JOÃO GUSTAVO PEREIRA LOUREIRO

**As funções do estradiol
no processo da luteólise em bovinos:
o estradiol estimula $\text{PGF}_{2\alpha}$ através da ativação de
receptores de P_4 no endométrio?**

São Paulo

2003

JOÃO GUSTAVO PEREIRA LOUREIRO

**As funções do estradiol
no processo da luteólise em bovinos:
o estradiol estimula $\text{PGF}_{2\alpha}$ através da ativação de
receptores de P_4 no endométrio?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1347
FMVZ

Loureiro, João Gustavo Pereira

As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o estradiol estimula $\text{PGF}_{2\alpha}$ através da ativação de receptores de P_4 no endométrio? / João Gustavo Pereira Loureiro. – São Paulo : J. G. P. Loureiro, 2003.

62 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira.

1. Vacas. 2. Hormônios sexuais. 3. Hormônios peptídicos.
4. Endométrio. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: LOUREIRO, João Gustavo Pereira

Título: As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o estradiol estimula $\text{PGF}_{2\alpha}$ através da ativação de receptores de P_4 no endométrio?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho a meu pai,
a pessoa que mais amei e que mais me amou.

Estou com muitas saudades.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof^o Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira** e **Prof^o Dr. Renato Campanarut Barnabé**, pela confiança e crédito em mim depositado durante esses mais de 4 anos em que estivemos juntos;

Ao **Prof^o Dr. Ed Hoffman Madureira**, pela amizade, pela prontidão e disposição em compartilhar de seus conhecimentos;

Ao **Prof^o Dr. Rubens Paes de Arruda**, pela amizade sincera, pelas oportunidades concedidas e conhecimentos compartilhados (menos futebolísticos);

Ao **Prof^o Dr. Pietro Baruselli** e ao **Prof^o Dr. José Antônio Visintin**, pela disposição em sempre ajudar e pelos frutíferos diálogos;

Ao **meu pai João Bosco** pelo amor, dedicação, devoção e ensinamentos sobre dignidade, família e trabalho;

A **minha mãe Fátima** por todo o amor, carinho, educação, e apoio incondicional na formação de meu caráter e pessoa;

Ao **meu irmão Juliano**, pelo apoio, amizade e presença durante toda minha vida. Sou muito grato por tê-lo como irmão;

A **minha irmã Maria Fernanda** pela cumplicidade durante principalmente esses momentos de Pirassununga, ajuda e também por ter tomado conta de mim;

A **minha namorada Pauline** por todo o amor, carinho, ajuda e amizade, sem os quais não conseguiria concluir esse trabalho;

Ao meu **cunhado “tche” Ricardo** por ser meu amigo (coisa difícil nesses dias), pela ajuda irrestrita e imprescindível em vários pontos de minha vida ultimamente, espero um dia lhe compensar;

Aos colegas **Meniniho, Nélcio, Chiquinho, Claudia, José Rodrigo, Trovão, Pérsio, André Granito, Alê, Dri, Kátia, Paola, Karina, Marcílio, Forero, Norma, Robertinha, Carlinha, Paty, Graziela, Lezinha, Guto, Gutinho, João Barbuio, Letícia, Lilian e Marco** pelos momentos de descontração, companherismo e cooperação;

Aos estagiários do LFEM **Kokret, Priscila, Martini e Febem** pela ajuda e pelos bons momentos juntos, espero também ter contribuído com vocês;

Aos meus primos **Ricardo, Diógenes e Diego** pelo apoio nos dias que passei em São Paulo e por tudo mais que passamos juntos e ainda temos pra passar;

Aos meus tios, tias e amigos **Tânia, Celso, Neuza, Creube, Jorge, tio Alvaro, Jardim e Hermes** por todo o suporte e amizade;

Aos meus amigos no campo **Jorge Junqueira, Rodolfo, Kachan, Vágner, Gilberto, Toninho, Rômulo, Jarbas, Cezinha, Janus, André e Ângelo** pela amizade e apoio para que pudesse cursar a pós-graduação;

Aos funcionários do VRA (**Márcio, Isabel e Zé Maria**) e do **Fistulado (Gilmar e Everton)** por terem proporcionado infra-estrutura e auxiliado em meus experimentos;

A **Prof^o Dra. Kiky, Prof^o Dr. Paulo Mazza, Prof^o Dr. Mário Binelli, Prof^o Dr. Flávio Meirelles, Fernando Schalch e a Prefeitura do Campus da USP em Pirassununga** pela ajuda e participação da conclusão desse trabalho;

Ao **Biro, ao Pitucho e à Maria** pela ajuda e descontração;

A **FAPESP** pelo apoio financeiro.

RESUMO

LOUREIRO, J. G. P. As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o estradiol estimula $\text{PGF}_{2\alpha}$ através da ativação de receptores de P_4 no endométrio? [Role of estradiol on bovine luteolysis: estradiol stimulates $\text{PGF}_{2\alpha}$ throughout P_4 receptor activation in the endometrium?]. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

O estradiol (E_2) exerce papel fundamental no desencadeamento da luteólise nos ruminantes. A redução das concentrações de E_2 que se segue a ablação dos folículos retarda a luteólise enquanto que aplicações de E_2 no final da fase luteínica estimulam a secreção de prostaglandina- $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), induzindo a luteólise. O E_2 pode preparar bioquimicamente o endométrio de forma que a progesterona (P_4) possa estimular a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Para esse trabalho foi utilizado um antagonista de P_4 (RU486) no intuito de se estudar efeitos da P_4 em associação com o E_2 na produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Foram conduzidos 2 experimentos com vacas holandesas em final da fase luteínica. No primeiro experimento, 2 grupos ($n=4$) receberam respectivamente RU486 (3mg/kg)+ E_2 (3mg) e placebo+ E_2 . O uso do RU486 não inibiu a produção de PGFM (metabólito da $\text{PGF}_{2\alpha}$) e sim aumentou-a. O E_2 estimulou a produção de PGFM. Verificou-se também que o etanol (ETOH) utilizado como solvente para o RU486 provocou forte pico de liberação de PGFM. No experimento 2 fez-se necessário checar a efetividade da ação do ETOH nos resultados obtidos. Animais foram divididos em 3 grupos ($n=3$) que receberam 0,00; 0,03 e 0,06mL de ETOH/kg de peso vivo. Uma hora após a aplicação do ETOH todos receberam E_2 (3mg). O ETOH e o E_2 voltaram a estimular a produção de PGFM. A baixa especificidade do RU486, possível ativação de receptores de P_4 pelo próprio RU486 e/ou ação do LH associado ao E_2 podem ter estimulado a liberação de PGFM. Porém pouco pôde-se concluir sobre o pico de PGFM ocasionado pelo ETOH.

Palavras-chave: Vacas. Hormônios sexuais. Hormônios Peptídicos. Endométrio.

ABSTRACT

LOUREIRO, M. F. P. **Role of estradiol on bovine luteolysis: estradiol stimulates $\text{PGF}_{2\alpha}$ throughout P_4 receptor activation in the endometrium?** [As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o estradiol estimula $\text{PGF}_{2\alpha}$ através da ativação de receptores de P_4 no endométrio?]. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Estradiol (E_2) is essential for triggering luteolysis in ruminants. The low E_2 concentrations after follicular ablation prolong luteolysis instead of E_2 injections in late luteal phase stimulate prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) and luteolysis. The E_2 could act in endometrium avoiding progesterone (P_4) to stimulate $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretion. A P_4 antagonist (RU486) was use for it. Holstein cows in late luteal phase where use for those 2 experiments. First experiment, 2 groups (n=4) receive respectively RU486(3mg/kg)+ E_2 (3mg) and placebo+ E_2 . Ru486 increase PGFM ($\text{PGF}_{2\alpha}$ metabolism). E_2 stimulates PGFM production. Ethanol (ETOH) used as a RU486 veicle strongly stimulates PGFM. In experiment 2 the effectivity of ETOH was studied. Animals were share into 3 groups (n=3) receiving 0,00; 0,03 e 0,06mL of ETOH/kg. All animals receive E_2 (3mg) 1hour after ETOH injection. Once more, both ETOH and E_2 stimulates PGFM release. The low RU486 specificity, probably P_4 receptor activation by the RU486 them self and/or the LH/ E_2 association could be able to stimulate PGFM release. The PGFM stimulus by the ETOH injection is not well understood.

Key words: Cow. Sexual hormones. Peptide hormones. Endometrium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
^{32}P	fósforo 32
AA	ácido araquidônico
ACLAT	aciltransferase acil:CoA:lisofosfolipídio
B0	Binding
Ca^{++}	Cálcio
CAP527	Antagonista para receptores de ocitocina
CL	corpo lúteo
cm	Centímetro
COX-2	ciclooxigenase-2
DAG	Diacilglicerol
DPM	desintegrações por minuto
E_2	Estradiol
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
ETOH	Etanol
FSH	hormônio folículo estimulante
g	Gramma
G	Gravidade
Ga	Gauge
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
h	Hora
HCl	ácido clorídrico
i.v.	intra venoso
IA	inseminação artificial
IP_3	trifosfato de inositol
kg	Quilograma
L	Litro
LFEM	Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular
LH	hormônio luteinizante
LLC	grande célula lútea
Log_{10}	logarítimo decimal

mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCL	cloreto de Sódio
No	óxido nítrico
NSB	non-specific-binding
°C	grau centígrado
OT	Ocitocina
P ₄	Progesterona
PEG	Polietilenoglicol
pg/mL	picograma por mililitro
PGE ₂	prostaglandina E 2
PGF _{2α}	prostaglandina F 2 alfa
PGFM	13, 14 dihidro-15 ceto prostaglandina F _{2alfa}
PGH ₂	prostaglandina-H2
PKC	proteína quinase-C
PLA ₂	fosfolipase A 2
PLC	fosfolipase-C
PV	peso vivo
RIE	Radioimunoensaio
Rpm	rotações por minuto
RU486	Mifepristona
s	desvio padrão da média
SAS	Statistical Analysis System
SLC	pequena célula lútea
TC	total count
TE	transferência de embrião
TNF _α	fator de necrose tumoral Alfa
USP	Universidade de São Paulo
VRA	Departamento de Reprodução Animal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Local	27
3.2 Animais.....	27
3.3 Sincronização do cio.....	28
3.4 Preparação da solução de 17 β -estradiol (0,5mg/mL).....	28
3.5 Preparação do RU486 (3mg/Kg de peso vivo).....	28
3.6 Obtenção de plasma de amostras seriadas.....	28
3.7 Dosagem de PGFM.....	33
3.8 Delineamento Experimental.....	40
4 RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	43
5 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A perfeita compreensão do ciclo estral bovino é de suma importância para o incremento da eficiência reprodutiva de um rebanho comercial. O controle farmacológico do ciclo estral é uma ferramenta quase que imprescindível para o emprego de técnicas como a Inseminação Artificial (IA) e a Transferência de Embrião (TE). Nos dias atuais existem várias opções de protocolos de sincronização do ciclo estral. Estes protocolos se estendem desde uma simples aplicação de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) até alguns mais elaborados que possibilitam IA ou TE em tempo pré-determinado (sem a necessidade da observação de cio). Porém, devido ao baixo custo e facilidade de uso, é a $\text{PGF}_{2\alpha}$ o fármaco mais usado para a sincronização do ciclo estral em bovinos.

A produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio é a responsável direta pela lise e regressões funcional e estrutural do Corpo Lúteo (CL), evento conhecido como luteólise. A deficiência do conceito em bloquear a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio é uma das principais causas de morte embrionária. O entendimento da luteólise é importante não só para o controle farmacológico do ciclo estral, mas também para a compreensão dos mecanismos do Reconhecimento Maternal de Prenhez e para a formulação de estratégias anti-luteolíticas para a manutenção da gestação.

Pharriss e Wyngarden (1969) foram os primeiros a demonstrar a ação luteolítica da $\text{PGF}_{2\alpha}$ usando para tal, ratas pseudo-gestantes. MacCracken et al. (1984) e Niswender et al. (1995) estudaram o papel da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no processo de

luteólise e na regulação do ciclo estral bovino. Na espécie ovina um mecanismo de "feedback positivo" parece estimular a liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tendo a OT papel central neste processo (FLINT et al., 1990; MACCRACKEN et al., 1984; NISWENDER et al., 1994). Segundo esta teoria, a OT proveniente da neuro-hipófise estimula a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula a liberação de OT do CL, que agora estimula a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio ainda mais, caracterizando assim, um sistema de feedback positivo (MACCRACKEN, 1984). Neste modelo, a luteólise tem início devido ao aumento do número de receptores endometriais para estradiol (E_2), bem como a potencialização do efeito da ligação hormônio-receptor, que por sua vez induz um aumento no número de receptores para OT no endométrio, deflagrando o mecanismo de feedback anteriormente relatado (CASTRO e PAULA, 2003).

Até recentemente esse mecanismo de desencadeamento da luteólise também era proposto para bovinos. Porém Kotwica et al. (1997), demonstraram que o uso de um antagonista para receptores de OT (CAP-527) não impediu a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e tão pouco impediu ou delongou a ocorrência da luteólise.

Poderia o E_2 preparar bioquimicamente o endométrio para outros hormônios, como a progesterona (P_4), a fim de que mesma pudesse mais efetivamente estimular a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$? Skarzynski et al. (1999), co-incubaram células luteínicas e cortes de endométrio e demonstraram que a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi estimulada quando comparada com a secreção que ocorre quando o endométrio é incubado isoladamente. No entanto, a adição de um inibidor específico de P_4 anulou o aumento da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ induzido pelos cortes luteínicos. Esses mesmos autores demonstraram que a associação do E_2 à P_4 , administrada em células do endométrio, estimulou positivamente a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se comparada ao

tratamento com P_4 isoladamente. Pode-se interpretar que esses resultados indicam que o E_2 prepara o endométrio para ser mais receptivo à P_4 . Para testar os efeitos da P_4 sobre a secreção de $PGF_{2\alpha}$ induzida por E_2 , Lafrance e Goff (1988) trataram com P_4 novilhas ovariectomizadas há 0, 7, 14 ou 21 dias, e a seguir injetaram-lhes OT por duas vezes, em intervalos de seis horas, e E_2 uma vez, trinta minutos após a primeira injeção de OT. As concentrações de PGFM (13, 14 dihidro-15 ceto prostaglandina $F_{2\alpha}$), principal metabólito da $PGF_{2\alpha}$ mensurável no plasma (BARTOL et al., 1981; GUILBAULT et al., 1984; HANSEN, 1982; KNICKERBOCKER et al., 1986; THATCHER et al., 1986), aumentaram em resposta as injeções de OT, exclusivamente nas novilhas preparadas com P_4 há pelo menos 14 dias. A segunda injeção de OT estimulou uma maior liberação de PGFM, comparando-se com a primeira injeção, indicando que o E_2 potenciou os efeitos da segunda injeção de OT. Em resumo, o E_2 poderia atuar sobre o endométrio para aumentar os efeitos luteolíticos da P_4 . Isso pode ser conseguido aumentando-se o número de receptores de P_4 ou ampliando/modificando-se a receptividade celular a tais efeitos.

Este trabalho procura abordar os efeitos da P_4 na liberação de PGFM estimulada por E_2 na presença do RU486 (mifepristona), um antagonista para receptores de P_4 . A hipótese deste trabalho é a de que a concentração de PGFM nos animais tratados com E_2 + RU486 é menor que nos animais tratados com E_2 , devido ao bloqueio dos receptores para P_4 que impede a ação sinérgica da P_4 com o E_2 no estímulo positivo da produção de PGFM.

Para tanto, foram realizados dois experimentos. No experimento 1 o objetivo foi verificar a habilidade do RU486 em bloquear a produção de PGFM após aplicação de E_2 em vacas no dia 15 do ciclo estral. O experimento 2 foi delineado objetivando-se testar o efeito do etanol 90% (ETOH; veículo para o RU486) na

liberação de PGFM, em vacas no dia 17 do ciclo estral bem como verificar a efetividade do ETOH 90% na produção de PGFM induzida por E_2 e RU486.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O corpo lúteo (CL) é um órgão endócrino transitório formado após o colapso do folículo ovulatório. O nome corpo lúteo fora primeiramente utilizado em 1643 por Malpighi, quando em estudo microscópico desta glândula atribuiu-se este nome devido a sua cor amarelada (*corpus* = corpo / *luteum* = amarelo). O primeiro relato do seu significado biológico fora publicado em 1903 por Fraenkel mostrando que sua remoção determinava a interrupção da prenhez em coelhas (apud. McCracken; Custer; Lamsa; 1999).

Na espécie bovina, a duração do ciclo estral (normalmente de 21 dias) pode ser determinada pela presença de um CL (Binelli, 2000). O CL está funcionalmente presente do dia 4 ao dia 17 para a maioria dos animais (fase luteínica). A funcionalidade está relacionada a sua produção de P₄. O CL secreta P₄ e é a estrutura ovariana requerida para a manutenção da prenhez. A luteinização ou formação do corpo lúteo se inicia por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas nas células da teca e da granulosa do folículo ovulatório. As mudanças ocorrem em decorrência do aumento da concentração sérica de LH associada com o pico pré-ovulatório desse hormônio. (Baird et al., 1992). Após a ovulação, a membrana basal que separava as células da teca e da granulosa se rompe, fazendo com que ocorra a invasão dos vasos sanguíneos da teca para cavidade do folículo rompido e para a granulosa. A proliferação desses novos vasos parece estar relacionada a fatores angiogênicos liberados logo após o rompimento do folículo (Grazul-Bilska et al., 1991). A presença de um CL funcional aumenta

consideravelmente a irrigação sanguínea do ovário, no caso da espécie ovina, passando de 1mL/min para até 7mL/min (FORD; CHRISTENSON; CHENAULT, 1979; NISWENDER et al., 1976; NISWENDER e NETT, 1988). A taxa de crescimento de um CL é extremamente alta. No dia 3 do ciclo estral de uma vaca, seu CL pesa em média 640mg e no dia 14 este mesmo CL já alcança 5,1g (FIELDS; FIELDS, 1996). As células da teca sofrem intensa hiperplasia e atividade mitótica, migram para a antiga cavidade folicular (O'SHEA; CRAN; HAY, 1980), e passam a ser identificadas agora como pequenas células lúteas (SLC). As células da granulosa também sofrem hiperplasia e intensa reorganização citoplasmática, porém não sofrem aumento do número de divisões celulares (NISWENDER et al., 1988). A célula da granulosa após toda essa transformação passa a ser chamada de grande célula lútea (LLC). Estes dois novos tipos celulares assumem caráter secretório esteroideogênico e compreendem 80% do volume total do CL. (FARIN et al., 1986). Além das células produtoras de esteróides, o CL possui células suporte, que incluem elementos vasculares, macrófagos, células de músculo liso e fibroblastos (FARIN et al., 1986). O LH é também o hormônio responsável pela manutenção da produção de progesterona pelo CL (NISWENDER et al., 1994). O principal regulador da função luteínica é o LH (PETERS et al., 1994). A queda na secreção de GnRH, e consequentemente de LH, pode ter um importante reflexo no tempo de vida do CL. Estudo com ovelhas hipofisectomizadas demonstraram a necessidade do suporte de LH para a secreção de progesterona (DENAMUR et al., 1996). A imunoneutralização de LH circulante em ovinos também causou regressão do CL vigente (FULLER et al., 1970). A liberação pulsátil do LH que é imprescindível para a formação do CL em ovinos e bovinos parece não ser requerida durante toda a fase luteínica. Após a sua formação apenas concentrações basais de LH são necessárias (PETERS et al.,

1994). A P_4 é mais efetiva na regulação do LH quando na presença do E2. Estes dois hormônios, trabalhando independentemente ou de acordo, modulam a liberação de LH. Essa liberação, que é pulsátil, provavelmente ocorre nos pulsos geradores do Hormônio Liberador de LH (LHRH) no hipotálamo.

Com a regressão do CL, as concentrações plasmáticas de E2, P_4 e inibina declinam, possibilitando um aumento da frequência dos pulsos de LH e da concentração de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), durante os últimos dias do ciclo (RAFEZ, 1992).

A luteólise ou regressão do CL, é caracterizada pelo declínio inicial da secreção de progesterona (luteólise funcional) seguido pela mudança da estrutura celular do espaço físico que compreendia o CL (luteólise estrutural) (MCCRACKEN, CUSTER e LAMSA, 1999). Em ruminantes e na grande maioria dos mamíferos a regressão do CL é induzida pela liberação pulsátil de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio (DUCHENS et al., 1995). É o fenômeno da luteólise que possibilita aos mamíferos o surgimento de um novo ciclo reprodutivo após a não constatação pelo próprio animal de uma gestação.

Nos bovinos a luteólise ocorre entre os dias 15 e 17 do ciclo estral. Este período também é conhecido como “período crítico”. Em caso de fertilização do oócito, é durante este período que deve ocorrer sinalização do conceito para o útero materno, a fim de que se interrompa o mecanismo luteolítico e se perpetue por toda a gestação a produção de progesterona. Esta comunicação entre o conceito e o útero freqüentemente não é bem sucedida. Diskin e Sreenan (1980), relataram uma mortalidade embrionária entre os dias 8 e 16 da ordem de 30%. Lamming, Darwash e Back (1989), observaram morte embrionária em 28% de vacas leiteiras

inseminadas há 25 dias. O stress calórico pode ser mais um dos responsáveis pela perda embrionária durante o “período crítico” (PUTNEY et al., 1989).

A presença de um CL ativo capaz de secretar elevadas concentrações plasmáticas de P_4 é essencial para a manutenção da prenhez. Mann e Lamming (1995) examinaram a concentração plasmática de P_4 de vacas durante os 30d seguintes à inseminação. Os animais inseminados e prenhes apresentaram concentração plasmática de P_4 maior do que nos inseminados e não prenhes. A capacidade de produção de P_4 está relacionada ao tamanho do CL. Este por sua vez está relacionado positivamente ao tamanho do folículo ovulatório e à amplitude e pico de LH que deram origem ao CL (BINELLI, 2000). A formação de um CL acessório no dia 5 do ciclo estral foi capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de P_4 mas não foi capaz de aumentar as taxas de gestação (Fonseca et al., 2000; Schmitt et al., 1996). Porém, Baruselli et al. (2000) conseguiram apontar aumento das concentrações plasmáticas de P_4 e das taxas de gestação com a formação de CLs acessórios usando-se Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG). A administração de hCG nos dias 7 ou 14 do ciclo estral promoveu em vacas leiteiras aumento da taxa de prenhez (SIANANGAMA e RAJAMAHENDRAN, 1992). A formação de CL acessórios a partir de folículos no dia 10 do ciclo estral em vacas da raça holandesa produziu CL capazes de sofrerem regressão ante a aplicação de $PGF_{2\alpha}$ 2 dias após a ovulação enquanto que CLs originados espontaneamente respondem a $PGF_{2\alpha}$ (luteólise) apenas 5 dias após a ovulação (HOWARD e BRITT, 1990). Shaham-Albalancy et al. realizaram estudos utilizando bovinos e traçaram relação entre a concentração plasmática de P_4 e a secreção de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio no ciclo estral seguinte. Foi constatado que uma baixa concentração de P_4 resulta em alta secreção de $PGF_{2\alpha}$.

As prostaglandinas são compostos de 20 carbonos, derivados de ácidos graxos (BERGSTROM et al., 1964, apud. CASTRO e PAULA, 2003). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é liberada pelas células endometriais do estroma e do epitélio (principalmente epiteliais da região intercaruncular) e atinge a veia uterina. O tecido alvo da $\text{PGF}_{2\alpha}$ é o CL e a sua degradação ocorre nos pulmões originando diferentes metabólitos sob diferentes proporções conforme a espécie. O principal metabólito originado neste processo é a PGFM (HANSEN, 1982; VALLET et. Al., 1988). Nos ruminantes aproximadamente 98% da $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelo CL é metabolizada em PGFM já na sua primeira passagem pelos pulmões (PIPER; VANE; WYLLIE, 1970).

Nesses animais, um interessante mecanismo anatômico foi desenvolvido para que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ pudesse alcançar o CL no ovário antes da sua primeira passagem pelos pulmões. A veia uterina que drena o útero é envolvida pela artéria ovariana que irriga o ovário e, por um mecanismo de contra-corrente, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ passa pelas paredes endoteliais e chega luz da artéria ovariana e chega a seu alvo, o tecido luteínico (HAFEZ, 1992).

O mecanismo de desencadeamento da luteólise nos bovinos ainda permanece não esclarecido. Hormônios como o E_2 , a OT, a progesterona, entre outros parecem estar envolvidos na regulação deste processo (SILVIA et al., 1991)

Nos ovinos o mecanismo da luteólise encontra-se bem elucidado e a OT desempenha um papel central neste processo (McCRACKEN et al., 1984). A OT proveniente da neuro-hipófise estimula a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ do endométrio, que por sua vez estimula a secreção de OT do CL, e a OT luteínica estimula ainda mais a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial, caracterizando-se assim um mecanismo fechado de “feedback” positivo. Nesse modelo, a luteólise tem início como resultado da elevação e ativação de receptores de E_2 , que induzem a elevação dos receptores de

OT no endométrio, deflagrando o mecanismo fechado de feedback descrito acima (McCRACKEN et al., 1984). Corroborando com este mecanismo de ação da OT na luteólise, Hooper et al., (1986) demonstraram em experimento também utilizando ovelhas, que as pulsações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ coincidem em 96% com as pulsações de OT.

Até recentemente presumia-se que um mecanismo luteolítico idêntico ao descrito para os ovinos era válido para os bovinos. Contudo, Kotwica et al. (1997) demonstraram que o bloqueio dos receptores de OT através de um antagonista específico (CAP-527) não impedia a ocorrência de secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$, nem da luteólise, comparando-se com os animais controle. Além disso, a duração do ciclo estral dos animais tratados com CAP-527 e dos animais controle era semelhante. Em outro estudo, Kotwica et al. (2000) demonstram que durante a luteólise espontânea em bovinos, somente 54% das pulsações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estavam associadas a pulsações de OT, enquanto 50% das pulsações de OT estavam associadas a pulsações de PGFM, um metabólito de $\text{PGF}_{2\alpha}$ mais facilmente mensurável na circulação. Não foi verificada alteração na secreção de OT luteínica durante luteólise espontânea ou induzida em estudo que utilizou microdiálise do CL e concentrações plasmáticas para a coleta de amostras (BLAIR et al., 1997). Skarzynski et al. (1999) desenvolveram estudos *in vitro* co-incubando cortes de tecido endometrial à células luteínicas sob diferentes tratamentos e aferiram a liberação de PGFM, que em estudos preliminares destes mesmos autores, mostrou-se passível de ser mensurada *in vitro*. O co-cultivo com as células luteínicas estimulou a produção de PGFM pelos cortes endometriais em comparação com o grupo controle (cortes de tecido endometrial + solução salina) e a adição de um antagonista de receptores para a OT (atosiban) à co-incubação não foi capaz de inibir ou diminuir tal efeito estimulatório. Coletivamente, esses dados indicam que, pelo menos nos bovinos, a

OT pode não desempenhar um papel determinante na luteólise. Porém em estudo *in vivo* conduzido no Brasil, a utilização do CAP527 não foi capaz de bloquear efetivamente a produção de PGFM estimulada por OT exógena (CASTRO e PAULA, não publicado).

A irradiação dos folículos ovarianos, que elimina de forma reversível a produção de E_2 folicular, retarda a luteólise e prolonga o ciclo estral (HUGHES et al., 1987). Neste mesmo trabalho também ficou demonstrado que em comparação com animais controle, a luteólise induzida por $PGF_{2\alpha}$ exógena nos animais irradiados foi menos eficaz. Hughes et al. (1987) ainda sugerem que a regressão do CL envolve uma ação sinérgica entre produtos dos folículos ovarianos e a $PGF_{2\alpha}$. Em novilhas, Thatcher et al. (1986) demonstraram que injeções de E_2 no 13º dia do ciclo estral estimulavam a liberação de PGFM, a partir de 3h após a aplicação, atingindo-se o pico após 6h e retomando-se as concentrações basais após cerca de 10 h. Além disso, as novilhas entravam em processo de luteólise 96h após as injeções de E_2 , enquanto a luteólise demorava 125h para ocorrer nas novilhas do grupo controle. Confirmando que os aumentos de PGFM verificados na circulação periférica representam $PGF_{2\alpha}$ de origem uterina, Knickerbocker et al. (1986) constataram uma aguda elevação de $PGF_{2\alpha}$ na veia uterina de vacas que haviam recebido E_2 . A estimulação da produção de $PGF_{2\alpha}$ pelo E_2 também foi verificada por outros autores (BARTOL et al., 1981; CASTRO e PAULA et al., 2002; KNICKERBOCKER et al., 1986; RICO et al., THACHER et al., 1986; ZHANG; WESTON; HIXON, 1991;). Coletivamente, essas constatações indicam que tanto o E_2 endógeno quanto o exógeno podem estimular a secreção de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio e provocar a luteólise.

In vitro o papel do E_2 na liberação de $PGF_{2\alpha}$ permanece indefinido. Skarzynsky, Bogacki e Kotwica (1999) em experimento utilizando-se cortes de tecido endometrial e dosando-se $PGF_{2\alpha}$, verificaram aumento do efeito estimulatório positivo da P_4 e da OT adicionando E_2 , porém o E_2 sozinho não foi capaz de aumentar a liberação de $PGF_{2\alpha}$ em comparação com o grupo controle (salina + endométrio). Raw, Silvia e Curry, (1995) também não obtiveram em seus experimentos aumento da liberação de $PGF_{2\alpha}$ por células endometriais em tratamento com E_2 . Efeito inibitório na produção de $PGF_{2\alpha}$ também foi obtido por Xiao et al., (1998) quando expuseram células endometriais em cultivo com E_2 por 96h. Utilizando um sistema de perfusão (cultivo dinâmico) Castro e Paula (2003, não publicado) executou vários estudos utilizando cortes de tecido endometrial (vacas no dia 15 ou 17 do ciclo estral) tratados com diferentes dosagens de E_2 que não foram capazes de estimular a produção de $PGF_{2\alpha}$. Porém Asselin et al. (1996) e Mann et al. (2001) executaram experimentos com células endometriais tratadas com E_2 sob delineamentos diferentes e conseguiram estimular a produção de $PGF_{2\alpha}$. Não obstante, o mecanismo de ação de E_2 não está evidente.

Um possível mecanismo para a liberação de $PGF_{2\alpha}$ por indução de E_2 é a estimulação direta do aparelho secretor da mesma no endométrio. Skarzynski et al. (1999) demonstraram que a administração de E_2 a explantes de endométrio *in vitro* não estimulou a secreção de $PGF_{2\alpha}$. Isso está em consonância com a ausência de efeito do E_2 na secreção de $PGF_{2\alpha}$ tanto em células epiteliais endometriais (ASSELIN et al., 1996; XIAO et al., 1998) quanto em células miometriais (DOUALLA-BELL et al., 1998) de bovinos, indicando que *in vitro* o E_2 não seria capaz de estimular a secreção de $PGF_{2\alpha}$. Entretanto, o E_2 pode estimular componentes do

aparelho secretor de $\text{PGF}_{2\alpha}$, mesmo não tendo sido capaz de estimular a própria quando administrado sozinho.

A síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é o resultado final de uma complexa cascata de ocorrências intra-celulares altamente coordenadas. O modelo hipotético mais aceito indica que o primeiro patamar dessa cascata é o acoplamento da OT ao receptor de OT. A ativação do receptor de OT estimula a ativação da proteína acopladora do GTP que estimula a ação da fosfolipase-C (PLC). A PLC cliva fosfolipídios da membrana celular em diacilglicerol (DAG) e em trifosfato de inositol (IP_3). Estes dois novos produtos agem como segundo mensageiro e ativam a proteína quinase-C (PKC). O IP_3 causa também um aumento da concentração de cálcio (Ca^{++}) intracelular. (BURNS; HAYES; SILVIA, 1998; HIXON; FLINT, 1987; LAFRANCE; GOFF, 1990) Dando início a seqüência específica da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, a PKC em conjunto com o aumento da concentração de Ca^{++} ativa a enzima fosfolipase- A_2 (PLA_2). A PLA_2 cliva o ácido araquidônico (AA) derivado de fosfolipídios de membrana. Esta clivagem é auxiliada pela aciltransferase acil:CoA:lisofosfolipídio (ACLAT) e posteriormente pela ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-2 converte o AA em prostaglandina- H_2 (PGH_2), que é, a seguir, convertida em $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ -sintase (ARNOLD et al., 2000; BURNS et al., 1997; BURNS et al., 2000; FUNK, 2001; THATCHER et al., 1997).

Uma vez a OT não sendo necessária para o início da luteólise nos bovinos (KOTWICA et al., 1997), pode-se especular que o E_2 interaja com moléculas envolvidas no aparelho gerador de $\text{PGF}_{2\alpha}$, para estimular a síntese de própria $\text{PGF}_{2\alpha}$. De fato, após a estimulação de E_2 nos folículos, o LH induz a expressão de COX-2 para estimular a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ necessária à ovulação (LIU et al., 1997). Porém, XIAO et al. (1998) determinaram que o tratamento das células epiteliais do

endométrio com E_2 na realidade reduziu a expressão do gene COX-2. É possível que o E_2 estimule a expressão e/ou atividade de outras moléculas, que não COX-2, no aparelho gerador de $PGF_{2\alpha}$. Em estudo *in vitro* com células endometriais, Canino et al. (1998, não publicado), verificaram que adição de E_2 ou HCG isoladamente não alterou a produção de $PGF_{2\alpha}$ em comparação com o controle. No entanto, a associação do E_2 com o HCG estimulou a produção de $PGF_{2\alpha}$.

Na busca de um mecanismo que elucide o “gatilho” da luteólise, Skarzynski et al. (1999b) estimularam a produção *in vitro* de $PGF_{2\alpha}$ por células endometriais bovinas tratadas com noradrenalina. Skarzynski, Miyamoto e Okuda (2000) em trabalho com cultura de células endometriais estudaram o papel do TNF_{α} (Fator de Necrose Tumoral Alfa) na luteólise. O TNF_{α} estimulou a produção de $PGF_{2\alpha}$ em células do estroma endometrial mas não do epitélio. Neste mesmo trabalho foi verificado que células epiteliais produzem $PGF_{2\alpha}$ com uma eficiência aproximadamente 10 vezes maior que as células do estroma, porém as células do estroma existem em maior quantidade no CL que as epiteliais. Acrescentando-se a isto os fatos de a produção de $PGF_{2\alpha}$ ser auto-amplificada (SKARZYNSKI; BOGACKI; KOTIWICA, 1997b) e de possuir efeito parácrino e autócrino auto-regulador (TSAI; WILTBANK; 1997) os autores concluíram ser o TNF_{α} suficiente o bastante para iniciar a luteólise.

Skarzynski et al. (1999), co-incubaram células luteínicas e cortes de endométrio e demonstraram que a secreção de $PGF_{2\alpha}$ foi estimulada positivamente quando comparada com a secreção que ocorre quando o endométrio é incubado isoladamente. No entanto, a adição de um inibidor específico de P_4 anulou o aumento da secreção de $PGF_{2\alpha}$ induzido pelos cortes luteínicos. Além disso, quando se acrescentou E_2 combinado à P_4 ao endométrio, foi aumentada a secreção de

PGF_{2α}, comparado-se com o tratamento com P₄ isoladamente. Pode-se interpretar que esses resultados indicam que o E₂ prepara o endométrio para ser mais receptivo à P₄. Para testar os efeitos da P₄ sobre a secreção de PGF_{2α} induzida por E₂, Lafrance e Goff (1988) trataram com P₄ novilhas ovariectomizadas há 0, 7, 14 ou 21 dias. A seguir injetaram-lhes OT, por duas vezes, em intervalos de 6h, e E₂, uma vez, trinta min após a primeira injeção de OT. As concentrações de PGFM no plasma aumentaram, em resposta às injeções de OT, exclusivamente nas novilhas preparadas com P₄ a pelo menos 14 dias. A segunda injeção de OT estimulou uma maior liberação de PGFM, comparando-se com a primeira injeção, indicando que o E₂ potencializou os efeitos da segunda injeção de OT. Duchens et al., (1995) trataram novilhas com crescentes concentrações de P₄ a fim de se determinar a influência de baixas concentrações de P₄ na liberação da PGF_{2α}. Foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração de P₄ a frequência de picos de PGF_{2α}.

Porém há pesquisadores que atribuem a P₄ uma ação luteotrófica. Bogacki et al., (2002) incubando células endometriais demonstrou que a P₄ foi capaz de suprimir a habilidade da OT em induzir secreção de PGF_{2α}. Os autores concluíram ainda que esta interferência deve ocorrer nos receptores da própria OT. Células luteínicas bovinas foram incubadas na presença de antagonistas de receptores para a P₄ (RU486 e onapristone) por 48h. Ambos antagonistas causaram aproximadamente 40% de aumento de fragmentação de DNA marcado por ³²P (RUEDA et al., 2000). Apesar de ter sido observado diferença da concentração de P₄ após os tratamentos com os antagonistas de receptores para P₄ em comparação com o grupo controle, os autores concluíram que a P₄ reprimiu o surgimento da apoptose em células do CL e que este mecanismo seria dependente dos receptores de P₄.

Em resumo, o E_2 poderia atuar sobre o endométrio estimulando os efeitos luteolíticos da P_4 . Isso pode ser conseguido aumentando-se o número de receptores de P_4 ou ampliando/modificando-se a receptividade celular para tais efeitos luteolíticos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local

Os experimentos foram realizados no Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo, localizado na cidade de Pirassununga, interior do estado de São Paulo. Foram utilizadas para tal o estábulo do "Fistulado" do Departamento de Produção Animal e o curral, o Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) e o Laboratório de Pequeno Ruminantes do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução (VRA) Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.2 Animais

Os animais utilizados em ambos experimentos eram pertencentes ao VRA ou ao Departamento de Produção. As fêmeas eram todas da raça Holandesa. Todos os animais encontravam-se na idade adulta, não lactantes, não gestantes, vacinados, desvermifugados, desparasitados e pesando entre 550 a 720 quilos.

3.3 Sincronização do cio

Dia -9 – Aplicação de um análogo sintético do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH - 150 μ g; IM; buserelina – N.C. Gestran®) + colocação de dispositivo intravaginal (CIDR®; 1,9g de progesterona; Pharmacia).

Dia -2 – Retirada do dispositivo intravaginal + aplicação de Preloban® (d-cloprostenol; análogo da PGF_{2 α} ; 150 μ g; IM; Intervet). Os animais receberam sob o couro da região sacral marcação de tinta feita com um "bastão de cera" (Painstick®; La-Co industries).

Dias 0 – Ultrassonografia (US - Aloka SSD-500, sonda linear de 5Mhz, via transretal) e desenho de mapa folicular (posicionamento das principais estruturas presentes no ovário no momento do exame). Aplicação de GnRH em animais com folículo dominante > 8mm à US . Na observação ou não de cio (2 vezes ao dia e análise do "escore" residual da tinta presente no couro do sacro do animal), este dia é considerado como dia 0 do cio.

Dia 2 – US para a constatação da ovulação do folículo > 8mm no presente no dia 0.

Dia 5 – US para a constatação de folículo > 8mm e conseqüente aplicação de aplicação de GnRH a fim de criar-se um CL acessório (apenas para o experimento 2).

Dia 7 – US para a constatação da ovulação do folículo > 8mm no presente no dia 5 (apenas para o experimento 2).

Dias 14 ou 16 – (experimentos 1 e 2 respectivamente) – US para a constatação do Corpo Lúteo ipsilateral ao folículo ovulado

Dia 15 ou 17 – (experimentos 1 e 2 respectivamente) – realização das coletas de plasma

3.4 Preparação da solução de 17 β -estradiol (0,5mg/mL)

A preparação da solução de 17 β -estradiol (0,5mg/mL) foi toda executada em fluxo laminar e com materiais autoclavados a fim de se obter uma solução estéril. Pesou-se 30mg de 17 β -estradiol (Sigma; E-8875). Em seguida dilui-se o estradiol adicionando-se 30mL de ETOH absoluto. Seguiu-se adicionando-se 30mL de solução NaCl 0,9% (solução salina). A solução final foi aliquoteada e estoca a 4°C.

3.5 Preparação do RU486 (3mg/Kg de peso vivo)

O RU486 (Sigma®; M-8046) foi diluído em ETOH 90% (34,78mg de RU486/ mL de ETOH) e imediatamente utilizado no experimento 1. Todo o preparo da solução foi feito em Fluxo Laminar e obedecendo-se procedimentos anti-sépticos.

3.6 Obtenção de plasma de amostras seriadas

Para que se pudesse delinear o perfil de liberação pulsátil do metabólito PGFM na corrente sanguínea em resposta aos tratamentos dos experimentos 1 e 2, fez-se necessária a elaboração de um sistema de coleta seriada de amostras de plasma (a cada 30 min). A coleta no experimento 1 perdurou 13h e no experimento 2 14h (maiores detalhes no sub-capítulo delineamento experimental). A obtenção destas amostras de plasma segue alguns passos, abaixo elucidados:

Canulação da veia jugular

A cateterização da jugular foi implantada para facilitar o trabalho dos responsáveis pela coleta de amostras de plasma e para amenizar o sofrimento dos animais envolvidos.

Após a contenção do animal no tronco, a área da pele ao redor ao local da punção foi tricotomizada utilizando-se um tosqueador (*Laube*®; modelo 505 2-speed) e feita assepsia com álcool iodado 5%. Para a punção da veia jugular utilizou-se uma agulha 12 Ga (NC Veterinary Luer Needle da *Perfectum*®), esterilizada por imersão em álcool 70%. Após a punção, o catéter (tubo de 0,04 polegadas de diâmetro interno e 0,07 polegadas de diâmetro externo (*Fisher ref. 14-170-15*; NC *Tygon*®) de cerca de 50 centímetros de comprimento, esterilizado por óxido de etileno, foi introduzido na veia do animal através da agulha de cateterização, de modo que 20cm do seu comprimento ficasse exposto. A seguir, uma agulha 40x12 sem bisel foi acoplada a extremidade do catéter. Cinco mL de uma solução de citrato de sódio 3% foram injetados para evitar coagulação de sangue no interior do cateter. Este foi fechado com uma tampa confeccionada a partir da extremidade de uma seringa de 1mL (seringa de insulina). Em seguida, a porção exposta do catéter foi fixada à pele com auxílio de esparadrapos e cola *Super-bonder*®. O catéter permaneceu enrolado e protegido por uma bolsa de curvim (dimensões: 10x10cm, confeccionada para este intuito) fixada à pele do animal com cola *Super-bonder*®. A bolsa de curvim utiliza sistema de velcro. Como a canulação ocorre um dia antes da coleta seriada de amostras, concluído esse procedimento os animais foram reconduzidos ao seu pasto habitual onde aguardaram até o dia seguinte, quando foram conduzidos ao estábulo para a coleta.

No estábulo os animais permaneceram todo o tempo contidos por cabresto e receberam alimento volumoso e água à vontade. Cada animal foi identificado por uma fita adesiva colorida, que foi aplicada à bolsa de curvim, na estante de tubos para acondicionamento de amostras e nas seringas utilizadas para coleta de amostras, administração de tratamentos e aplicação de solução anticoagulante.

O material necessário para a coleta de sangue foi todo organizado sob uma mesa:

- seringas de 10mL estéreis;
- estantes com tubos para amostras;
- frasco de citrato de sódio 3% em gelo (solução anticoagulante);
- material necessário para a realização, se necessário, de nova cateterização;
- tubos, agulhas e adaptadores para tubos evacuados (16 x 100mm, com heparina sódica; N.C. *Vacutainer*[®]) usados para a coleta de sangue no caso de qualquer problema com o catéter;
- caixas térmicas com gelo para acondicionar e transportar as amostras até o laboratório e acondicionar a solução de citrato de sódio 3%;
- planilha contendo os números dos animais e amostras obtidas;
- cronômetro.

Uma vez verificado em todos os animais a funcionalidade dos catéteres, teve início a coleta seriada das amostras. A coleta foi efetuada a cada 30min durante 13h (experimento 1) ou 14h (experimento 2) seguintes.

Com o cronômetro programado para soar o alarme no momento de cada coleta, obedeceu-se o seguinte procedimento de coleta:

- abriu-se a bolsa e se expõe o catéter;

- retirou-se a tampa do catéter;
- acoplou-se ao catéter uma seringa de 10mL e retira-se de 5 a 10mL de sangue;
- desprezou-se o conteúdo (contém solução de citrato que estava interior do cateter);
- com a mesma seringa, aspirou-se 10mL de sangue (amostra de sangue);
- com outra seringa injetou-se de 3 a 5 mL de solução de citrato de sódio 3% no catéter, visando impedir a formação de coágulos no seu interior;
- colocou-se novamente a tampa no catéter;
- dispensou-se a amostra em tubo de vidro (16x100mm, borosilicate glass, Fisherbrand®) contendo 170 μ L de citrato de sódio 30%;
- identificou-se o número do animal e o número da amostra no tubo; homogeneizou-se cuidadosamente o conteúdo do tubo;
- acondicionou-se o tubo em gelo;

As seringas com anticoagulante e as com amostras são reaproveitadas. Cada uma recebe uma identificação de acordo com a cor do adesivo do animal

A retirada do catéter do animal foi feita ao fim das coletas. A bolsa foi retirada por simples tração, trazendo consigo o catéter e os animais receberam injeção de 15mL de uma associação de antibiótico e antiinflamatório (penicilina + estreptomicina + diclofenaco sódico; NC Pentfort Reforçado, da Ourofino).

A cada 60min todas as amostras de sangue coletadas foram levadas ao laboratório em caixa térmica com gelo.

No laboratório realizou-se o procedimento de extração do plasma das amostras. Os tubos contendo as amostras foram colocados nos adaptadores da centrífuga e levados a própria (4°C, 3000rpm, 30min). Os adaptadores contendo as

amostras de sangue foram equilibrados para peso dois a dois, e posicionados de maneira oposta na centrífuga.

Terminada a centrifugação, um a um, os tubos de vidro têm seu plasma transferido, com auxílio de pipetas tipo Pasteur descartáveis, para respectivos frascos plásticos de 5mL de capacidade (75 x 12mm, NC *Starstedt* nº 55-526). O tubo plástico foi identificado (número da amostra, do animal, iniciais do responsável pelo experimento e data) tampado e colocado em estantes também identificadas (número da amostra, do animal, iniciais do responsável pelo experimento e data). As amostras nas estantes foram acondicionadas a -20°C . As amostras de plasma permaneceram armazenadas nestas condições até a realização dos radioimunoensaios (RIE).

3.7 Dosagem de PGFM

A técnica para dosagem do metabólito PGFM utilizada foi a de RIE pelo radioisótopo Trício (H^3). Como esta não é uma técnica executada por meio de "quites" vários procedimentos para a obtenção e/ou manufatura de reagentes foram efetuados antes de executado o RIE propriamente dito. Estes procedimentos foram:

Obtenção de plasma livre de PGFM

O plasma livre de PGFM é imprescindível na dosagem deste metabólito por RIE. Como este ensaio é executado em amostras de plasma, os tubos da curva padrão, do NSB ("non-specific-binding"), do TC ("total count") e do B0 ("binding") precisam também conter plasma em favor do coeficiente de variação intra ensaio. Na preparação da curva padrão e das referências, adiciona-se quantidades

conhecidas de PGFM a um volume conhecido de plasma, que deve ser livre de PGFM.

Há indicações de que a raça bovina da qual é obtido o plasma livre de PGFM pode interferir com o ensaio (Marie-Joelle Thatcher, comunicação pessoal). Desta forma, obteve-se plasma livre de PGFM de animais especificamente da raça Holandesa.

O procedimento para obtenção de plasma livre de PGFM foi realizado segundo orientação de Marie-Joelle Thatcher (comunicação pessoal).

Vacas adultas sadias foram submetidas a duas aplicações de flunixin meglumine (NC *Flunamine*®; 2mL por 45 kg de PV), a primeira 16h antes da coleta e a segunda a 4h da coleta.

O flunixin meglumine é uma droga anti-prostaglandínica que age inibindo a COX-2, enzima precursora da $\text{PGF}_{2\alpha}$). O plasma obtido do animal tratado com esta droga possui concentração de PGFM muito próxima da basal.

O volume máximo de sangue coletado de cada animal foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Peso do animal} \times 7\% = N \text{ (volume total de sangue estimado)}$$

$$N \times 10\% = \text{vol. Máximo que pode ser coletado}$$

Para a coleta de sangue, os animais foram contidos e a veia jugular puncionada por uma agulha 12 Ga (NC *Veterinary Luer Needle* da *Perfectum*®). Um equipo foi acoplado a esta agulha para o transporte do sangue até um erlenmeyer de 1L acondicionado em gelo (citrato de sódio 10%, 1mL de citrato para cada 20mL de sangue). Foi feita a homogeneização constante do recipiente.

No laboratório, o sangue foi transferido para tubos de 50mL. Estes tubos foram colocados na centrífuga previamente resfriada (4°C) centrifugados por 30 min a 3000rpm. Logo após o fim da centrifugação, o plasma foi retirado dos tubos com auxílio do pipetador automático e acondicionado em frascos plásticos de 1L ou 250mL, devidamente identificados e estes armazenados a -20°C.

O volume de plasma obtido correspondeu a 55 a 65% do volume de sangue coletado, dependendo da eficiência no procedimento e do indivíduo (conforme hematócrito).

Diluição e aliquotagem da PGFM

Para a preparação da solução estoque de PGFM 1mg de PGFM (Sigma, D4143) foi diluído em 1mL de ETOH absoluto (solução estoque A). A seguir, a solução estoque A foi diluída em solução tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 contendo 0,1g/L NaNO₃ (tampão tris-HCl) a concentração de 1µg/mL (solução estoque B). A solução estoque B foi subdividida em alíquotas de 500 µL e armazenada a -20°C. Essa solução de 1µg/mL foi utilizada como solução inicial para a preparação de curvas padrão nos RIE para PGFM.

Preparação das soluções referências de PGFM

Soluções de alta (50pg/mL), média (100 e 500pg/mL) e baixa (1000pg/mL) concentração de PGFM foram preparadas pela diluição da solução estoque de PGFM de 1µg/mL em plasma livre de prostaglandinas obtido de vacas Holandesas. As referências foram aliquotadas e armazenadas a -20°C. Alíquotas individuais foram utilizadas para cada experimento. Estas referências devem fazer parte de um RIE para se avaliar o coeficiente inter e intra-ensaio.

Diluição e determinação da capacidade de ligação de anticorpo anti-PGFM

O anticorpo utilizado nos RIEs de PGFM foi gentilmente cedido pelo Prof Dr. William Thatcher da Universidade da Flórida. Seguindo as instruções do doador, o anticorpo liofilizado e armazenado em microtubos foi reconstituído em 500µL de água destilada, gerando uma solução de diluição final 1:100.

Para a execução do RIE para PGFM recomenda-se que a diluição do anticorpo promova capacidade de ligação de aproximadamente 30%. Assim, nos estudos preliminares foram testadas as seguintes diluições de anti-PGFM: 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 e 1:16000. Executados os estudos, diluições entre 1:5000 e 1:7000 foram as utilizadas.

Diluição da solução de PGFM radioativa para RIE.

A partir de uma solução inicial de PGFM radioativa obtém-se uma solução final diluída em Tris-HCL. A concentração da solução final deve obter contagem total entre 13000 e 16000 DPM/100µL. Cada tubo do ensaio recebe de 2,4 a 3,8µL/mL de PGFM triciada.

O RIE de PGFM.

O ensaio é realizado em duas etapas.

Na primeira etapa, é feito o ensaio propriamente dito onde a curva padrão, NSB, TC, B0, referências e amostras são pipetadas para tubos de ensaio (borosilicate glass, Fisherbrand®) que são acrescidos com solução tampão Tris-HCl, anticorpos e antígeno marcado com H3 (conforme tabela elucidativa abaixo). Esses tubos são encubados em temperatura específica.

Após esse período, tem-se início a segunda etapa que compreende a separação do antígeno ligado (radioativo) do não-ligado (não radioativo) aos anticorpos, utilizando-se procedimento com solução de Polietilenoglicol (PEG).

Acrescenta-se o líquido de cintilação e faz-se as contagens no Contador de Líquido de Cintilação. Todas as pipetagens do RIE são executadas em duplicata.

As etapas do RIE para PGFM brevemente comentadas acima serão elucidadas a seguir

Primeiramente obtém-se as diferentes concentrações da curva padrão (15,12; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000; 8000pg de PGFM não radioativa em "tubos adjuntos". Pipeta-se 100 μ L de cada um dos "tubos adjuntos" para os correspondentes tubos da curva padrão do ensaio. Procede-se em seguida com a pipetagem das referências iniciais (que se encontram logo após os tubos da curva padrão, 300 μ L/tubo), das amostras (300 μ L/tubo) e das referências finais (que se encontram no final do ensaio, 100 μ L/tubo). Imediatamente antes da pipetagem de cada tubo da curva padrão, referência ou amostra procede-se com a homogeneização dos mesmos. Próxima medida é a pipetagem de plasma livre de PGFM para os tubos da curva padrão, NSB, TC e B0 (300 μ L/tubo). Pipeta-se o Tris-HCl 0.05M pH 7.5. São 200 μ L para cada um dos tubos de NSB, 500 μ L para os de TC, e 100 μ L para os de B0, 100 μ L para os das referências iniciais, 100 μ L para os das amostras e por fim 100 μ L para os das referências finais. Todos os tubos do ensaio com exceção dos NSB e TC recebem solução de anticorpo, sofrem homogeneização simultânea por 30seg em um vórtex multi-tubos e são encubados por 30min a temperatura ambiente. Em seguida pipeta-se 100 μ L de PGFM radioativa em cada um dos tubos do ensaio sem exceção. Ao fim da primeira etapa, nova homogeneização por 30seg, e o ensaio é encubado por 16 a 20h.

A curva padrão para o RIE de PGFM segue o seguinte esquema:

Solução a ser acrescentada	Tris HCL em µL	Diluição final em pg/mL
Sol. Estoque de PGFM (1µg/mL) 16µL →	1984 (sol 1)	8000
(sol 1) 1000µL →	1000 (sol 2)	4000
(sol 2) 1000µL →	1000 (sol 3)	2000
(sol 3) 1000µL →	1000 (sol 4)	1000
(sol 4) 1000µL →	1000 (sol 5)	500
(sol 5) 1000µL →	1000 (sol 6)	250
(sol 6) 1000µL →	1000 (sol 7)	125
(sol 7) 1000µL →	1000(sol 8)	62,5
(sol 8) 1000µL →	1000(sol 9)	31,25
(sol 9) 1000µL →	1000 (sol 10)	15,12

Após este período de encubação inicia-se a segunda etapa do RIE. No início desta etapa os tubos de TC são momentaneamente excluídos dos procedimentos de pipetagens, centrifugações, homogeneizações etc. Os tubos TC permanecem a temperatura de 4⁰C. Os outros tubos recebem cada um 750µL de PEG 8000 a 40% (PEG, Fisher®), são agitados por 1min (vórtex) e colocados para centrifugar por 30 min, a 3000 x G e 4⁰C. Após a centrifugação os tubos são colocados em racks de espuma e vertidos por 10min, para a retirada do sobrenadante. Os "pellets" ao fundo dos tubos são ressuspensos em solução Tris-HCL (750µL/tubo) e levados a centrífuga (30min, 3000 x G, 4⁰C). Novamente os tubos são colocados nas racks de espuma e vertidos (10min). Os "pellets" sofrem nova ressuspensão ao receberem 1000µL/tubo de solução. Os tubos TC também recebem esta mesma quantidade da solução Tris-HCL. Todos os tubos (inclusive os TC) são agitados por 3min. Procedese neste momento com a vertedura do conteúdo dos tubos de ensaio para os tubos de plástico. Ao conteúdo de cada um dos tubos de plástico é então adicionado 4500µL de líquido de cintilação (ScintiVerse Bio-HP®; Wallac). Os tubos são

fechados e o seu conteúdo homogeneizado. Os tubos de plástico são acondicionados em “racks” específicas e levados ao contador de radiação beta (1409DSA Liquid Scintillation Counter; Wallac). Após a aferição da radiação, os resultados são transferidos para uma planilha do programa "Quattro Pro". Este programa cria uma curva padrão que transforma estes resultados em DPM (Desintegrações por Min) em pg/mL de PGFM.

O esquema geral do RIE para PGFM segue o seguinte protocolo.

1º etapa	NSB	TC	B0	Curva padrão	amostras	Referências
Curva padrão	—	—	—	100µL	—	—
Amostras	—	—	—	—	300µL	—
Referências	—	—	—	—		300µL
Tris-HCL	200µL	500µL	100µL	—	100µL	100µL
Plasma flunixin meglumine	300µL	—	300µL	300µL	—	—
Anti-PGFM	—	—	100µL	100µL	100µL	100µL
³ H-PGF2M	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL
2º etapa						
PEG (16 a 20h após 1º)	750µL	—	750µL	750µL	750µL	750µL
Tris-HCL	750µL		750µL	750µL	750µL	750µL
PEG	750µL		750µL	750µL	750µL	750µL
Tris-HCL	1000µL	1000µL	1000µL	1000µL	1000µL	1000µL
Líquido de cintilação	4500µL	4500µL	4500µL	4500µL	4500µL	4500µL

3.8 Delineamento Experimental

Experimento 1

No dia 15 do ciclo estral sincronizado, um total de 8 animais foi dividido em dois grupos, sendo um grupo controle (n=4) que recebeu ETOH (0,086mL/kg de peso vivo) e um grupo tratado (n=4) que recebeu RU486 (3mg por kg de peso vivo em 34,78mg/mL de ETOH; IV; hora 3). Animais de ambos os grupos receberam injeção de 17 β -estradiol (3mg i.v.; hora 4). Amostras de sangue foram coletadas a cada 30min por 13h. Estas amostras foram armazenadas e posteriormente analisadas por RIE para dosagem de PGFM.

Para a análise estatística do experimento 1 foram utilizadas amostras coletadas a cada 60 min para as duas primeiras e as duas últimas horas e a cada 30min para as demais horas do experimento. Os dados analisados não se mostraram adequados quanto à normalidade dos resíduos (Teste de Shapiro-Wilk, $P < 0,01$) e homogeneidade das variâncias (Teste F, $P < 0,01$) e foram transformados por $\log_{10}$ e reanalisados. Essa transformação adequou os dados à análise de variância (Shapiro-Wilk e F; $P \geq 0,01$). Os dados transformados foram analisados por ANOVA, utilizando-se o proc MIXED do programa SAS (SAS INSTITUTE, 1988). A variável dependente é produção de PGFM (pg/mL). São variáveis independentes: tratamento, tempo e interação tratamento x tempo. Vaca dentro de tratamento foi usada como variável aleatória.

Experimento 2

Após a sincronização do cio do rebanho e canulação, um total de 9 animais foi selecionado para este experimento. O experimento foi executado em animais no dia 17 do ciclo estral, divididos em três grupos. Cada um dos grupos recebeu 0

(n=3), 0,03 (n=3) ou 0,06 (n=3) mL ETOH/kg peso vivo, i.v., na hora 3. O ETOH 90% foi infundido continuamente por 30 min pela mesma via de coleta das amostras de sangue. A escolha das doses de ETOH foi baseada na capacidade de solubilização do RU486 nesse solvente. Morgan et al. (1993), utilizaram o RU486 à dose de 50mg/mL de ETOH 90%. No experimento 1 desse trabalho foi utilizada a dosagem de RU486 de 34,78 mg/mL de ETOH 90%. Assumindo-se diluições de RU486 a 50mg/mL ou 100mg/mL de ETOH e assumindo-se a dosagem de RU486 de 3mg/kg de peso vivo, derivam-se as doses de 0,06 e 0,03mL de ETOH por kg de peso vivo, respectivamente.

Todos os animais também receberam uma injeção de E₂ (3mg; i.v.; hora 4). Amostras de sangue foram coletadas a cada 30min por 14h. As amostras de plasma foram armazenadas a -20°C e posteriormente analisadas por RIE para dosagem de PGFM.

Considerando-se que os efeitos do E₂ iniciam-se em média 3h após sua aplicação, e uma vez que o E₂ foi aplicado na hora 4 no presente estudo, analisou-se as concentrações de PGFM da hora 0 à hora 7 (análise 1; efeitos do ETOH) e da hora 7:30 à hora 13:30 (análise 2; efeitos do E₂) separadamente. Os dados analisados não se mostraram adequados quanto à normalidade dos resíduos (Teste de Shapiro-Wilk; $P \leq 0,01$) e homogeneidade das variâncias (Teste F; $P \leq 0,01$), foram transformados por $\log_{10}$ e reanalisados. Os dados foram então adequados à análise de variância (Shapiro-Wilk e F; $P \geq 0,01$), transformados e analisados por ANOVA, utilizando-se o proc MIXED do programa SAS (SAS Institute, 1988). Por uma questão de clareza, os dados provenientes das duas análises estão apresentados conjuntamente como LSmeans $\pm$ EPM na Fig. 3. A variável dependente foi produção de PGFM (pg/mL). Foram variáveis independentes: tratamento, tempo e interação

tratamento x tempo. Vaca dentro de tratamento foi usada como variável aleatória. Utilizou-se a opção “slices” do proc MIXED para se separar as médias em cada tempo especificamente.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

No experimento 1 houve interação tratamento x tempo ($P \leq 0,01$) e, através do teste de efeito de "Slice", demonstrou-se que a as concentrações plasmáticas de PGFM diferiram estatisticamente nas amostras coletadas nas horas 4:00, 4:30, 5:00, 5:30, 6:00, 6:30, 9:00 e 9:30 ($P \leq 0,1$) a partir do início do experimento (Figura 01, Tabela 01).

O ETOH utilizado como veículo para o RU486 e como placebo para os animais controle, nitidamente estimulou a liberação de PGFM em ambos os grupos. Porém os animais do grupo tratado com RU486 apresentaram uma maior liberação, comprovada pela diferença estatística nas amostras coletadas entre as horas 4:00 e 6:30. Isto ocorreu uma hora após a injeção de RU486/ETOH (Figura 01). Este fato indica que o RU486 estimulou a liberação de PGFM.

Tabela 01 - Análise de variância dos quadrados mínimos da concentração plasmática de PGFM de vacas no 15º dia do ciclo estral, tratadas com 3mg (n=8) de 17β-estradiol e com 3 mg/kg de RU486 (n=4).

Fontes de variação	GL	Pr > F	Termo de erro
Tratamento	1	0,023	Vaca(trat)
Vaca(Trat)*	7	0,0001	Resíduo
Tempo	19	0,0001	Resíduo
Trat x Tempo	19	0,0017	Resíduo

*Dado extraído do proc GLM

Figura 01 - Médias das concentrações de PGFM (Lsmeans $\pm$ EPM) de vacas no dia 15 do ciclo estral tratadas com 0 mg/kg (controle; n=4; IV) ou 3 mg/kg de RU486 (RU486; n=4; i.v.) na hora 3 e 3 mg de E₂ na hora 4 para ambos os grupos.

* $P \leq 0,01$

Estudos realizados por Castro e Paula (2003) e por Thatcher et al. (1986) apontaram estimulação da produção de PGFM em vacas no final da fase luteínica a partir de 3 horas da aplicação de E₂. Apesar deste estímulo ter ocorrido no experimento 1, ele veio a acontecer apenas 5 horas depois da aplicação do E₂ (Figura 01). Este fato pode ter ocorrido devido ao pico de liberação de PGFM causado previamente pelo ETOH que pode ter ocasionado um atraso da resposta de produção de PGF_{2α} ao E₂ no endométrio.

Alguns fatos interessantes foram observados com a análise dos resultados do experimento 1. Primeiro, houve aguda liberação de PGFM pelos animais de ambos os grupos em resposta à injeção de ETOH 90%. Segundo, a produção de PGFM em resposta a injeção de E₂ foi muito semelhante em ambos os grupos. Terceiro, o grupo tratado com RU486 apresentou pico de liberação de PGFM maior que no grupo controle. Interpretou-se também nesse experimento que, possivelmente, a resposta ao E₂ tenha sido influenciada pela injeção anterior ETOH.

O RU486 não só não inibiu a liberação de PGFM no plasma como estimulou-a. Algumas hipóteses para o estímulo da liberação de PGFM causada pelo RU486 foram levantadas.

Uma delas trata da inespecificidade de ligação do RU486. O RU486 talvez seja o antagonista para receptores de P₄ mais utilizado nos dias de hoje (JANH; BENET, 1997). Porém existem outros antagonistas mais modernos. O Org 31710, por exemplo, é um dos novos antagonista para receptores de P₄. Sua afinidade por estes receptores é muito similar a do RU486 (PALL et al., 2000), no entanto, sua capacidade de se ligar a receptores de glicocorticóides é 30 vezes menor que a do RU486 (KLOOSTERBOER; DECKERS; SCHOONEM, 1994). Os glicocorticóides parecem exercer várias funções na fisiologia ovariana, inclusive na ovulação

(SOLIMAN; WALKER, 1997). A ligação do RU486 com receptores de glicocorticóides pode ter ocorrido no experimento 1. Em se dependendo da proporção que essas ligações possam ter ocorrido, o menor efeito da liberação de PGFM no grupo tratado em comparação com o grupo controle, aguardado para confirmar a hipótese deste trabalho, pode ter sido mascarado.

Outro fator que pode ter ocasionado o estímulo da liberação de PGFM pelo RU486 é o efeito sinérgico que parece entre o LH e o E₂ na produção de PGF_{2α} (CANINO et al., 1998, não publicado). Após a estimulação de E₂ nos folículos, o LH induz a expressão de COX-2, enzima necessária a síntese de PGF_{2α} (LIU et al., 1997). Em estudo *in vitro* com células endometriais, (CANINO et al., 1998, não publicado), verificaram que adição de E₂ ou HCG isoladamente no cultivo não causou estímulo ou inibição consideráveis da produção de PGF_{2α}, no entanto, a associação do E₂ com o HCG estimulou a produção de PGF_{2α}.

Utilizando ovelhas, Skinnerr et al. (1998) estudaram o perfil da liberação de pulsátil de LH e o bloqueio destes pulsos pela P₄. Ovelhas com implantes intravaginais de P₄ apresentaram bloqueio da liberação de LH. Porém este bloqueio deixou de existir minutos após a administração de RU486 (SKINNER; BOUCHARD; CARATY, 1999). No experimento 1 do trabalho apresentado nessa dissertação, a administração do RU486 nos animais pode ter causado um desbloqueio da liberação de LH. Este LH associado ao E₂ previamente aplicado provocaria um estímulo da liberação de PGF_{2α} (CANINO et al., 1998, não publicado), aferido pela dosagem de PGFM no plasma.

Uma outra hipótese que corrobora para o efeito de não decréscimo da liberação de PGFM verificado nesse trabalho é o efeito paradoxo do RU486 sob os receptores de P₄. Em revisão sobre como a P₄ estimula sua própria secreção,

Rothchild (1996), comenta que o RU486 pode tanto prevenir este estímulo da P_4 quanto, dependendo da condição do CL, agir como a própria P_4 . Os receptores para P_4 aparentemente existem em 3 formas: A, B e C (GIBORI; GU; SRIVASTAVA, 1995). Uma das principais diferenças entre os 3 parece ser apresentada pelo receptor de P_4 do tipo B que sob certas condições (do CL e do ovário) ao se acoplar ao RU486 agiria também como P_4 (HORWITZ et al., 1995). Por outro lado o receptor de P_4 do tipo A, além de sempre transmitir ação bloqueadora do antagonista (ROTHCHILD, 1996) também pode bloquear a ação agonista do complexo receptor P_4 tipo B/RU486 (HORWITZ et al., 1995). As amostras analisadas no experimento foram coletadas de animais em final da fase luteínica. O final dessa fase do CL pode ter proporcionado condição necessária para que o complexo receptor P_4 tipo B/antagonista RU486 exercesse ação agonista ao invés de antagonista para P_4 . Neste caso o não decréscimo da liberação de PGFM no plasma obtida no grupo tratado (RU486) em comparação ao grupo controle (E_2) do experimento 1 seria decorrente da ação sinérgica do E_2 e do complexo receptor P_4 tipo B/RU486. Algum outro mecanismo, como o acoplamento do RU486 a receptores de glicocorticóides ou o sinergismo entre E_2 + LH, pode ser apontado como responsável pelo aumento da liberação de PGFM dos animais do grupo tratado em comparação com o controle.

No decorrer do experimento 1, alguns animais apresentaram posição de decúbito external, taquicardia e taquipnéia, imediatamente após o início da aplicação do tratamento (ETOH ou ETOH + RU486). Todos os animais do experimento foram clínica e semiologicamente monitorados pelos veterinários no local. Após as análises clínicas houve um consenso entre os veterinários em apontar estes sintomas de desconforto como decorrente da dosagem e da via de aplicação do ETOH.

É interessante que se comente o papel assumido pelo ETOH 90%, utilizado como solvente para o RU486 nesse estudo, uma vez que, a estimulação da produção de PGFM em resposta aos álcoois tenha sido um fato não aguardado. A concentração plasmática de ETOH 90% na corrente sanguínea dos animais pode ter sido a causadora do alto pico de liberação de PGFM aferido na amostra coletada imediatamente após o início da infusão do ETOH 90%.

O RU486 mostrou-se uma substância de baixa solubilidade e durante o seu preparo para o experimento 1 optou-se por aumentar o volume do solvente (ETOH 90%) a fim de se facilitar o processo de diluição. Algumas vacas receberam mais de 60mL de ETOH 90%, IV, infundidos a um fluxo de 5mL por minuto.

O efeito liberador de prostaglandinas por álcoois é encontrado na literatura, mas não em específico para a $\text{PGF}_{2\alpha}$. Anton et al. (1990) utilizaram ETOH em tecido uterino de camundongo e demonstraram um aumento de 20% na liberação de prostaglandina E_2 (PGE_2). Greengerg et al. (1993) verificaram a liberação de prostaglandinas após aplicação de ETOH em estudo de tecido arterial e venoso de pulmões bovinos. Boking et al. (1993) verificaram que a administração de ETOH em ovelhas prenhes aumentou a concentração de PGE_2 plasmática.

No experimento 2 a análise estatística foi executada separadamente. Foram analisados efeito do ETOH e do E_2 . A análise do efeito do ETOH (hora 0 à hora 7) demonstrou uma tendência para interação tratamento por tempo ($P \leq 0,057$; Tabela 02). Pela interpretação da análise de “slices” do proc Mixed do SAS demonstrou-se que existe diferença entre as médias dos tratamentos nos tempos 3:30, 4:00 e 4:30 (Figura 02). Essas diferenças devem-se a manutenção das concentrações plasmáticas de PGFM nos animais controle em comparação com o pico de liberação ocorrido nos animais que receberam ETOH.

Tabela 02 - Análise de variância dos quadrados mínimos da concentração plasmática de PGFM de vacas no 17º dia do ciclo estral, tratadas com etanol e E₂ da hora 0:00 à hora 7:00 (análise do efeito do ETOH).

Fontes de variação	Pr > F	Termo de erro
Tratamento	0,3	Vaca (tratamento)
Vaca (Tratamento)*	0,01	Resíduo
Tempo	0,01	Resíduo
Tratamento x Tempo	0,057	Resíduo

*Dado extraído do proc GLM

À análise do efeito da injeção de E₂ (tabela 3), não foi possível detectar-se efeito de tratamento ou de interação tratamento por tempo ($P \geq 0,05$; Tabela 03), indicando que o E₂ estimulou de forma semelhante a produção de PGFM independente da concentração de ETOH.

Tabela 03 - Análise de variância dos quadrados mínimos da concentração plasmática de PGFM de vacas no 17º dia do ciclo estral, tratadas com ETOH e E₂ da hora 7:30 à hora 13:30 (análise do efeito do E₂)

Fontes de variação	Pr > F	Termo de erro
Tratamento	0,38	Vaca (tratamento)
Vaca (Tratamento)*	0,01	Resíduo
Tempo	0,01	Resíduo
Tratamento x Tempo	0,13	Resíduo

*Dado extraído do proc GLM

Figura 02 - Médias das concentrações de PGFM (Lsmeans $\pm$ EPM) de vacas no dia 17 do ciclo estral tratadas com 0 (n=3; IV); 0,03 (n=3; IV) ou 0,06 mL de etanol/kg de peso vivo (n=3; i.v.) na hora 3 e 3mg de E₂ na hora 4.

* Efeito de tratamento em determinado tempo ($P \leq 0,1$).

Apesar da dosagem da PGFM ser amplamente utilizada no monitoramento da liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na corrente sanguínea (BARTOL et al., 1981; GUILBAULT et al., 1984; HANSEN, 1982; KNICKERBOCKER et al., 1986; THATCHER et al., 1986), a especificidade do RIE para a PGFM foi questionada durante a discussão. Todos os animais após o experimento foram submetidos a US em intervalos de 24 a 48 h e a observação de cio 2 vezes ao dia para que se determinasse o final do ciclo estral vigente. Sete entre os 9 animais que fizeram parte do experimento 2 demoraram a retornar ao cio, sendo que no dia 33 do ciclo ainda restavam 3 animais que não haviam ovulado (dados adquiridos nesse trabalho). Esse atraso no retorno ao cio conota também extensão da fase luteínica. Esperava-se que após significativa liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (com base na concentração de PGFM aferida no RIE) o CL vigente de cada animal sofresse regressão. Outras prostaglandinas poderiam portanto, ter sido liberadas com a aplicação do ETOH, e os metabólitos originados das mesmas então apresentariam reação cruzada com o anticorpo para PGFM.

Porém foram levantadas ressalvas a respeito desta colocação sobre a inespecificidade do ensaio para PGFM. Para que ocorra a luteólise parece ser necessária que a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio se dê de forma pulsátil. Os picos de PGFM parecem variar de 1 a 5 h de duração e apresentar intervalos entre picos de 2 a 30 h (DUCHENS et al., 1995; KINDAHL et al., 1976; KOTWICA et al., 1998b). As concentrações plasmáticas de PGFM que durante a fase luteínica variam entre 10 a 100pg/mL, passam a 150 a 500pg/mL com a manifestação dos picos (KINDAHL et al., 1976; KOTWICA et al., 1998a; KOTWICA et al., 1998b). Portanto o único pulso de PGFM gerado não seria suficiente para desencadear a luteólise nos animais deste experimento. Mas vale a pena lembrar que, a luteólise, quando induzida, pode ocorrer após uma única aplicação de análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Outra

ressalva sobre a contestação da especificidade do RIE para PGFM é o fato de os dados gerados a partir da coleta de amostras de plasma no dia 15 do ciclo estral não terem sido analisados estatisticamente e, por isso, quaisquer considerações suportadas por estes dados devem ser interpretadas com restrição.

Foram coletadas amostras de sangue dos animais do experimento 2 também a partir do dia 17 até a detecção do cio a cada 24 h. Um dos intuitos da coleta destas amostras é a de se obter concentrações plasmáticas de P_4 . Esta análise não foi efetuada. De posse desta análise, talvez possa-se concluir se houve ou não regressão funcional do CL dos animais que receberam ETOH. Outros dados interessantes também poderiam ser gerados com a repetição do experimento 2 porém, analisando-se amostras de plasma de sangue coletado diretamente da veia uterina para que se possa mensurar diretamente a concentração $PGF_{2\alpha}$.

5 CONCLUSÕES

A hipótese deste trabalho não se confirmou verdadeira.

Não foi possível confirmar a P_4 ser um dos desencadeadores da luteólise utilizando-se a o RU486 para bloquear o suposto efeito estimulatório da P_4 em associação ao E_2 na liberação de PGFM.

Em animais no dia 15 do ciclo estral, o RU486 não só não inibiu a liberação de PGFM no plasma como a estimulou.

O ETOH 90% provocou pico de liberação aguda de PGFM no plasma em animais nos dias 15 e 17 do ciclo estral e tratados com E_2 .

O E_2 estimulou a liberação de PGFM em animais nos dias 15 e 17 do ciclo estral.

Houve atraso no surgimento dos picos de liberação de PGFM induzidos pelo E_2 .

REFERÊNCIAS

- ANTON, R.F.; BECKER, H.C.; RANDALL, C.L. Ethanol increases PGE and tromboxane production in mouse pregnant uterine tissue. **Life Sci.**, vol. 46, p.1145-1153. 1990.
- ARNOLD, D. R.; BINELLI, M.; VONK, J; ALEXENKO, A. P.; DROST, M.; WILCOX, C.J.; THATCHER, W. W. Intracellular regulation of endometrial PGF production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon tau. **Dom. Anim. Endocrin.**, v. 18, p. 199-216, 2000.
- ASSELIN, E.; GOFF, A. K.; BERGERON, H.; FORTIER, M. A. Influence of sex steroids on the production of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and $E_{2\alpha}$ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 371-379, 1996.
- BAIRD, D.T. Luteotrophic control of the corpus luteum. **Anim. Reprod. Sci.**, vol. 28, p. 95-102. 1992.
- BARTOL, F. F.; THATCHER, W. W.; LEIS, G. S.; BLISS, E. L. L.; DROST, E. L.; BAZER, F. W. Effects of estradiol-17 β on PGF and total protein content in bovine uterine flushing and peripheral blood concentration of 13,14-dihydro-15keto $PGF_{2\alpha}$. **Theriogen.**, v. 15, p. 345-358, 1981.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES M.O.; MADUREIRA E.H.; BÓ G.A.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R.; Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de p4 e taxa de prenhez. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.**, v. 28, n.1, p.218, 2000 (Supl.).
- BERGSTROM, S.; DANIELSSON, H.; KLENBERG, D.; SAMUELSSON, R. The enzymatic conversion of essential fatty acids into prostaglandin. **J. Biol. Chem.**, v. 239, p. 4006-4009, 1964.
- BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. **Simpósio sobre Controle Farmacológico do Ciclo Estral**, 2000.
- BLAIR, R. M.; SAATMAN, R.; LIOU, S. S.; FORTUNE, J. E. Roles of leukotrienes in bovine corpus luteum regression: an in vivo microanalysis study. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 216, p. 72-80, 1997.

- BOCKING, A. D.; SINERVO, K. R.; SMITH, G. N.; CARMICHAEL, L.; CHALLIS, J. R.; OLSON, D. M.; BRIEN, J. F. Increased uteroplacental production of prostaglandin E2 during ethanol infusion. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. 640-645, 1993.
- BOGACKI, M.; SILVIA, W.J.; REKAWIECK, R.; KOTIWICA, J. Direct inhibitory effect of progesterone oxytocin-induced secretion of prostaglandin from bovine endometrial tissue. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 184-188, 2002.
- BURNS, P. D.; GRAF, G. A.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Celular mechanisms by which oxytocin mediates uterine PGF_{2α} synthesis in bovine endometrium: role of phospholipases Cand A₂. **Dom. Anim. Endocrin.**, v. 14, n. 3, 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 bovine endometrial tissue *in vivo*. **Dom. Anim. Endocrin.**, v. 19, p. 237-246, 2000.
- BURNS, P. D.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Celular mechanisms by which oxytocin mediates uterine prostaglandin F_{2α} synthesis in bovine endometrium: role of calcium. **Dom. Anim. Endocrin.**, v. 15, n. 6, p. 477-487, 1998.
- 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, p. 262, 1999. Supplement 1.
- CASTRO E PAULA, L. A. As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o papel da ocitocina na produção de PGF_{2α}. **Não publicado**, 2003.
- CASTRO E PAULA, L.,A.; LOUREIRO, J. G. P.; MEMBRIVE, C. M. B.; CUNHA, P. M.; BERTHOLAZZI, A.; JORGE, P.; MADUREIRA, E. H.; BINELLI, M. Effects of estradiol-17β on prostaglandin F_{2α} (PGF) secretion in cattle: in vitro and vivo responses. **Biol. Reprod.**, v 66, p. 324, 2002. Supplement 1.
- DENAMMUR, R.; MARTINET, J.; SHORT, R. V. Secretion of progesterone by corpus luteum of the ewe after hypophysectomy, pituitary stalk section and hysterectomy. **Acta Endocrinol.** vol. 52, p.72-90. 1996.
- DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **J. Reprod. Fert.**, v. 59, p 463, 1980.

- DOUALLA-BELL, F.; GUAY, J. M.; BOURGOIN, S.; FORTIER, M. A. Prostaglandin G/H synthase (PGHS)-2 expression in bovine myometrium: influence of steroid hormones and PGHS inhibitors. **Biol Reprod**, v. 59, n. 6, p. 1433-1438, 1998.
- DUCHENS, M.; KINDAHL, H.; FORSBERG, M.; USTAFSSON, H.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of low plasma progesterone concentrations on the release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ during luteolysis and oestrus in heifers. **Anim. Reprod. Scien.**, v. 40, p. 261-268, 1995.
- FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G. D. Morphometric analysis of the cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v. 35, p. 1299-1308, 1986.
- FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogen.**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.
- FLINT, A. P. F.; SHELDRIK, E. L.; McCANN, T. L.; JONES, D. S. C. Luteal oxytocin: characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin and $PGF_{2\alpha}$ secretion at luteolysis in ruminants. **Dom. Anim. Endocrin.**, v7, n. 2, p. 111-124, 1990.
- FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S. RUAS, J. R. M.; PINTO NETO, A.; ALVI, M. T. T.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, W. S. Perfil plasmático de progesterona de novilhas receptoras tratadas com diferentes hormônios no 5º dia do ciclo estral. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.**, v.28, n.1, p.260, 2000 (Supl.).
- FORD, S. P.; CHRISTENSON, R. K.; CHENAULT, J. R. Pattern of blood flow to the uterus and ovaries of ewes during the period of luteal regression. **J. Anim. Sci.**, v. 49, p. 1510-1516, 1979.
- FULLER, G. B.; HANSEL, W. Regression of sheep corpora lutea after treatment with antiovine luteinizing hormone. **J. Anim. Sci.**, v. 31, p. 99-103, 1970.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Scien.**, v. 294, p. 187-1875, 2001.
- GIBORI, G.; GU, Y.; SRIVASTAVA R. K. Differential gene expressions and programmed cell death in two cell populations forming the rat deciduas. Dey SK (ed.), *Molecular and Cellular Aspects of Preimplantation Processes*. NYC: Springer, p. 69-83, 1995.

- GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, P. R. Secretion of angiogenic activity and progesterone by ovine luteal cell types in vitro. **J. Anim. Sci.**, vol. 69, p. 2099-2107, 1991.
- GREENBERG, S.S.; XIE, J.; WANG, Y.; KOLLS, J.; SHELLITO, J.; NELSON, S.; SUMMER, W.R. Ethanol relaxes pulmonary artery by release of prostaglandin and nitric oxide. **Alcohol.**, vol.10, p. 9-21, 1993.
- GUILBAULT, L. A.; THATCHER, W. W.; FOSTER, D. B.; CATON, D. Relationship of 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin $F_{2\alpha}$ concentrations in peripheral plasma with local uterine production of F series prostaglandins and changes in uterine blood flow during the early postpartum period of cattle. **Biol. Reprod.**, v. 31, p 870-878, 1984.
- HANSEN, H. S. Purification and assay of 15-keto prostaglandin 13-reductase from bovine lung. **Methods Enzymol.**, V. 86, p. 156-162, 1982.
- HIXON, J. E., FLINT, A. P. F. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin $F_{2\alpha}$ secretion in sheep. **J. Reprod. Fert.**, v. 79, p. 457-467, 1987.
- HOOPER, S. B.; WATKINS, W.B.; THORBURN, G. D. Oxitocin, oxitocin-associated-neurophysin, and prostaglandin $F_{2\alpha}$ concentration in the utero-ovarian vein of pregnant and non-pregnant sheep. **Endocrin.**, v. 119, p. 2590-2597, 1986.
- HORWITZ, K. B.; SARTORIUS, C. A; HOVLAND, A. R.; JACSON, T. A. GROSHONG, S. D.; TUNG, L. TAKIMOTO, G. S. Surprises with antiprogestins: a novel mechanisms of progesterone receptor action. In: Non-reproductive actions of sex steroids. **Ciba Foundation Symposium 191**. Chichester: Wiley, p. 235-253, 1995.
- HOWARD, H. J.; BRITT, J. H. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ causes regression of a HCG-induced corpus luteum before day 5 of its lifespan in cattle. **J. Reprod. Fert.**, v. 90, p. 245-253, 1990.
- HUGHES, T. L.; VILLA-GODOY, A.; KESNER, J. S.; FOGWELL, R. L. Destruction of bovine ovarian follicles: effects on the pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced luteal regression. **Biol. Reprod.**, v. 36, p. 523-529, 1987.

- JANG, G. R.; BENET, L. Z. Antiprogestin pharmacodynamics, pharmacokinetics, and metabolism: implications for their long-term use. **J. Pharm. Bioph.**, v. 25, p. 647-672, 1997.
- KINDAHL, H.; EDQVIST, L-E.; GRANSTROM, E.; BANE, A. The release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ as reflected by 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin $F_{2\alpha}$ in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. **Prostag.**, v. 11, n. 5, p. 871-879, 1976.
- KLOOSTERBOER, H.J.; DECKERS, G.H.; SCOONEN, W.G.; Pharmacology of two new very selective antiprogestogens: ORG 31710 and ORG 31806. **Hum. Reprod.** vol. 9, p. 47-52. 1994.
- KNICKERBOCKER, J. J.; THATCHER, W. W.; FOSTER, D. B.; WOLFENSON, D.; BARTOL, F.F.; CANTON, D. Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol-17 β in cyclic cattle. **Prostag.**, v. 31, p. 757-770, 1986.
- KOTWICA J.; SKARZYNSKI D.; BOGACKI M.; MELIN P.; STAROSTKA B. The use of an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. **Theriogen.**, v. 48, p1287-1299, 1997.
- KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; JAROSZEWSKI, J.; WILLIAMS, G. L.; BOGACKI, M. Uterine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ stimulated in different doses of oxytocin and released spontaneously during luteolysis in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 38, p. 217-226, 1998b.
- KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, 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. 1998a.
- LAFRANCE M.; GOFF A. K. Control of bovine uterine prostaglandin $F_{2\alpha}$ release *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 42, p. 288-293, 1990.
- LAFRANCE M.; GOFF A. K. Effects of Progesterone and oestradiol-17 β on oxytocin-induced release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in heifers. **J. Reprod. Fert.**; v.82; p. 429-436; 1988.
- LAMMING, G. E.; DARWASH, A. O.; BACK, H. L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. **J. Reprod. Fert.**, v. 37, p. 245-252, 1989.

- LIU, J.; CARRIERE, P. D.; DORE, M.; SIROIS, J. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1524-1531, 1997.
- MANN, G. E. Hormone control of prostaglandin $F_{2\alpha}$ production and oxytocin receptor concentration in bovine endometrium in explant culture. **Dom. Anim. Endocrin.**, v. 20, p. 217-226, 2001.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of the development of the of the luteolytic signal in cows. **J. Reprod. Fert.**, v. 104, p. 1-5, 1995.
- MORGAN, G. L.; GEISERT, R. D.; McCANN, J. P.; BAZER, F. W.; OTT, T. L.; MIRANDO, M. A.; STEWART, M. Failure of luteolysis and extension of the interoestrous interval in sheep treated with the progesterone antagonist mifepristone (RU 486). **J. Reprod. Fert.**, v. 98, p. 451-457, 1993
- McCRACKEN, J. A.; SCHAMM, W.; OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of $PGF_{2\alpha}$ from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Anim. Reprod. Scien**, v. 7, p. 31-55, 1984
- NISWENDER, G. D.; REIMERS, T. J.; DIEKMAN, M. A.; NETT, T. M. Blood flow: a mediator of ovarian function. **Biol. Reprod.**, v. 14, p. 64-81, 1976.
- The corpus luteum and its control. In: Knobil E. Neil J (eds), **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, p. 489-525, 1988.
- NISWENDER, G. D.; NETT, T. M. The corpus luteum and its control. In: Knobil E. Neil J (eds), **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, p. 489-525, 1988.
- NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; McGUIRE, W. J.; BELFIORE, C. J.; WILTBANK, M. C. Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 239-247, 1994.
- NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; McINTUSH, E. W. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiol. Rev.**, v. 80, p. 1-28, 2000.
- O'SHEA, J. D.; CRAN, D. G.; HAY, M. F. Fate of the teca interna following ovulation in the ewe. **Cell. Tissue. Res.**, p. 210-305.

PALL, M.; MIKUNI, M.; MITSUBE, K.; BRÄNNSTRÖM, M. Time-Dependent Ovulation Inhibition of a Selective Progesterone-Receptor Antagonist (Org 31710) and Effects on Ovulatory Mediators in the In Vitro Perfused Rat Ovary. **Biol. Reprod.**, v. 63, p.1642-1647, 2000.

PETERS, K.E.; BERGFELD, E.G.; CUPP, A.S.; KOJIMA, F.N.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M.E.; GOTJAN, H.E.; HAMERNIK, D.L.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. **Biol. Reprod.**, vol. 51, p.1248-1254, 1994.

PHARRISS, B. B.; WYNGARDEN, L. J. The effect of prostaglandin on the progesterone content of ovaries from pseudopregnant rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 130, p. 92-94, 1969.

PIPER, P. J.; VANE, J. R.; WYLLE, J. H. Inactivation of prostaglandin by the lungs. **Nat.**, v. 225, p. 600-604, 1970.

RAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal.**, 4 ed., Ed. Manole, São Paulo, 1982.

RAW, R. E.; SILVIA, W. J.; CURRY, T. E.; Effects of progesterone and estradiol on prostaglandin endoperoxide synthase in ovine endometrial tissue. **Anim. Reprod. Scien.**, v. 40, p. 17-30, 1995.

RICO, L. W.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; WOLFENSON, D.; TERQUI, M. Plasma PGFM responses to estradiol injection in pregnant and cyclic cows, **J. Anim. Scien.**, v. 53, p. 363, 1981.

ROTHCHILD, I. The Corpus Luteum Revisited: Are the Paradoxical Effects of RU 486 a Clue to How Progesterone Stimulates your Own Secretion. **Biol. Reprod.**, v. 55, p. 1-4, 1996.

RUEDA, B. R.; HENDRY, I. R.; HENDRY, III W. J.; STROMSHAK, F.; SLAYDEN, O. D.; DAVIS, J. S. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonist promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 269-276, 2000.

SHAHAM-ALBALANCY, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; ROSEMBERG, M.; WOLFENSON, D. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF secretion in the subsequent oestrous cycle. **Reprod.**, v. 122, p. 643-648, 2001.

- SIANANGAMA, P. C.; RAJAMAHENDRAM, R. Effect of human chorionic-gonadotropin administered at specific time following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. **Theriogen.**, v. 38, p. 85-96, 1992.
- SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; McCracken, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON, Jr. L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F_{2α} during luteolysis in ruminants. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 655-663, 1991.
- SKARZYNSKI D. J.; BOGACKI M.; KOTWICA J. 1999. Involvement of ovarian steroids in basal and oxytocin-stimulated prostaglandin (PG) F_{2α} secretion by the bovine endometrium *in vitro*. **Theriogen.**, v. 52, p. 385-397, 1999
- SKARZYNSKI D. J.; MYAMOTO, Y.; OKUDA, K. Production of prostaglandin F_{2α} by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor α: cell typespecificity and intracellular mechanisms. **Biol. Reprod.**, 62, p. 1116-1120, 2000.
- SKINNER, D.C.; FRANS, N. P.; DELALEU, B.; GOODMAN, R.L.; BOUCHARD, P.; CARATY, A. The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v95, n 18, p. 10978-10983, 1998.
- SKINNER, D.C.; BOUCHARD, P.; CARATY, A. The progesterone blockade of the luteinizing hormone surge is overcome by RU486. **J. Neuroendocrinol.**, v.11, n 8, p. 637-641, 1999.
- SOLIMAN, K.F.A.; WALKER, C.A. Dexamethasone suppression of ovulation in PMS-treated immature rats. **Experientia.**, vol. 33, p. 400-401., 1977.
- THATCHER, W. W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C. R.; AMBROSE, J. D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogen.**, 47, p. 131-140, 1997.
- THATCHER, W. W.; TERQUI, M.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effects of estradiol-17β on peripheral plasma concentration of 15-keto-13, 14-dihydro PGF_{2α} and luteolysis in cyclic cattle. **Prostag.**, v. 31, n 4, p 745-756, 1986.
- TSAI, S-J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F_{2α} induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: A potential positive feedback loop during luteolysis. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1016-1022, 1997.

VALLET, J. L.; BAZER, F. W.; FLISS, F. V.; THATCHER, W. W. Effect of ovine conceptus secretory proteins and purified ovine trophoblast protein-1 on interoestrous interval and plasma concentration of prostaglandins $F_{2\alpha}$ and E and of 13,14-dihydro-15-ketoprostaglandin $F_{2\alpha}$ in cyclic ewes. **J. Reprod. Fert.**, v. 84, p. 493-504, 1988.

Xiao, C.W.; Liu, J. M.; Sirois, J.; Goff, A. K. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon-tau in bovine endometrial cells. **Endocrin.**, v139, n.5, p. 2293-2299, 1998.

ZHANG, J.; WESTON, P G.; HIXON, J. E.; Role of progesterone and estradiol on the secretion of oxytocin and prostaglandin $F_{2\alpha}$ during luteolysis in the ewe. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 395-403, 1991.

023127