARINO, M. Synergism between genomic and non genomic estrogen action mechanism. **IUBMB Life**, v.55, p.145-150, 2003.
- ACOSTA, B.; TARNAVSKY, G. K.; PLATT, T. E.; HAMERNIK, D. L.; BROWN, J. L.; SCHOENEMANN, H. M.; REEVES, J. J. Nursing enhances the negative effect of estrogen on LH release in the cow. **J. Anim. Sci.**, v.57, p.1530-1536, 1983.
- ALEXANDER, I. E.; SHINE, J.; SUTHERLAND, R. L. Progestin regulation of estrogen receptor messenger RNA in human breast cancer cells. **Mol. Endocrinol.**, v.4, p.821-828, 1990.
- ARAÚJO, R. R.; GINTHER, O. J.; FERREIRA, J. C.; PALHÃO, M. M.; BEG, M. A.; WILTBANK, M. C. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. **Biol. Reprod.**, v.81, p.426-437, 2009.
- ARMSTRONG, D. T.; HANSEL, W. Alteration of the bovine estrous cycle with oxytocin. **J. Dairy Sci.**, v.42, p.533-542, 1959.
- ASSELIN, E.; DROLET, P.; FORTIER, M. A. *In vitro* response to oxytocin and interferon-tau in bovine endometrial cells from caruncular and inter-caruncular areas. **Biol. Reprod.**, v.59, p.241-247, 1998.
- ASSELIN, E.; GOFF, A. K.; BERGERON, H.; FORTIER, M. A. Influence of sex steroids on the production of Prostaglandin F_{2α} and E₂ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biol. Reprod.**, v.54, p.371-379, 1996.

- BEARD, A. P.; HUNTER, M. G. Effects of bovine follicular fluid and exogenous estradiol on the GnRH-induced short luteal phase in anoestrus. **J. Reprod. Fertil.**, v.100, p.211-217, 1994.
- BEARD, A. P.; LAMMING, G. E. Oestradiol concentration and the development of uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF₂ α release in ewes. **J. Reprod. Fertil.**, v.100, p.469-475, 1994.
- BEEL, S. C. Secretory endometrial/decidual proteins and their function in early pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v.36, p.109-125, 1988.
- BERGSTROM, S.; DANIELSSON, H.; KLENBERG, D.; SAMUELSSON, R. The enzymatic conversion of essential fatty acids into prostaglandins. **J. Biol. Chem.**, v.239, p.4006-4009, 1964.
- BOOS, A.; MEYER, W.; SCHWARZ, R.; GRUNERT, E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.44, p.11-21, 1996.
- BORCHERT, K. M.; FARIN, C. E.; WASHBURN, S. P. Effect of synchronization with norgestomet on the integrity of oocytes from persistent follicles in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.77, p.2742-2748, 1999.
- BRADEN, T. D.; KING, M. E.; ODDE, K. G.; NISWENDER, G. D. Development of preovulatory follicles expected to form short-lived corpora lutea in beef cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.85, p.97-104, 1989b.

- BRADEN, T. D.; KING, M. E.; ODDE, K. G.; NISWENDER, G. D. Functional and morphological characteristics of the first corpus luteum after parturition in ewes. **J. Reprod. Fertil.**, v.86, p.525-533, 1989a.
- BRIDGES, G. A. **Impact of preovulatory estradiol concentrations on mechanisms affecting fertility in cattle.** Columbus, OH, 2007, 272p. Thesis (Doctor of Philosophy) – Department of Animal Science, Ohio State University.
- BURNS, P. D.; GRAF, G. A.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF_{2α} synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A₂. **Dom. Anim. Endocrin.**, v.14, p.181-191, 1997.
- BURNS, P. D.; GRAF, G. A.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Effect of oxytocin on expression of cytosolic phospholipase A₂ mRNA and protein in ovine endometrial tissue *in vivo*. **Dom. Anim. Endocrin.**, v.19, p.237-246, 2000.
- BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.61, p.449-457, 2000.
- CANINO, C. J.; REED, J.; SHEMESH, M.; CHANG, S. M. T.; MARINO, V. K.; HIERS, E. A.; BINTA, H.; LUCE, B. R.; THATCHER, W. W.; FIELDS, M. J. Induction of prostaglandin synthesis via LH/hCG-mediated receptors in the bovine uterus. **Biol. Reprod.**, v.60 (Suppl. 1), p.262, 1999 (abstract).
- CHALBOS, D.; GALTIER, F. Differential effect of forms A and B of human progesterone receptor on estradiol-dependent transcription. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.23007-23012, 1994.

- CHERY, R. A.; SALAMONSEN, L. A.; FINDLAY, J. K. Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in the endometrium of the ewe. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.3, p.321-331, 1991.
- CLARKE, C. L.; SUTHERLAND, R. L. Progesterin regulation of cellular proliferation. **Endocr. Rev.**, v.11, p.266-301, 1990.
- COHN, S. M.; SCHOLOEMANN, S.; TESSNER, T.; SEIBRIT, K.; STENSON, W. F. Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. **J. Clin. Inv.**, v.99, p.1367-1379, 1997.
- COOPER, D. A.; CARVER, D. A.; VILLENEUVU, P.; SILVIA, W. J.; INSKEEP, E. K. Effects of progestogen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.91, p.411-421, 1991.
- COPELIN, J. P.; SMITH, M. F.; GARVERICK, H. A.; YOUNGQUIST, R. S. Effect of the uterus on subnormal luteal function in anestrus beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.64, p.1506-1511, 1987.
- COPELIN, J. P.; SMITH, M. F.; KEISLER, D. H.; GARVERICK, H. Effect of active immunization of pre-partum and post-partum cows against prostaglandin $F_{2\alpha}$ on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. **J. Reprod. Fertil.**, v.87, p.619-630, 1989.
- COUSE, J. F.; KORACH, K. S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? **Endocr. Rev.**, v.20, p.358-417, 1999.

- DAHLMAN-WRIGHT, K.; CAVAILLES, V.; FUQUA, S. A.; JORDAN, V. C.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KORACH, K. S.; MAGGI, A.; MURAMATSU, M.; PARKER, M. G.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptors. **Pharmacol. Rev.**, v.58, p.773-781, 2006.
- DAMBER, J. E.; CAJANDER, S.; GAFVELS, M.; SELSTAM, G. Blood flow changes and vascular appearance in preovulatory follicles and corpora lutea in immature pregnant mare's serum gonadotropin-treated rats. **Biol. Reprod.**, v.37, p.651-658, 1987.
- DAY, M. L.; ANDERSON, L. H. Current concepts on the control of puberty in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1-15, 1998.
- DEMERS, L. M.; FEIL, P. D.; BARDIN, C. W. Factors that influence steroid induction of endometrial glycogenesis in organ culture. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.286, p.249-259, 1977.
- DHALIWAL, G. S.; MURRY, R. D.; REES, E. M.; HOWARD, C. V.; BEECH, D. J. Quantitative unbiased estimates of endometrial gland surface area and volume in cycling cows and heifers. **Res. Vet. Sci.**, v.73, p.259-265, 2002.
- EDWARDS, S. The effects of short term calf removal on pulsatile LH secretion in the postpartum beef cow. **Theriogenology**, v.23, p.777-785, 1985.

- FIKE, K. E.; DAY, M. L.; INSKEEP, E. K.; KINDER, J. E.; LEWIS, P. E.; SHORT, R. E.; HAFS, H. D. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. **J. Anim. Sci.**, v.75, p.2009-2015, 1997.
- FREIDMAN, S.; GUREVICH, M.; SHEMESH, M. Bovine cyclic endometrium contains high-affinity luteinizing hormone/ human chorionic gonadotropin binding sites. **Biol. Reprod.**, v.52, p.1020-1026, 1995.
- FUCHS, A. R.; BEHRENS, O.; HELMER, H.; LIU, C-H.; BARROS, C. M.; FIELDS, M. J. Oxytocin and vasopressin receptor in bovine endometrium and myometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v.127, p.629-636, 1990.
- FUCHS, A. R.; DROLET, P.; FORTIER, M. A.; BALVERS, M.; FIELDS, M. J. Ontogeny of oxytocin receptors and oxytocin-induced stimulation of prostaglandin synthesis in prepubertal heifers. **Endocrinology**, v.139, p.2755-2764, 1998.
- FUCHS, A. R.; FIELDS, M. J.; FREIDMAN, S.; SHEMESH, M.; IVELL, R. Oxytocin and the timing of parturition. Influence of oxytocin receptor gene expression, oxytocin secretion, and oxytocin-induced prostaglandin F_{2α} and E₂ release. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.395, p.405-420, 1995.

- FUJIMOTO, J.; ICHIGO, S.; HIROSE, R.; SAKAGUCHI, H.; TAMAYA, T. Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.62, p.449-454, 1997.
- GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P. E.; DEAVER, D. R.; SMITH, V. G.; LEWIS, G. S.; INSKEEP, E. K. Endocrine profiles associated with lifespan of induced corpora lutea in postpartum beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.62, p.1353-1362, 1986.
- GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P. E.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K. Effects of norgestomet on follicular development in post-partum beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.64 (Suppl.1), p.1099 (Abstract), 1987.
- GARRET, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; GRIES, L. K.; WETTEMANN, R. P.; BUCHANAN, D. S. Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F2 alpha release and the interestrus interval in the bovine. **Prostaglandins**, v.36, p.95-96, 1988.
- GARVERICK, H. A.; PARFET, J. R.; LEE, C. N.; COPELIN, J. P.; YOUNGQUIST, R. S.; SMITH, M. F. Relationship of pre- and post-ovulatory gonadotropin secretion to subnormal luteal function in postpartum beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.66, p.104-111, 1988.
- GARVERICK, H. A.; ZOLLERS, W. G.; SMITH, M. F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Anim. Reprod. Sci.**, v.28, p.111-124, 1992.

- GONZÁLEZ, H. E.; CROWELL, W. A.; CAUDLE, A. B.; THOMPSON, F. N.
Morphometric studies of the bovine uterus: microscopic lesions and retrospective reproductive history. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.2588–2595, 1985.
- GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocr. Rev.**, v.18, p.502-519, 1997.
- GRAY, C. A.; BARTOL, F. F.; TARLETON, B. J.; WILEY, A. A.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Developmental biology of uterine glands. **Biol. Reprod.**, v.65, p. 1311-1323, 2001.
- GRAZZINI, E.; GUILLON, G.; MOUILLAC, B.; ZINGG, H. H. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. **Nature**, v.392, p.509-512, 1998.
- GUILLOMOT, M.; GUAY, P. Ultrastructural features of the cell surfaces of uterine and trophoblastic epithelia during embryo attachment in the cow. **Anat. Rec.**, v.204, p.315–322, 1982.
- HANSEL, W.; BLAIR, R. M. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. **Theriogenology**, v.45, p.1267-1294, 1996.
- HENRICKS, D. M.; LONG, J. T.; HILL, J. R. The various effects of prostaglandin F_{2α} during various stages of estrous cycle of beef heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.41, p.113-120, 1974.

- HIXON, J. E.; FLINT, A. P. F. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2alpha secretion in sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v.79, p.457-467, 1987.
- HIXON, J.; HANSEL, W. Preferential transfer of prostaglandin F_{2α} to the ipsilateral ovarian artery following intrauterine administration in cattle. **Biol. Reprod.**, v.11, p.543-552, 1974.
- HOMANICS, G. E.; SILVIA, W. J. Effects of progesterone and estradiol-17β on uterine secretion of prostaglandin F_{2α} in response to oxytocin in ovariectomized ewes. **Biol. Reprod.**, v.38, p.804-811, 1988.
- HORN, S.; BATHGATE, R.; LIOUTAS, C.; BRACKEN, K.; IVELL, R. Bovine endometrial epithelial cells as a model system to study oxytocin receptor regulation. **Hum. Reprod. Update**, v.4, p.605-614, 1998.
- HOUGHTON, P. L.; LEMENAGER, R. P.; HORSTMAN, L. A.; HENDRIX, K. S.; MOSS, G. E. 1990. Effects of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.1438–1446, 1990.
- HUNTER, M. G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. **J. Reprod. Fertil.**, v.43, p.91-99, 1991.

- INSKEEP, E. K.; BRADEN, T. D.; LEWIS, P. E.; GARCIA-WINDER, M.; NISWENDER, G. D. Receptors for luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in largest follicles of post-partum beef cows. **Biol. Reprod.**, v.38, p.587-591, 1988.
- JOHANNISSON, E.; BROSENS, I.; CORNILLIE, F.; ELDER, M.; WHITE, J.; SHEPPARD, B.; HORIHAN, H.; D'ARCANGUES, C.; BELSEY, E. M. Morphometric study of the human endometrium following continuous exposure to levonorgestrel released from vaginal rings during 90 days. **Contraception**, v.43, p.361–371, 1991.
- JOHNSON, K. R. Cyclic histological changes occurring in the endometrium of the bovine. **Res. Bull.**, v.63, p.1-20, 1965.
- JOHNSON, M. L.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Effects of ovarian steroids on uterine growth, morphology, and cell proliferation in ovariectomized, steroid-treated ewes. **Biol. Reprod.**, v.57, p.588-596, 1997a.
- JOHNSON, M. L.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Uterine growth, cell proliferation and *c-fos* proto-oncogene expression throughout the estrous cycle in ewes. **Biol. Reprod.**, v.56, p.393-401, 1997b.
- JOLLY, P. D.; MCDOUGALL, S.; FITZPATRICK, L. A.; MACMILLAN, K. L.; ENTWISTLE, K. W. Physiological effects of undernutrition on postpartum anoestrus in cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.49 (Suppl.), p.477–492, 1995.

- KESLER, D. J.; WESTON, P. G.; PIMENTEL, C. A.; TROXEL, T. R.; VICENT, D. L.; HIXON, J. E. Diminution of the in vitro response to luteinizing hormone by corpora lutea induced by gonadotropin releasing hormone treatment of post-partum suckled beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.53, p.749-754, 1981.
- KIEBORZ-LOOS, K. R.; GARVERICK, H. A.; KEISLER, D. H.; HAMILTON, S. A.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S.; SMITH, M. F. Oxytocin-induced secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in postpartum beef cows: effects of progesterone and estradiol- 17β treatment. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.1830–1836, 2003.
- KIM, J. J.; FORTIER, M. A. Cell type specificity and protein kinase C dependency on the stimulation of prostaglandin E_2 and prostaglandin $F_{2\alpha}$ production by oxytocin and platelet-activating factor in bovine endometrial cells. **J. Reprod. Fertil.**, v.103, p.239-247, 1995.
- KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, I. D.; MISZKIEL, G.; MELIN, P.; OKUDA, K. Oxytocin modulates the pulsatile secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in initiated luteolysis in cattle. **Res. Veter. Scien.**, v.66, p.1-5, 1998.
- KRAUS, W. L.; WEIS, K. E.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Inhibitory crosstalk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progestin receptors. **Mol. Cell. Biol.**, v.15, p.1847-1857, 1995.
- KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.93, p.5925-5930, 1996.

- LAFRANCE, M.; GOFF, A. K. Effects of progesterone and oestradiol-17 β on oxytocin-induced release of prostaglandin F_{2 α} . **J. Reprod. Fertil.**, v.82, p.429-436, 1988.
- LAMMING, G. E.; MANN, G. E. A dual role for progesterone in the control of cyclicity in domestic ruminants. **J. Reprod. Fertil.**, v.49, p.561-566, 1995a.
- LAMMING, G. E.; MANN, G. E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F_{2 α} responses to oxytocin in ovariectomized cows by progesterone and oestradiol. **J. Reprod. Fertil.**, v.103, p.69-73, 1995b.
- LEAVITT, W. W.; OKULICZ, J. A.; MCCRACKEN, J. A.; SCHRAMM, W.; ROBIDOUX, W. F. Rapid recovery of nuclear estrogen receptor and oxytocin receptor in the ovine uterus following progesterone withdrawal. **J. Steroid Biochem.**, v.22, p.687-691, 1985.
- LEI, Z. N.; CHEGINI, N.; RAO, C. V. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. **Biol. Reprod.**, v.44, p.1148-1156, 1991.
- LEUNG, S. T.; FLINT, A. P. F.; WATHES, D. C. The role of estradiol receptor in regulating oxytocin receptor expression in bovine endometrium. **J. Endocrinol.**, v.159 (Suppl.), p.41, 1998 (abstract).
- LEUNG, S. T.; WATHES, D. C. Oestradiol regulation of oxytocin receptor expression in cyclic bovine endometrium. **J. Reprod. Fertil.**, v.119, p.287-292, 2000.
- LEUNG, S. T.; WATHES, D. C. Regulatory effect of steroid hormones and fetal tissues on oxytocin receptor expression in the endometrium of late pregnant sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v.115, p.243-250, 1999.

- LEVIN, E. R. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. **Mol. Endocrinol.**, v.18, p.1951-1959, 2005.
- LYDON, J. P.; DEMAYO, F. J.; FUNK, C. R.; MANI, S. K.; HUGHES, A. R.; MONTGOMERY JR, C. A.; SHYAMALA, G.; CONNEELY, O. M.; O'MALLEY, B. W. Mice lacking progesterone receptors exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. **Gen. Develop.**, v.9, p.2266–2278, 1995.
- MANN, G. E.; HARESIGN, W. Effect of oestradiol treatment during GnRH-induced ovulation on subsequent PGF_{2α} release and luteal life span in anoestrous ewes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.67, p.245-252, 2001.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Anim. Reprod. Sci.**, v.64, p.171-180, 2000.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Use of repeated biopsies to monitor endometrial oxytocin receptors in the cow. **Vet. Rec.**, v.135, p.403-405, 1994.
- MANN, G. E.; PAYNE, J. H.; LAMMING, G. E. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F_{2α} secretion by the bovine and ovine uterus *in vivo*. **Dom. Anim. Endocrin.**, v.21, p.127-141, 2001.
- MANN, J. G.; HUMPHREY, W. D.; FLOOD, P. F.; MAPLETOFT, R. J.; RAWLINGS, N.; CHENG, K. W. Endocrine profiles and functional characteristics of corpora lutea following onset of postpartum ovarian activity in beef cows. **Can. J. Anim. Sci.**, v.63, p.331-347, 1983.

- MARTIN, I.; TORRES NETO, R.; OBA, E.; BURATINI JR, J.; BINELLI, M.; LAUFER-AMORIM, R.; FERREIRA, J. C. P. Immunohistochemical detection of receptors for estradiol and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. **Reprod. Dom. Anim.**, v.43, p.415-421, 2008.
- MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiol. Rev.**, v.79, p.263-323, 1999.
- MCCRACKEN, J. A.; SCHRAMM, W.; OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂ α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Anim. Reprod. Sci.**, v.7, p.31-55, 1984.
- MCDONNELL, D. P.; GOLDMAN, M. E. RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.11945-11949, 1994.
- MCNEILLY, A. S.; HUNTER, M.; LAND, R. B.; FRASER, H. M. Inadequate corpus luteum function after the induction of ovulation in anestrous ewes by LH-RH or an LH-RH agonist. **J. Reprod. Fertil.**, v.63, p.137-144, 1981.
- MEIDAN, R.; GIRSH, E.; BLUM, O.; ABERDAM, E. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. **Biol. Reprod.**, v.43, p.913-921, 1990.

- MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179-189, 2009.
- MEYER, H. H. D.; MITTERMEIER, T.; SCHAMS, D. Dynamics of oxytocin, estrogen and progestin receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle. **Acta Endocrinol.**, v.118, p.96-104, 1988.
- MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T.; CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-1349, 1996.
- MIRANDO, M. A.; BECKER, W. C.; WHITEAKER, S. S. Relationships among endometrial oxytocin receptors, oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F_{2α} secretion *in vitro*, and plasma concentrations of ovarian steroids before and during corpus luteum regression in cycle heifers. **Biol. Reprod.**, v.48, p.874-882, 1993.
- MOFFATT, R. J.; ZOLLERS, W. G.; WELSHONS, W. V.; KIEBORZ, M. A. Basis of norgestomet action as a progestogen in cattle. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.10, p.21-30, 1993.
- MOORE, N. W. The use of embryo transfer and steroid hormone replacement therapy in the study of prenatal mortality. **Theriogenology**, v.23, p.121-129, 1985.
- MULAC-JERICEVIC, B.; CONNEELY, O. M. reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. **Reproduction**, v.128, p.139-146, 2004.

- MURAMATSU, M.; INOUE, S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? **Biochem. Biophys. Commun.**, v.270, p.1-10, 2000.
- MURDOCH, W. J.; KIRK, E. A. V. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. **Endocrinology**, v.139, p.3480-3484, 1998.
- MURPHY, B.D. Models of luteinization. **Biol. Reprod.**, v.63, p.2-11, 2000.
- MURRAY, M. K. The effect of estrogen and progesterone on structural changes in the uterine glandular epithelium of the ovariectomized sheep. **Biol. Reprod.**, v.47, p.408-417, 1992.
- NOGUEIRA, M. F. G.; MELO, D. S.; CARVALHO, L. M.; FUCK, E. J.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF_{2α} and eCG? **Theriogenology**, v.61, p.1283-1290, 2004.
- NORMAN, S. J.; POYSER, N. L. Effects of inhibitors of arachidonic acid turnover on the production of prostaglandins by the guinea-pig uterus. **J. Reprod. Fertil.**, v.118, p.181-186, 2000.
- O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; WRIGHT, P. J. Morphometric analysis and function in vivo and in vitro of corpora lutea from ewes treated with LHRH during seasonal anoestrus. **J. Reprod. Fertil.**, v.72, p.75-85, 1984.
- OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J. Regulation of endometrial prostaglandin F (2α) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Dom. Anim. Endocrin.**, v.23, p.255-264, 2002.

- OKULICZ, W. C.; BALSAMO, M.; TOST, J. Progesterone regulation of endometrial estrogen receptor and cell proliferation during the late proliferative and secretory phase in artificial menstrual cycles in the Rhesus monkey. **Biol. Reprod.**, v.49, p.24-32, 1993.
- OTTOBRE, J. S.; VINCENT, D. L.; SILVIA, W. J.; INSKEEP, E. K. Aspects of regulation of uterine secretion of prostaglandins during the oestrous cycle and early pregnancy. **Anim. Reprod. Sci.**, v.7, p.75-100, 1984.
- PARKINSON, T. J.; JENNER, L. J.; LAMMING, G. E. Comparison of oxytocin/prostaglandin $F_{2\alpha}$ interrelationships in cyclic and pregnant cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.90, p.337-345, 1990.
- PETERS, M. W.; PURSLEY, J. R. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function and fertility in dairy cows. **Theriogenology**, v.60, p.1197-1204, 2003.
- PIPER, P. J.; VANE, J. R.; WYLLE, J. H. Inactivation of prostaglandins by the lungs. **Nature**, v.225, p.600-604, 1970.
- PULGISI, T. A.; RAMPACEK, G. B.; KRAELING, R. P.; KISER, T. E. Corpus luteum susceptibility to prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) luteolysis in hysterectomised prepubertal and mature gilts. **Prostaglandins**, v.18, p.257, 1979.
- RAMIREZ-GODINEZ, J. A.; KIRACOFE, G. H.; MCKEE, R. M.; SCHALLES, R. R.; KITTOK, R. J. Reducing the incidence of short estrous cycles in beef cows with norgestomet. **Theriogenology**, v.15, p.613-623, 1981.

- RAZANDI, M.; PEDRAN, A.; GREENE, G. L.; LEVIN, E. R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese Hamster ovary cells. **Molec. Endocrinol.**, v.13, p.307-319, 1999.
- READ, L. D.; GREENE, G. L.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in human breast cancer cell lines by sex steroid hormones, their antagonists, and growth factors. **Mol. Endocrinol.**, v.3, p.295-304, 1989.
- REYNOLDS, L. P.; KIRSCH, J. D.; KRAFT, K. C.; KNUTSON, D. L.; MCCLAFLIN, W. J.; REDMER, D. A. Time-course of the uterine response to estradiol-17 β in ovariectomized ewes: uterine growth and microvascular development. **Biol. Reprod.**, v.59, p.606-612, 1998.
- RHODES, F. M.; BURKE, C. R.; CLARK, B. A.; DAY, M. L.; MACMILLAN, K. L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in post-partum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Anim. Reprod. Sci.**, v.69, p.139-150, 2002.
- ROBERTS, J. S.; McCracken, J. A.; GAVAGAN, J. E.; SOLOFF, M. S. Oxytocin-stimulated release of prostaglandin F $_{2\alpha}$ from ovine endometrium *in vitro*: correlation with estrous cycle and oxytocin-receptor binding. **Endocrinology**, v.99, p.1107-1114, 1976.

- ROBERTS, S. J. Physiology of female reproduction. In: THERIOGENOLOGY. (Org.). **Veterinary Obstetrics and Genital Diseases**. New York: Raven Press, 1975. p.343–375.
- ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; WATHES, D. C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v.122, p.965-979, 2001.
- ROSENFELD, C. S.; YUAN, X.; MANIKKAM, M.; CALDER, M. D.; GARVERICK, H. A. Sequencing, cloning and localization of bovine estrogen receptor-beta (ER β) I reproductive tract of the cow. **Biol. Reprod.**, v.58 (Suppl. 1), p.120, 1998 (abstract).
- RUTTER, L. M.; CARRUTHERS, T. D.; MANNS, J. G. The postpartum induced corpus luteum: functional differences from that of cycling cows and the effects of progesterone pretreatment. **Biol. Reprod.**, v.33, p.560-568, 1985.
- SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p.210-218, 2009b.
- SÁ FILHO, O. G.; THATCHER, W. W.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrous Nelore cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.112, p.95-106, 2009a.

- SALAMONSEN, L. A.; HAMPTON, A. L.; CLEMENTS, J. A.; FINDLAY, J. K.
Regulation of gene expression and cellular localization of prostaglandin synthase by oestrogen and progesterone in the ovine uterus. **J. Reprod. Fertil.**, v.92, p.393-406, 1991.
- SANTOS, R. M.; GOISSIS, M. D.; FANTINI, D. A.; BERTAN, C. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; BINELLI, M. Elevated progesterone concentrations enhance prostaglandin F_{2α} synthesis in dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.114, p.62-71, 2009.
- SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREZ, G. C.; MACIEL, A. B. B.; SÁ FILHO, O. G. Serum progesterone concentrations in Nellore x Angus heifers treated with CIDR 1.38 g or CIDR 1.9 g device. **J. Dairy Sci.**, v.83 (Suppl.1), p.214 (Abstract), 2004.
- SAVOURET, J. F.; MISRAHI, M.; MILGROM, E. Molecular action of progesterone. **Int. J. Biochem.**, v.22, p.579-594, 1990.
- SAVOURET, J. F.; RAUNCH, M.; REDEUILH, G.; SAR, S.; CHAUCHEREAU, A.; WOODRUFF, K.; PARKER, M. G.; MILGROM, E. Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.28955-28962, 1994.
- SHAHAM-ALBALANCY, A.; NYSKA, A.; KAIM, M.; ROSENBERG, M.; FOLMAN, Y.; WOLFENSON, D. Delayed effect of progesterone on endometrial morphology in dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.48, p.159-174, 1997.

- SHAPIRO, S. S.; DYER, R. D.; COLAS, A. E. Progesterone-induced glycogen accumulation in human endometrium during organ culture. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.136, p.419-425, 1980.
- SHELDRIK, E. L.; FLICK-SMITH, H. C. Effect of ovarian hormones on oxytocin receptor concentrations in explants from ovariectomized ewes. **J. Reprod. Fertil.**, v.97, p.241-245, 1993.
- SHELDRIK, E. L.; FLICK-SMITH, H. C.; DOS SANTOS CRUZ, G. J. Oxytocin receptor binding activity in cultured ovine endometrium. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.521-528, 1993.
- SHEMESH, M.; FREIDMAN, S.; GUREVICH, M.; STRAM, Y.; FIELDS, M.; SHORE, L. S. Luteinizing hormone receptors and its mRNA in the bovine endometrium. **Physiol. Pharmacol.**, v.47, p.15-27, 1996.
- SHEMESH, M.; HANSEL, W. Stimulation of prostaglandin synthesis in bovine ovarian tissues by arachidonic acid and luteinizing hormone. **Biol. Reprod.**, v.13, p.448-452, 1975.
- SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; McCracken, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON JR., L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ during luteolysis in ruminants. **Biol. Reprod.**, v.45, p.655-663, 1991.
- SILVIA, W. J.; TAYLOR, M. L. Relationship between uterine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ induced by oxytocin and endogenous concentrations of estradiol and progesterone at three stages of the bovine estrous cycle. **J. Anim. Sci.**, v.67, p.2347-2353, 1989.

- SIMON, L. S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. **Am. J. Med.**, v.106, p.37-42, 1999.
- SKARZYNSKI, D.; MIYAMOTO, Y.; OKUDA, K. Production of prostaglandin F₂ α by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor α : a cell type specificity and intracellular mechanisms. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1116-1120, 2000.
- SOLOFF, M. S.; FERNSTROM, M. A.; PERIYASAMY, S.; SOLOFF, S.; BALDWIN, S.; WIEDER, M. Regulation of oxytocin receptor concentration in rat uterine explants by estrogen and progesterone. **Can. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.61, p.625-630, 1983.
- SPENCER, T. E.; BECKER, W. C.; GEORGE, P.; MIRANDO, M. A.; OGLE, T. F.; BAZER, F. W. Ovine interferon- τ inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. **Endocrinology**, v.136, p.4932-4944, 1995.
- STAGG, K.; SPICER, L. J.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F.; DISKIN, M. G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biol. Reprod.**, v.59, p.777-783, 1998.
- STAGG, K.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F. Follicular development in long-term anoestrous suckled beef cows fed two levels of energy postpartum. **Anim. Reprod. Sci.**, v.38, p.49-61, 1995.
- STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; CLARK, J. H. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 73, p. 938-947, 1990.

- STEVENSON, K. R.; RILEY, P. R.; STEWART, H. J.; FLINT, A. P. F.; WATHES, D. C.
Localization of oxytocin receptor mRNA in the ovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. **J. Molec. Endocrin.**, v.12, p.93-105, 1994.
- STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v.132, p.1108-1114, 1993.
- STRONGE, A. J. H.; SCREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MEE, J. F.; KENNY, D. A.; MORRIS, D. G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v.64, p.1212-1224, 2005.
- TAPONEN, J.; HJERPPE, P.; KOPRA, E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KATILA, T.; KINDHAL, H. Premature prostaglandin F_{2α} secretion causes luteal regression in GnRH-induced short estrous cycles in cyclic dairy heifers. **Theriogenology**, v.60, p.379-393, 2003.
- TROXEL, T. R.; KESLER, D. J. Ability of indomethacin to alter prostaglandin metabolite concentrations and to enhance the function of corpora lutea induced in postpartum suckled beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.59, p.177-181, 1984a.
- TROXEL, T. R.; KESLER, D. J. The effect of progestin and GnRH treatments on ovarian function and reproductive hormone secretions of anestrous postpartum suckled beef cows. **Theriogenology**, v.21, p.699-711, 1984b.
- VALLET, J. L.; LAMMING, G. E.; BATTEN, M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. **J. Reprod. Fertil.**, v.90, p.625-634, 1990.

- VASCONCELOS, J. L. M.; SÁ FILHO, O. G.; PEREZ, G. C.; SILVA, A. T. N. Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus x Nelore cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.111, p.302-311, 2009a.
- VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, p.307–314, 2001.
- VASCONCELOS, J. L. M.; VILELA, E. R.; SÁ FILHO, O. G. Temporary weaning at two different times of the GnRH-PGF_{2α}-EB synchronization of ovulation protocol in post partum Nelore cows. **Braz. J. Vet. Anim. Sci.**, v.61, p.95–103, 2009b.
- VIGHIO, G. H.; LIPTRAP, R. M. Plasma concentrations of oxytocin, prostaglandin and ovarian steroids during spontaneous luteolysis in cow. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.3, p.479-491, 1986.
- VILLA-GODOY, A.; IRELAND, J. J.; WORTMAN, J. A.; AMES, N. K.; HUGHES, T. L.; FOGWELL, R. L. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. **J. Anim. Sci.**, v.60, p.517-527, 1985.
- WAHAB, M.; THOMPSON, J.; HAMID, B.; DEEN, S.; AL-AZZAWI, F. Endometrial histomorphometry of trimegestone-based sequential hormone replacement therapy: a weighted comparison with the endometrium of the natural cycle. **Hum. Reprod.**, v.14, p.2609–2618, 1999.

- WANG, C. K.; ROBINSON, R. S.; FLINT, A. P. F.; MANN, G. E. Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels. **Reproduction**, v.134, p.365-371, 2007.
- WEN, D. X.; XU, Y-F.; MAIS, D. E.; GOLDMAN, M. E.; MCDONNELL, D. P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. **Mol. Cell. Biol.**, v.14, p.8356-8364, 1994.
- WILMUT, I.; SALES, D. I.; ASHWORTH, C. J. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. **J. Reprod. Fertil.**, v.76, p.851-864, 1986.
- WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.21–52, 2002.
- XIAO, C. W.; LIU, W. J. M.; SIROIS, J.; GOFF, A. K. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon- τ in bovine epithelial cells. **Endocrinology**, v.139, p.2293-2299, 1998.
- XIAO, C.; GOFF, A. K. Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. **J. Reprod. Fertil.**, v.115, p.101-109, 1999.
- YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v.54, p.25-55, 2000.
- ZALESKY, D. D.; FORREST, D. W.; MCARTHUR, N. H.; WILSON, J. M.; MORRIS, D. L.; HARMS, P. G. Suckling inhibits release of luteinizing hormone-releasing hormone from the bovine median eminence following ovariectomy. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.444-448, 1990.

- ZHANG, J.; WESTON, P. G.; HIXON, J. E. Role of progesterone and oestradiol in the regulation of uterine oxytocin receptors in ewe. **J. Reprod. Fertil.**, v.94, p.395-404, 1992.
- ZHENG, J.; FRICKE, P. M.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Evaluation of growth, cell proliferation and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v.51, p.623-632, 1994.
- ZHENG, J.; JOHNSON, M. L.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Estrogen and progesterone receptors, cell proliferation, and *c-fos* expression in the ovine uterus during early pregnancy. **Endocrinology**, v.137, p.340-348, 1996.
- ZINGG, H. H.; GRAZZINI, E.; BRETON, C.; LARCHER, A.; ROZEN, F.; RUSSO, C.; GUILLON, G.; MOUILLAC, B. Genomic and non-genomic mechanisms of oxytocin receptor regulation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.449, p.287-295, 1998.
- ZOLLERS, W. G.; GARVERICK, H. A.; SMITH, M. F.; MOFFAT, R. J.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. **J. Reprod. Fertil.**, v.97, p.329-337, 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)