NATHIA NATHALY RIGOGGIO

**Caracterização ultra-estrutural das células luteínicas bovinas derivadas de
tratamento com eCG**

São Paulo

2011

NATHIA NATHALY RIGOGGIO

**Caracterização ultra-estrutural das células luteínicas bovinas derivadas de
tratamento com eCG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo

2011

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2496
FMVZ

Rigoglio, Nathia Nathaly

Caracterização ultra-estrutural das células luteínicas bovinas derivadas de
tratamento com eCG / Nathia Nathaly Rigoglio. -- 2011.
110 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Bovinos. 2. Corpo lúteo. 3. eCG. 4. Ultra-estrutura. 5. Morfometria. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização ultra-estrutural das células luteínicas bovinas derivadas de modelo de superovulação com ECG", utilizando 21 (vinte e um) bovinos, protocolado sob o nº1637/2009, sob a responsabilidade da Profa Dra Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/04/09.

We certify that the Research "Ultrastructural characterization of bovine luteal cells derived from a model of superovulation with eCG", utilizing 21 (twenty one) bovine, protocol number 1637/2009, under the responsibility Profa Dra Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/22/09.

São Paulo, 23 de abril de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RIGOGLIO, Nathia Nathaly

Título: **Caracterização ultra-estrutural das células luteínicas bovinas derivadas de tratamento com eCG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“Nenhuma grande vitória é possível sem que tenha sido precedida de pequenas vitórias sobre nós mesmos.”

L. M. Leonov

Aos meus pais **Enrico Giuseppe Rigoglio e Idalina Gomes de Abreu Rigoglio**, por me apoiarem nas minhas decisões;

Ao meu irmão **Eduardo Giuseppe Rigoglio** que me mostrou este possível caminho a ser seguido;

A **Marcelo Gomes da Silva** que com paciência compreendeu meus momentos de ausência;

Às minhas amigas **Denise Machida, Marcela Betetti Boldorini e Vandreza Boldorini** por me acompanharem ansiosas por esta última etapa do meu trabalho.

Obrigada por tudo..... Amo todos vocês!!!!!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof.^a Dr^a **Paula de Carvalho Papa**, que diante de algumas portas fechadas, me abriu uma imensa janela para um mundo que eu desconhecia. Sou grata pela oportunidade de ter descoberto uma pequena parte do universo tão grande que é a ciência.

AGRADECIMENTOS

À Professora **Maria Angélica Miglino**, pela oportunidade de ter ingressado neste programa de Pós-Graduação.

Aos Professores **Pedro Primo Bombonato, José Roberto Kfoury Júnior, Francisco Javier Hernandez Blazquez, Ii Sei Watanabe e Antonio Augusto Coppi**, pela disponibilidade de seus laboratórios para realização dos experimentos, bem como pela participação em atividades didáticas relacionadas ao Programa de Pós-Graduação.

Aos colegas de laboratório **Luciana Alves de Fátima, Valdir Pavanelo Junior, Renata dos Santos Silva, Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa, Carolina Campos Dias, Vanessa Uemura da Fonseca, Lais Gontijo, Giuliano Lesnau e Jaqueline Yaeko**, que de alguma forma me auxiliaram ao longo da realização deste trabalho e pelo companheirismo.

Aos ex-colegas de laboratório **Alex Sander Dias Machado, Marcello Machado, Joana Mona e Pinto e Carlos Eduardo Bezerra de Moura** que foram essenciais na etapa inicial de todo este trabalho.

Ao Professor **Francisco Palma Rennó** por disponibilizar o espaço e colaborar no tratamento dos animais.

Ao Professor **Pietro S. Baruselli**, e seus orientados **Henderson e Lindsay U. Gimenes** pela disponibilidade, e por auxiliarem no tratamento e exames dos animais.

À **Rose Eli Grassi Rici, Diogo Nader Palermo, Ronaldo Agostinho da Silva e Edinaldo Ribas Farias** (Índio) pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos secretários do setor de Anatomia **Jaqueline Martins Santana e Maicon Barbosa da Silva**, que sempre nos atendem com simpatia e nos auxiliam.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial, **Marina Pandolphi Brolio, André Luis Rezende Francioli, Márcio Rodrigues, Ana Carolina Mançanares, Phelipe Favaron e Marcos Vinícius Mendes Silva** com os quais compartilhei bons momentos durante este período.

À **Bernadete Ribeiro da Silva** (Tia Bernar) pela agradável companhia nas horas vagas.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, ao me proporcionar um crescimento profissional e pessoal, bem como científico.

À **CAPES** pelo apoio financeiro ao desenvolvimento científico deste trabalho.

RESUMO

RIGOGGIO, N. N. **Caracterização ultra-estrutural das células luteínicas bovinas derivadas de tratamento com eCG.** [Ultrastructural characterization of bovine luteal cells derived from ECG treatment]. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Biotécnicas aplicadas à reprodução animal são empregadas com o intuito de melhorar qualitativa e quantitativamente os rebanhos. A superovulação assim como a estimulação do folículo dominante utilizando-se doses suprafisiológicas de eCG (gonadotrofina coriônica eqüina) são empregadas em bovinos e bubalinos, mas nem sempre alcançam os resultados esperados. Entretanto, foram relatadas alterações morfofuncionais em corpos lúteos (CL) de animais submetidos a estes tratamentos, o que implica, necessariamente, em levantamento de hipóteses relativas ao(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) as gonadotrofinas exógenas alteram as funções celulares nos folículos e corpos lúteos resultantes. Com o intuito de melhor compreensão do papel exercido pelo eCG sobre a célula luteínica bovina, 16 vacas foram sincronizadas e submetidas (grupos tratados) ou não (grupo controle) ao tratamento com eCG. O tratamento foi realizado previamente (superovulação) ou posteriormente (estimulação do folículo dominante) ao desvio folicular. No dia 6 após a ovulação, estes animais foram abatidos e os CL coletados para realização de análises histológicas e ultra-estruturais, assim como o sangue coletado para dosagem de progesterona. Para comparação dos dados obtidos entre os diferentes grupos utilizou-se o programa GraphPrism e as médias foram consideradas diferentes quando $p < 0.05$. Em relação à densidade de mitocôndrias e densidade numérica das mitocôndrias elipsóides não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Quando se calculou o volume total das mitocôndrias no CL bovino, houve diferença significativa do grupo superovulado em relação aos outros grupos. Já para as mitocôndrias esferóides observou-se diferença significativa do grupo estimulado comparado aos grupos controle e superovulado. À imunofluorescência os animais do grupo superovulado apresentaram visualmente uma marcação mais fluorescente intensa para mitocôndrias quando comparados aos grupos controle e estimulado; e o grupo estimulado apresentou uma marcação mais intensa em relação ao grupo controle. Houve diferença significativa entre os três

grupos em relação à quantidade das células luteínicas grandes. Quando se corrigiu o número de células luteínicas grandes pelo volume do CL, os mesmos resultados foram encontrados. Quanto às medidas do maior diâmetro das células luteínicas grandes houve uma diferença significativa quando comparado o grupo estimulado com os demais. Aspectos qualitativos da microvascularização do CL em animais controle e superovulados revelam vascularização mais abundante no grupo tratado. Estes dados apontam para modificações morfológicas da célula luteínica e do CL bovino direcionadas à maior produção hormonal após tratamento com eCG e indicam que doses diferentes aplicadas em momentos diferentes do ciclo estral levam à respostas diversas da célula luteínica e do próprio CL.

Palavras-chave: Bovinos, Corpo Lúteo, ECG, Ultraestrutura, Morfometria.

ABSTRACT

RIGOGGIO, N. N. **Ultrastructural characterization of bovine luteal cells derived from ECG treatment.** [Caracterização ultra-estrutural das células luteínicas bovinas derivadas de tratamento com eCG] 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Biotechnologies applied to animal reproduction are employed in order to improve livestock quality and quantity. Superovulation and the stimulation of the dominant follicle using supraphysiological doses of eCG (equine chorionic gonadotropin) are used in cattle and buffaloes, but not always achieve the expected results. However, morphofunctional changes in corpora lutea (CL) derived from animals submitted to these treatments were reported, which necessarily implies a survey of hypotheses regarding the mechanism(s) by which exogenous gonadotrophins result in altered cellular functions in the follicles and corpora lutea. In order to better understand the role played by eCG on bovine luteal cells, 16 cows were synchronized and submitted (treated groups) or not (control group) to treatment with eCG. The treatment was performed previously (superovulation) or after (stimulation of the dominant follicle) follicular deviation. At 6 days after ovulation, animals were slaughtered and the CL collected for histological and ultrastructural analysis, as well as blood for determining plasmaprogestosterone. For statistical analysis the program Graph Prism was used and mean considered significant different when $p < 0.05$. In relation to mitochondria number and volume density there were no differences among the studied groups. Values of mitochondria total volume in CL were different if stimulated was compared to the other groups. Immunofluorescence for mitochondria showed a more intensive signal for animals from the superovulated group, followed by animals belonging to the stimulated group. The number of large luteal cells was different among all groups. Even though this number was corrected by CL volume, the same results were found. The biggest diameter of large luteal cells was compared among the groups and stimulated group showed higher values. Qualitative aspects of CL microvascularization in control and superovulated animals reveal more abundant vascularization in treated group. These data point towards morphological modification of bovine CL and luteal cell directed to increased hormonal production after eCG treatment. Moreover, results indicate that different eCG dosages applied in

different time points of estrous cycle lead to different responses from CL and luteal cells.

Keywords: Cattle, Corpus Luteum, ECG, Ultrastructure, Morphometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo de sistema teste para a estimativa da densidade volumétrica das mitocôndrias (Eletromicrografia em aumento de X3600).....	45
Figura 2 –	Modelo de sistema teste para a estimativa do número de mitocôndrias por unidade de área (Eletromicrografia em aumento de X11000).....	46
Figura 3 –	Metodologia utilizada para fazer a medição dos maiores diâmetros das células luteínicas bovinas grandes e pequenas (Fotomicrografia com aumento X40).....	48
Figura 4 -	Eletromicrografia evidenciando uma célula luteínica grande (LLC) e uma célula luteínica pequena (SLC) (x3600). A LLC caracteriza-se por apresentar em um formato poliédrico, o núcleo arredondado e central ao seu citoplasma abundante. A SLC caracteriza-se por apresentar um formato alongado e irregular, e seu núcleo possui um formato oval com traçado irregular e contém um ou dois nucléolos. As SLCs, geralmente são interpostas entre um capilar e uma LLC.....	53
Figura 5 –	Eletromicrografia de uma SLC (X11000). O citoplasma dessas células contém retículo endoplasmático liso (setas)	54
Figura 6 –	Eletromicrografia de SLCs (X22000). Presença de mitocôndrias de tamanho variável, com formato predominantemente redondo (A), mas também foram visualizadas mitocôndrias ovais ou alongadas.. Um ou mais complexos de Golgi pequenos associados com numerosas vesículas pequenas revestidas estavam presentes (B, seta larga). Presença de grânulos secretórios (B, setas finas).....	55
Figura 7 –	Eletromicrografia de uma LLC. Um dos componentes que diferenciam as LLCs das SLCs, é a presença de pilhas de cisternas achatadas típicas do retículo endoplasmático rugoso (seta).....	57
Figura 8 –	Eletromicrografia de uma LLC (X11000). As LLCs apresentam, aparentemente, mitocôndrias mais numerosas, mais regulares em tamanho e, geralmente, menores; e com uma matriz mais densa (setas), quando comparadas às SLCs	58
Figura 9 –	Representação onde ocorre a ATP sintase na membrana mitocondrial interna (modificado de Invitrogen®).....	62

Figura 10 – Micrografias de Imunofluorescência (x40). O controle negativo esta sendo representado pela micrografia A, o grupo controle pela B, o grupo estimulado pela C, e o grupo superovulado pela D. Visualmente, podemos notar que o grupo superovulado apresenta uma marcação fluorescente mais evidente quando comparado aos grupos controle e estimulado. E o grupo estimulado apresenta uma marcação fluorescente um pouco mais evidente quando comparado ao grupo controle63

Figura 11 – Eletromicrografia da Microvascularização do CL bovino do grupo controle (A e B), e do grupo superovulado (C e D). À medida que a artéria se aproxima da superfície lútea, ela se divide em dois ou mais vasos maiores que se ramificam sobre a superfície do corpo lúteo, produzindo uma coroa de vasos circunferenciais ao redor da superfície do corpo lúteo (B – seta lilás). Em vários pontos sobre a superfície dessas artérias são emitidos ramos menores orientados radialmente para o tecido luteínico (B – seta cheia rosa). E posteriormente, ela se divide em ramos menores que entram no tecido luteínico (D – seta cheia verde) 70

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Estimativa da fração volumétrica das mitocôndrias no CL bovino, através do uso de sistemas testes. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de quatro animais por grupo e oito campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)..... 59
- Gráfico 2 – Estimativa do volume total das mitocôndrias no CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de quatro animais por grupo e oito campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) 60
- Gráfico 3 – Estimativa da densidade numérica das mitocôndrias elipsóides no CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de quatro animais por grupo e oito campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).....61
- Gráfico 4 – Estimativa da densidade numérica das mitocôndrias esferóides no CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de quatro animais por grupo e oito campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).....61
- Gráfico 5 - Quantidade de Células Luteínicas Grandes no CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de três animais por grupo e dez campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) 64
- Gráfico 6 - Relação da quantidade de células luteínicas grandes com o volume do corpo lúteo bovino de cada grupo experimental. Barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três animais por grupo e dez campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) 65
- Gráfico 7 – Medidas dos diâmetros maiores das Células Luteínicas Grandes do CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão da contagem de duzentas células pro animal e três animais por grupo. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) 66

Gráfico 8 - Média dos maiores diâmetros multiplicada pela quantidade de células luteínicas grandes. Barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três animais por grupo. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) 67

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF – Fator de Crescimento Fibroblástico b

cAMP – Adenosina 3',5' - monofosfatase cíclica

CL – Corpo Lúteo

eCG – Gonadotrofina Coriônica eqüina

FGFs – Fatores de Crescimento Fibroblásticos

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GH – Hormônio do Crescimento

hCG – Gonadotrofina Coriônica humana

HGF – Fator de Crescimento semelhante à Heparina

IGF1 – Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1

LH – Hormônio Luteinizante

LLCs – Células Luteínicas Grandes

LLCs α – Células Luteínicas Grandes α

LLCs β – Células Luteínicas Grandes β

P4 – Progesterona

PG – Prostaglandina

PGC – Células Germinativas Primordiais Bipotenciais

PGE2 – Prostaglandina E2

PGF2 α – Prostaglandina F2 α

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso

SER – Retículo Endoplasmático Liso

SLCs – Células Luteínicas Pequenas

SLCs α – Células Luteínicas Pequenas α

SLCs β – Células Luteínicas Pequenas β

VEGF – Fator de Crescimento Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVO.....	26
3	REVISÃO DE LITERATURA	28
3.1	CICLO OVARIANO	28
3.2	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO ESTIMULATÓRIO SOBRE A CAPACIDADE DE SÍNTESE DE PROGESTERONA.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	GRUPOS DE TRATAMENTOS	41
4.2	MICROSCOPIAS ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	43
4.3	ESTEREOLOGIA APÓS MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	44
4.4	MICROSCOPIA DE LUZ.....	47
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4.6	IMUNOFLORESCÊNCIA.....	49
4.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	50
5	RESULTADOS	52
5.1	CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS BOVINAS.....	52
5.2	DENSIDADE DE ORGANELAS CELULARES ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM CONJUNTO COM A ESTEREOLOGIA	59
5.3	IMUNOFLORESCÊNCIA.....	62

5.4	QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS GRANDES NOS DIFERENTES GRUPOS ANIMAIS.....	63
5.5	RELAÇÃO DA QUANTIDADE DE CÉLULAS LUTEÍNICAS GRANDES COM O VOLUME DO CORPO LÚTEO	64
5.6	MEDIDAS DO DIÂMETRO DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS GRANDES COMPARANDO OS DIFERENTES GRUPOS ANIMAIS.....	65
5.7	MÉDIA DOS MAIORES DIÂMETROS MULTIPLICADA PELA QUANTIDADE DE CÉLULAS LUTEÍNICAS GRANDES	66
5.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	67
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	82

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O gado da raça *Bos indicus* têm contribuído de modo significativo para as indústrias de carne e laticínios em países tropicais no mundo (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003). Dados relativos ao desempenho reprodutivo, tais como a taxa de parição, de sobrevivência de bezerros e a taxa de desmame destes, apontam para a necessidade de multiplicar a genética de fêmeas valiosas. Para esta finalidade têm-se utilizado a transferência de embriões, cuja intenção é, justamente, aumentar o número de descendentes obtidos de doadoras com alto valor genético. No entanto, o maior problema relacionado a esta técnica é a variabilidade nas respostas superovulatórias após os tratamentos com gonadotrofina (BARUSELLI *et al*, 2006) que desempenham um importante papel no controle das atividades de gametogênese e endócrinas das gônadas. Elas pertencem à família dos hormônios glicoprotéicos e compreendem o LH e o FSH hipofisários, bem como as gonadotrofinas coriônicas humana (hCG) e equina (eCG), as quais atualmente são bastante utilizadas na medicina humana e veterinária para mimetizar os mecanismos endócrinos que regulam os ciclos reprodutivos (HERVÉ *et al*, 2004).

Nos últimos 10 anos foram desenvolvidos métodos mecânicos (ablação do folículo) (BERGFEL *et al*, 1997) ou farmacológicos (GnRH) (KOHRAM *et al*, 1998) LH, hCG ou estradiol mais progesterona (P4) (BÓ *et al.*, 1993; BÓ, 1995) de controle da emergência da onda folicular. O tratamento com GnRH resulta na ovulação do folículo dominante e a emergência de uma nova onda folicular 1 ou 2 dias mais tarde (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). Em animais *Bos indicus* o tratamento eletivo para a indução da emergência da onda folicular é a associação entre o estradiol e a progesterona. A eficácia desta associação tem sido demonstrada em muitos estudos com animais *Bos taurus* (BÓ; PIERSON; MAPLETOFT, 1991; BÓ *et al*, 1994; MARTINEZ *et al.*, 2000). Na tentativa de melhorar a sincronização do estro e aumentar o número de receptoras apropriadas para receber os embriões produzidos *in vitro*, com base em protocolos foram desenvolvidos o uso exógeno de P4, eCG e benzoato de estradiol e estes têm sido utilizados com grande sucesso em programas de transferência de embriões (SIQUEIRA *et al.*, 2009).

O corpo lúteo sofre uma extensa proliferação e diferenciação celular durante a luteinização e involui rapidamente na luteólise (AL-ZI'ABI; WATSON; FRASER, 2003). As gonadotrofinas e os hormônios do crescimento derivados da hipófise estão envolvidos na regulação primária da maturação folicular e na função do CL. O corpo lúteo (CL) é uma glândula reprodutiva transitória que produz progesterona (P4), necessária para o estabelecimento e a manutenção da prenhez (SCHAMS e BERISHA, 2004). Para que essas mudanças ocorram há o envolvimento de um intenso crescimento e regressão de microvasos (REYNOLDS *et al*, 1992; ZHENG; REDMER; REYNOLDS, 1993; PLENDL, 2001). A angiogênese é definida como a produção de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos já existentes em um processo que envolve a migração e a proliferação de células endoteliais dos vasos pré-existentes. Esta raramente ocorre no indivíduo adulto a não ser em exceções como o sistema reprodutivo feminino, na cicatrização de feridas e câncer (REYNOLDS e REDMER, 1998). Este processo é essencial para a função luteínica normal, e a inibição deste processo está associada à regressão luteínica funcional (FRASER; LUNN, 2000), além de ser essencial para a entrega de substratos para as células esteroideogênicas dentro do ovário através da via sanguínea, e também permite que a progesterona (P4) seja liberada (PHILLIPS *et al*, 1990; YAN *et al*, 1993; GRASELLI *et al*, 2002). O VEGF é o fator mais importante para a regulação da angiogênese normal e anormal (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997), além de ser um agente mitogênico específico para células endoteliais (FERRARA apud NISWENDER *et al*, 2000), e provavelmente, é o primeiro regulador da proliferação das células endoteliais luteínicas no início do ciclo (BEHRMAN apud NISWENDER *et al*, 2000), e um estimulador da permeabilidade vascular (CONNOLLY, 1991; SENGGER *et al.*, 1993).

Em bovinos, as concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol são mais elevadas durante a superovulação com eCG do que com FSH que possui preparações com baixa bioatividade do LH (ARMSTRONG *et al.*, 1983; DRIANCOURT e FRY, 1992; BEN JEBARA; CARRIÈRE; PRICE, 1994). Nestes animais, a biossíntese de esteróides está sob o controle do LH nas células luteínicas (NISWENDER e NETT, 1994), e do LH e do FSH nas células foliculares (GORE-LANGTON e ARMSTRONG, 1994). O primeiro passo que ocorre na esteroideogênese estimulada pelas gonadotrofinas é a transferência do colesterol do

exterior para o interior da membrana mitocondrial, onde este será convertido em pregnenolona pelo citocromo P₄₅₀ (P450_{scc}) através da clivagem da cadeia lateral do colesterol (revisado por MILLER, 1988; NISWENDER e NETT, 1994; NISWENDER et al., 1994). Este transporte pode ser mediado por vários fatores (revisado por HALL e ALMAHBODI, 1992; JEFCOATE *et al.*, 1992), dos quais a proteína esteroidogênica reguladora aguda (StAR) parece ser o passo limitante para a esteroidogênese (HARTUNG *et al.*, 1995; STOCCO e CLARK, 1996; STOCCO, 1997). A pregnenolona é convertida em progesterona pela 3 β -hidroxisteróide desidrogenase (3 β -HSD) no CL e nos folículos (revisado por LABRIE *et al.*, 1992), ou em andrógenos, e posteriormente, em estradiol nos folículos (FORTUNE, 1986; MILLER, 1988).

Um aumento significativo das concentrações de progesterona plasmática em bovinos submetidos a tratamento com eCG logo após o momento do desvio folicular também foi relatado (BARUSELLI *et al.*, 2004), o que nos leva a hipotetizar (1) que a estimulação ou superovulação folicular seja capaz de influenciar a maquinaria das células luteínicas envolvida na síntese da P4, já que um aumento acentuado nas funções metabólicas podem estar caracterizado pelo aumento na atividade das enzimas mitocondriais (DOODY *et al.*, 1990; RICHARDS e ALMOND, 1994) para atender as necessidades para a produção de esteróides.

OBJETIVO

2 OBJETIVOS

Para testar a hipótese de que a estimulação do folículo dominante ou a superovulação influencie a síntese de progesterona, por via direta ou indireta, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

1. Caracterizar ultra-estruturalmente as células luteínicas bovinas através da microscopia eletrônica de transmissão;
2. Avaliar a densidade de mitocôndrias através da microscopia eletrônica de transmissão em conjunto com a esterologia;
3. Quantificar as células luteínicas grandes nos diferentes grupos de animais e compará-los;
4. Medir o diâmetro das células luteínicas grandes comparando os diferentes grupos de animais;
5. Descrever a microvasculatura do corpo lúteo bovino sob a influência do eCG, através da microscopia eletrônica de varredura.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão de literatura são abordados temas referentes ao ciclo ovariano e morfologia do corpo lúteo bovino, bem como a influência dos tratamentos superovulatório e estimulatório sobre as células luteínicas bovinas.

3.1 CICLO OVARIANO

O desenvolvimento ovariano tem início no embrião onde estão presentes células germinativas primordiais bipotenciais (PGC), dentro de uma gônada indiferente de genótipo XX que se transforma em oogônia e que dará origem aos oócitos (DRUMOND, 1995). Quando a gônada feminina já está formada, ela possui duas funções principais: uma é a produção de células germinativas ou oócitos, e a outra, é a de produzir hormônios importantes para o desenvolvimento das características sexuais secundárias.

Nos ovários dos mamíferos, por serem tecidos em constante remodelamento, ocorrem mudanças cíclicas da maturação folicular, ovulação, formação do corpo lúteo, e na ausência de prenhez, a involução desse corpo lúteo. Esses processos estão relacionados com o controle endócrino, principalmente, pelas gonadotrofinas pituitárias, como o hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH); estes induzem numerosas interações extra e intracelulares. Em geral, o FSH promove o crescimento dos folículos que subsequente produzirão estrógenos, enquanto o LH induzirá o desenvolvimento do corpo lúteo com subsequente produção de progesterona (NISWENDER *et al.*, 2000; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007).

Mudanças na conformação das células da granulosa é um sinal das transformações dentro do folículo primário; seu aspecto cuboidal não é um pré-requisito para que as células da granulosa entrem em seu ciclo celular, mas ao se tornarem cuboidais a entrada neste ciclo ocorre mais freqüentemente. O início do crescimento folicular está caracterizado pelos seguintes eventos: proliferação das células da granulosa, mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cuboidal, ampliação do oócito, e formação da zona pelúcida. Nos

folículos com mais de 18 células, o estágio está completo quando ocorre a transformação das células em cuboidais, e nesse momento, essas células passam a expressar mRNA e proteína da folistatina (BRAW-TAL *et al.*, 1994). Isso sugere que o crescimento do oócito acompanha as mudanças nas células da granulosa.

Alguns estudos ultra-estruturais do oócito bovino revelaram que as mudanças na sua morfologia como, por exemplo, o aparecimento e a localização das mitocôndrias e o aumento dos números de polirribossomos, aparecem primeiramente no folículo primário (FAIR *et al.*, 1997a). Neste estágio, o oócito já está circundado por um anel completo de células da granulosa de formato cuboidal. Tanto nos folículos primordiais quanto nos primários, os oócitos têm sido relatados como inativos transcricionalmente, entretanto, em contraste, as células da granulosa dos mesmos folículos, são consideradas como ativas transcricionalmente (FAIR *et al.*, 1997b); da mesma maneira a síntese de RNA nos oócitos dos folículos primordiais de ratos foi relatada como baixa enquanto que nos folículos primários já ocorre um aumento considerável (MAORI *et al.*, 1974).

As mudanças moleculares podem propiciar a mensuração dos eventos morfológicos que caracterizam a ativação folicular (EPIFANO e DEAN, 2002). Podemos obter uma distinção entre os folículos quiescentes e os recentemente ativados, através do uso de marcadores, como anticorpos específicos para células da teca e da granulosa (O'SHEA; RODGERS; DOCCHIO, 1989), onde as células da teca expressam receptores para LH, enquanto as células da granulosa expressam receptores para FSH (CALDER *et al.*, 2001), combinados com os dados morfométricos e morfológicos, como por exemplo, o tamanho dos folículos (CALDER *et al.*, 2001), e a quantidade de microvasos presentes no folículo, onde o folículo pré-ovulatório apresenta uma maior quantidade de microvasos (ZELEZNIK apud BERISHA *et al.*, 2000).

Antes da ovulação, esse folículo está organizado em camadas distintas, ou seja, as células da granulosa e o oócito estão separados das demais camadas foliculares pela membrana basal, e acima desta tem-se a teca interna e a teca externa (MILVAE; HINCLKEY; CARLSON, 1996). As células da granulosa e da teca interna são capazes de sintetizar e secretar hormônios esteróides, no entanto, as

células da teca externa não são esteroideogênicas. A presença de um folículo pré-ovulatório no ovário determina altas concentrações plasmáticas de estradiol, condição determinante para a ocorrência de um pico pré-ovulatório de LH e da ovulação. Nos folículos ovarianos em crescimento e nos folículos aptos à ovulação, a síntese de estradiol resulta em um trabalho coordenado entre as células da teca e da granulosa. Na parede do folículo as células da granulosa representam a principal fonte de fator angiogênico em resposta à estimulação de FSH, e o VEGF secretado tende a se acumular no antrum do folículo, onde atinge níveis elevados. Esta estocagem e a sua difusão criam um gradiente angiogênico que provavelmente regula o desenvolvimento da rede dos vasos sanguíneos e sua arquitetura dentro do folículo (MATTIOLI *et al.*, 2001). Originalmente, o VEGF foi isolado com base na sua capacidade de estimular, especificamente, células endoteliais microvasculares a proliferarem (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997; STACKER e ACHEN, 1999; CONNOLLY, 1991; SENGHER *et al.*, 1993). O mRNA do VEGF foi detectado pela primeira vez nas camadas das células da teca e da granulosa dos folículos secundários tardios (WULFF *et al.*, 2001). Um aumento na expressão do mRNA do VEGF é observado no interior das células da granulosa dos folículos na fase terciária, enquanto que nos folículos atresícos, a expressão do VEGF está reduzida nas células da granulosa, e não é muito detectável nas células da teca (WULFF *et al.*, 2001). As células da granulosa darão origem às células luteínicas grandes e as células da teca interna, às células luteínicas pequenas (ALILA e HANSEL, 1984).

A ovulação se caracteriza pela ruptura da membrana folicular e a expulsão do oócito. Após a ocorrência de tal evento fisiológico, as células remanescentes da teca e da granulosa do folículo ovulatório, que até então sintetizavam estradiol, serão reorganizadas para formar o CL e para sintetizar progesterona. Para que essa mudança de especialidade ocorra, há a diminuição na expressão da enzima P₄₅₀ aromatase, que converte a androstenediona em estradiol (VOSS e FORTUNE, 1993), e isto determina o início da luteinização das células da teca e da granulosa. Para que ocorra a formação do CL, também, são necessários que ocorram o colapso da parede do folículo ovulado e a invasão da cavidade pela linfa e pelo sangue, provenientes dos capilares presentes em grande quantidade no folículo ovulatório. Esse conjunto de componentes promove a formação de uma estrutura denominada de corpo hemorrágico, e este se reorganiza para formar o CL sob a

influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos, como o fator de crescimento fibroblástico básico bFGF, fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1; SUH; HUNT; SPENCER, 1992), o fator de crescimento semelhante à heparina (HGF; GRAZUL-BILSKA *et al.*, 1992), e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (REDMER e REYNOLDS, 1996), entre outros. No desenvolvimento do CL, a rápida proliferação celular resulta de sucessivas mitoses, que ocorrem com uma velocidade semelhante à de um tecido tumoral (JABLONKA-SHARIFF *et al.*, 1993). Este crescimento extremamente rápido é visto na maioria das espécies animais. As organelas, substratos e enzimas contidas nas células luteínicas determinarão sua capacidade em sintetizar progesterona. Entretanto, para que a progesterona seja sintetizada em grande quantidade, além da diferenciação celular, deverá ocorrer um aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em progesterona e as proteínas transportadoras de colesterol devem migrar para o interior da membrana mitocondrial.

A diferenciação das células da granulosa em células luteínicas grandes está associada a um aumento acentuado nas funções metabólicas que são caracterizadas por aumento da atividade enzimas mitocondriais (DOODY *et al.*, 1990;. RICHARDS e ALMOND, 1994) para atender as necessidades de energia para a produção de esteróides. O aumento na expressão de enzimas, necessário para a síntese de progesterona a partir de colesterol, está ligada à quantidade crescente de espécies de mRNA codificação de enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol e para a expressão do “novel” de enzimas mitocondriais (DOODY *et al.*, 1990). A diferenciação é também acompanhada pela expressão de receptores envolvidos na captação de lipídios (FUNKENSTEIN; WATERMAN; SIMPSON, 1984). Eles fornecem substratos para a síntese de esteróides nas células da granulosa e nas células luteinizantes, bem como a energia necessária para a síntese de esteróides a partir da β -oxidação dos ácidos graxos (FUNKENSTEIN; WATERMAN; SIMPSON, 1984; AMSTERDAM e ROTMENSCH, 1987).

Os capilares de vascularização estão presentes na teca interna e externa, porém estão ausentes na camada de células da granulosa, uma vez que a

membrana basal atua como uma barreira para a vascularização. O LH causa a quebra da parede folicular e libera o oócito na ovulação. Após a ovulação ocorre a diferenciação das células foliculares residuais, bem como os microvasos da camada das células da teca crescem para a camada das células da granulosa e, então, ocorre uma intensa angiogênese (VAN BLERKOM e MOTTA, 1978). As células da teca interna que estão associadas a capilares atravessam a membrana basal, que se degradou, e invadem a camada da granulosa e do tecido folicular remanescente, o que leva ao desenvolvimento do CL e início da produção de progesterona em altas concentrações (NISWENDER *et al.*, 2000).

Na formação do CL ocorre segundo Davis e Rueda (2002), crescimento e reorganização celular, diferenciação do tecido folicular, e luteinização das células da teca e da granulosa remanescentes do folículo ovulatório; bem como migração de células endoteliais, fibroblastos (CHANNING, 1969), e constituintes do sistema imunológico, como por exemplo, os leucócitos (PATE, 1994). Alguns estudos, em diferentes espécies animais, indicam que as células imunes têm um papel importante na atividade cíclica ovariana (BUKOVSKY e PRESI, 1979; MURDOCH; STEADMEN; BEIDEN, 1988; BRANNSTROM e NORMAN, 1993). As similaridades observadas entre a inflamação e a ovulação, tais como as mudanças vasculares e o influxo de vários leucócitos, incluindo os macrófagos, fizeram com que houvesse uma investigação inicial da possibilidade do sistema imune ter um papel no controle da função ovariana (BUKOVSKY e PRESI, 1979; ESPEY, 1980). O CL funcional por ser uma estrutura muito vascular, apresenta leucócitos circulantes em seu tecido durante toda a sua vida útil. Em algumas espécies animais, há a presença de diferentes populações de células inflamatórias, tais como mastócitos (JONES e HSUEH, 1981; MORI, 1990), macrófagos (PAAVOLA, 1979; BRANNSTROM e NORMAN, 1993), linfócitos (BRANNSTROM e NORMAN, 1993) e granulócitos (PEPPERELL; WOLCOTT; BEHRMAN, 1992; BRANNSTROM; MAYHOFER; ROBERTSON, 1993).

O corpo lúteo bovino, assim como o de outras espécies, possui células luteínicas de dois tamanhos. O tamanho das células é tido como base, e assim, pelo menos dois tipos diferentes de células esteroidogênicas são identificados e são

referidas como pequenas e grandes células luteínicas nos suínos, nos ovinos e nos coelhos (WEBER *et al.*, 1987). Esses tipos celulares diferem entre si morfológica e bioquimicamente (FITZ *et al.*, 1982; GLASS; FITZ; NISWENDER, 1985; HOYER e NISWENDER, 1985). Outros três tipos de células não esteroidogênicas foram identificadas no corpo lúteo ovino: os fibroblastos, as células capilares endoteliais, e os pericitos (O'SHEA; CRAN; MAY, 1979; O'SHEA; CRAN; MAY, 1980; RODGERS; O'SHEA; BRUCE, 1984). Tanto as pequenas quanto as grandes células luteínicas se encontram estreitamente associadas às células não esteroidogênicas (FARIN *et al.*, 1986).

Evidências histológicas sugerem que a origem folicular das pequenas células luteínicas (SLCs) é a teca interna, e as grandes células luteínicas (LLCs) se originam das células da granulosa (WEBER *et al.*, 1987). Análises morfométricas de fatias de tecido intacto mostraram que o número de células luteínicas grandes no corpo lúteo de ovinos foi consistente com o número de células da granulosa nos grandes folículos pré-ovulatórios. Evidências diretas que apóiam a hipótese do desenvolvimento das células da teca e da granulosa em pequenas e grandes células luteínicas, respectivamente, foi também apresentada por Alila e Hansel (1984).

Além das diferenças morfológicas e antigênicas entre as pequenas e grandes células luteínicas, foi relatada a diversidade bioquímica. Resultados de estudos *in vitro* mostram que as células luteínicas pequenas são responsáveis pelo aumento da secreção de progesterona (P4) quando estimulado pelo hormônio luteinizante (LH), enquanto que as células grandes contribuem com os níveis basais altos de P4 na vaca (URSELEY e LEYMARIE, 1979; KOOS e HANSEL, 1981), na porca (LEMON e LOIR, 1977; LEMON e MAULEON, 1982), na ovelha (O'SHEA; CRAN; MAY, 1980; FITZ *et al.*, 1982; RODGERS e O'SHEA, 1982; RODGERS; O'SHEA; FINDLAY, 1983), e na coelha (HOYER; KEYES; NISWENDER, 1986). A abundância dos receptores de LH nas células luteínicas pequenas e seu menor número nas células luteínicas grandes contam para a secreção diferencial de P4 estimulada pelo LH desses dois tipos celulares. Há indícios de que a produção de P4 pelas células luteínicas grandes é independente de eventos associados com o aumento de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfatase cíclica) (RODGERS; O'SHEA; FINDLAY, 1983; HOYER; FITZ; NISWENDER, 1984; HOYER e NISWENDER, 1985). As células

luteínicas grandes podem ter um papel na regressão ou manutenção luteínica, pois a maioria das prostaglandinas $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) e seus receptores encontram-se nas células grandes (FITZ *et al.*, 1982).

As SLCs se caracterizam por medirem menos que $20\mu m$, liberarem baixas concentrações de progesterona e serem responsivas ao LH. As LLCs medem de 20 a $50\mu m$, produzem altas quantidades de progesterona ($P4$) e não são responsivas a estimulação com LH (FITZ *et al.*, 1982). Existem evidências de que algumas células luteínicas pequenas são transformadas em células luteínicas grandes em CL maduros (ALILA e HANSEL, 1984). Em relação às LLCs, morfologicamente têm sido evidenciadas duas populações distintas dessas células: as $LLC\alpha$, que contêm retículo endoplasmático liso (SER) típico de células esteroidogênicas e as $LLC\beta$, que são abundantes em SER tubular dilatado. As $LLC\beta$ compreendem cerca de 66% do total de LLCs entre os dias 6 e 12 do ciclo estral, e apresentam maior capacidade de síntese de progesterona. Recentemente, as SLCs também foram diferenciadas nos tipos $SLC\alpha$ e $SLC\beta$. Estas observações preliminares levantam questões, como por exemplo, 1) se as células α se convertem para células β , ou senão, se as LLCs são decorrentes das SLCs; 2) e se as SLCs passam a formar as $LLC\alpha$, e se as $SLC\beta$ se tornam as $LLC\beta$ (FIELDS e FIELDS, 1996).

As grandes e as pequenas células luteínicas bovinas interagem para regular a produção de progesterona durante os estágios luteínicos intermediários do ciclo estral, sendo esta interação modificada por componentes endógenos, como por exemplo, respostas diferentes para os ativadores de proteína quinase ativadas por cálcio dependente de fosfolípidos (ALILA *et al.*, 1988), e a mobilização do cálcio após a estimulação com LH (ALILA; CORRAADINO; HANSEL, 1989) que estão presentes no CL; este sinergismo entre as células é ausente durante os estágios finais do CL, ou seja, no momento da luteólise (DEL VECCHIO *et al.*, 1995).

Acredita-se que as junções GAP permitam a comunicação contatodependente dentro das populações de células SLCs, e entre as SLCs e as LLCs, mas esta comunicação não foi identificada entre as LLCs (REDMER *et al.*, 1991). Em células luteínicas bovinas e ovinas Grazul-Bilska *et al.* (1996) demonstraram que a comunicação intercelular pelas junções GAP são afetadas por agentes

luteotrópicos e luteolíticos (GRAZUL-BILSKA *et al.*, 1994; REDMER *et al.*, 1991). Alguns dos mecanismos que parecem controlar a luteinização incluem rotas sinalizadoras intracelulares, fatores de adesão célula-célula, colesteróis, oxisteróis intracelulares e, talvez, a própria progesterona com a função de regulação parácrina e/ou autócrina (MURPHY, 2000).

Em resposta aos sinais angiogênicos que ocorrem durante o processo pré-ovulatório, o endotélio ovariano maduro mantém sua capacidade de crescimento rápido, pois a formação de novos vasos sanguíneos é essencial para a formação e a função do CL. Farin apud Niswender (2000) menciona que os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), hormônio do crescimento (GH), LH e o VEGF, provavelmente são reguladores primários da proliferação de fibroblastos, das células luteínicas pequenas e das células endoteliais. A proliferação das células endoteliais é um requisito para a neovascularização durante o desenvolvimento luteínico que resulta em uma extensiva rede de capilares sanguíneos (REDMER e REYNOLDS, 1996). De um modo análogo, esses eventos também ocorrem no CL em resposta aos sinais extracelulares. Embora o CL seja um tecido transitório, ele é um dos mais vascularizados do organismo (BRUCE e MOOR, 1976) tendo um percentual de células endoteliais maior que 50% em relação ao total de células (O'SHEA; RODGERS; DOCCHIO, 1989; REYNOLDS, 2002). Essa proliferação celular endotelial e suas mudanças vasculares já foram estudadas durante toda a fase luteínica do CL de ratos (TAMURA e GREENWALD, 1987), suínos (RICKE; REDMER; REYNOLDS, 1999), ovelha (JABLONKA-SHARIFF *et al.*, 1993; REDMER *et al.*, 2001), bovinos (ZHENG *et al.*, 1994; AUGUSTIN *et al.*, 1995; PLENDL, 2000; AMSELBRUGER; SCHAFER; SINOWATZ, 1999); eqüinos (AL-ZI'ABI; FRASER; WATSON, 2002), e humanos (RODGER *et al.*, 1997).

A produção de progesterona vai preparar o endométrio para a implantação e a manutenção da gestação inicial. A cada ciclo estral, as células esteroidogênicas luteínicas sintetizam e liberam P4 na circulação sistêmica, com o objetivo de iniciar um novo processo de quiescência na contratilidade do miométrio e propiciar o desenvolvimento glandular do mesmo. Isto proporciona um meio uterino adequado para que se desenvolvam um ou mais conceitos (embrião e membranas extra-embrionárias), de acordo com a espécie. Quando não ocorre a fertilização ou

quando o conceito é incapaz de sinalizar sua existência no útero, há a falência funcional e estrutural do CL, o que chamamos de luteólise. Na maioria das fêmeas domésticas, a luteólise, indica o término do ciclo estral, dando início a um novo ciclo estral (WILTBANK, 1994; MILVAE, 2000) e, conseqüentemente, uma nova possibilidade de acasalamento e concepção. Na cadela, a luteólise determina o início de uma fase de anestro, que dura em média 125 dias. Em primatas humanos e não humanos, a luteólise tem início no meio do ciclo menstrual.

3.2 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO E ESTIMULATÓRIO SOBRE A CAPACIDADE DE SÍNTESE DE PROGESTERONA

Resultados de nosso grupo sugerem que o tratamento superovulatório é capaz de aumentar a densidade vascular do CL, o que pode ser o reflexo do aumento da capacidade de síntese protéica, sugerido por Artoni et al. (2004) que demonstram características morfológicas relacionadas a uma maior atividade de síntese protéica como o aumento da quantidade de retículo endoplasmático rugoso, especialmente desenvolvido nas células que participam ativamente dessa síntese (BAUMANN e WALZ, 2001). Em células como as do ácino pancreático, e células do plasma, que são células secretórias, uma grande parte do citoplasma é preenchida com RER e vesículas de secreção (LODISH *et al.*, 2008). As mitocôndrias estão relacionadas com a síntese de aminoácidos e de esteróides (DE ROBERTS; HIB; PONZIO, 2003).

O colesterol é o precursor para a esteroidogênese em todos os tecidos secretores de hormônios esteróides. Hoje em dia aceita-se que nos tecidos esteroidogênicos, o colesterol que pode ser derivado a partir da dieta ou ser sintetizado de novo, é transportado para os ovários através de lipoproteínas circulantes, o que pode fornecer a principal fonte de substrato para a síntese de esteróides (GRUMMER e CARROLL, 1988), além destas estimularem a síntese de progesterona em cultura de células luteínicas (PATE e CONDON, 1982; WILTBANK *et al.*, 1990; CARROLL; GRUMMER; CLAYTON, 1992). As células luteínicas bovinas *in vitro* podem utilizar tanto lipoproteína de baixa densidade (LDL), bem como a lipoproteína de alta densidade (HDL), como fonte de colesterol para um aumento na produção de progesterona (PATE e CONDON, 1982; O'SHAUGHNESSY e

WATHES, 1985). O colesterol, que é transportado pelo sangue, parece ser fisiologicamente importante para a função luteínica na vaca, uma vez que elevação dos valores dos níveis séricos de colesterol resultam em um aumento nas concentrações de progesterona durante a fase luteínica (TALAVERA *et al*, 1985).

Dentre outros hormônios esteróides, a P4 é o regulador fisiológico mais importante envolvido no ciclo de vida do CL e na implantação do blastocisto. O primeiro passo da esteroidogênese ocorre na mitocôndria. O transporte do colesterol para a mitocôndria é o passo limitante para a síntese de P4. A principal proteína que é responsável pelo transporte do colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria é a proteína reguladora da esteroidogênese aguda (StAR). Ela é sintetizada como um precursor da proteína 37 kDa e processada em uma proteína de 30 kDa depois de atravessar a membrana mitocondrial (STOCCO e CLARK, 1996). A interação da StAR com a membrana mitocondrial externa resulta em uma mudança conformacional da proteína e cria StAR's cholesterol binding pocket (MILLER, 2007). A membrana mitocondrial interna está ligada ao citocromo P450_{scc}, que é o primeiro componente do complexo enzimático que cliva a cadeia lateral do colesterol para formar a pregnenolona. Depois disso, a pregnenolona é convertida em P4 pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase/isomerase (3 β -HSD), associado ao retículo endoplasmático liso (NISWENDER, 2002)

A P4 medeia seu efeito através de um receptor intracelular, o receptor de P4 (P4-R), e a interação entre P4 e o P4-R nos tecidos-alvo provoca vários efeitos fisiológicos. O número de receptores para LH por células é aumentado pelo tratamento com P4 utilizando-se cultura de células luteínicas bovinas (O'SHEA; RODGERS; DOCCHIO, 1989). As células luteínicas grandes que foram luteinizadas a partir das células da granulosa são as principais fontes de P4 no CL bovino, mas as células luteínicas pequenas que foram luteinizadas a partir das células da teca produzem P4 em resposta ao LH com uma alta sensibilidade (NISWENDER *et al*, 2000). O LH é tido como o regulador mais importante da esteroidogênese luteínica, embora este processo também seja regulado por vários outros fatores luteotrópicos (REKAWIECKI *et al*, 2008). O mecanismo de ação do LH induz o estímulo de múltiplas vias de transdução de sinais (LEUNG e STEELE, 1992). Os receptores de membrana para LH estão localizados, principalmente, nas células luteínicas

pequenas. A ligação do LH ao seu receptor, conduz à ativação da proteína quinase A (PKA) dependente da cAMP (REKAWIECKI *et al.*, 2008). A cAMP é induzida pela ativação da adenilato ciclase, e é considerada o segundo mensageiro primário da ação do LH (WILLIAMS *et al.*, 1978; GARVERICK *et al.*, 1985; SKARZYNSKI; MLYNARCZUK; KOTWICA, 2003).

Em trabalhos realizados por Hazzard *et al.* (1999), foi observado um aumento de 6 vezes na concentração da proteína VEGF após administração de hCG em células da granulosa de ratos, entretanto não ocorreu mudanças na expressão do mRNA, sugerindo que as gonadotrofinas promovem uma regulação pos-transcricional na produção de VEGF. Existem vários dados que sugerem que o LH e o hCG modulam a expressão do VEGF e ambos FSH e LH/hCG, via ativação de seus receptores, são capazes de induzir a expressão do mRNA do VEGF em células da granulosa (CHRISTENSON e STOUFFER, 1997; LEE *et al.*, 1997; MAYBIN e DUNCAN, 2004; PIETROWSKI e KECK, 2004).

Em primatas e ratos com ovários hiperestimulados ocorre uma elevação dos níveis de VEGF, predominantemente após uma onda de hormônio luteinizante (MAC CLAURE *et al.*, 1994; SHWEIKI *et al.*, 1993). A expressão do mRNA do bFGF e de seus receptores em células da granulosa e da teca de suínos é aumentada após administração de eCG (SHIMIZU *et al.*, 2002). Por outro lado Phan *et al.* (2006) mostraram que o hCG parece não influenciar a expressão do mRNA do bFGF em células da granulosa luteinizadas de humanos, mas a expressão desse fator apresenta uma leve tendência a ser diminuída após o tratamento com hCG. Segundo Artini *et al.* (1998), as concentrações plasmáticas de VEGF e o número de oócitos coletados são diretamente proporcionais, e a administração de gonadotrofinas pode ser feita para estimular a produção de VEGF e promover o desenvolvimento de um alto número de oócitos. Em humanos, a concentração de VEGF no fluido folicular é maior que as concentrações plasmáticas depois da administração de FSH. Além disso, a administração de baixas doses de hCG também aumenta a produção de VEGF pelas células da granulosa em primatas não humanos (CHRISTENSON e STOUFFER, 1997).

Além da sua atividade angiogênica, o bFGF estimula a secreção de P4 na fase inicial do CL bovino *in vitro* (MIYAMOTO *et al.*, 1992). Além disso, o bFGF aumenta a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas células luteínicas bovinas na fase luteínica inicial (SCHAMS; LIEBERMANN; MIYAMOTO, 1995). Juntos esses fatores angiogênicos de crescimento parecem regular tanto as estruturas (angiogênese) quanto a função (secreção) do desenvolvimento do CL *in vivo*. Isto levanta a possibilidade de que uma interação entre os fatores de crescimento angiogênicos, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a progesterona possuem um papel essencial no desenvolvimento do CL. Um estudo mostrou que fatores de crescimento angiogênicos como o VEGF e o bFGF, estimulam a secreção da angiotensina II (Ang II), da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e da P4 na fase inicial do CL bovino *in vitro* (KOBAYASHI *et al.*, 2001). A Ang II é um peptídeo vasoativo, que é convertido de Ang I pela enzima conversora de angiotensina (ACE), regula a maturação de oócitos (KUO *et al.*, 1991), a ovulação (KUO *et al.*, 1991) e esteroidogênese (YOSHIMURA *et al.*, 1993). Mostrou-se recentemente, que a Ang II que foi convertido em Ang I pelas células endoteliais microvasculares do CL bovino, e que essas células têm receptores Ang II (HAYASHI *et al.*, 2000). Além disso, Ang II tem um efeito inibitório sobre liberação de progesterona no CL bovino na fase intermediária, e este efeito inibitório é potencializado pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ (HAYASHI e MIYAMOTO, 1999). Vários estudos têm relatado que outros peptídeos como ocitocina luteínica (OT) e endotelina-1 (ET-1) influenciam a secreção de progesterona no CL bovino *in vitro* (MIYAMOTO e SCHAMS, 1991, GIRSH *et al.* 1996a, SAKUMOTO *et al.*, 1996; MIYAMOTO *et al.*, 1997). A OT aumenta a secreção de progesterona do CL bovino em toda a fase lútea e este efeito estimulante é maior na fase inicial do CL (MIYAMOTO e SCHAMS, 1991).

Diante do exposto, acreditamos que experimentos delineados visando uma melhor compreensão dos mecanismos celulares ativados e/ou inibidos pelo tratamento superovulatório podem contribuir para aumentar a eficiência de tal tratamento em espécies nas quais os resultados obtidos ainda não são satisfatórios. Além disso, acreditamos que o aumento da produção de progesterona observado tanto no modelo de superovulação (doses altas de eCG) quanto de estimulação da ovulação (dose baixa de eCG) podem levar a melhoras dos protocolos de tratamento de infertilidade, inclusive da espécie humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Pirassununga – SP, durante o período de maio a agosto de 2009. Foram utilizadas 21 vacas mestiças da raça Nelore com idade entre 2 e 5 anos, mantidas a pasto e receberam suplementação de concentrado. Anteriormente ao período experimental, os animais foram avaliados quanto à condição de escore corporal em escala de 1 a 5 (WILDMAN et al., 1982) e da condição ovariana, por palpação retal, conforme Madureira et al., (2004), sendo selecionadas aquelas que apresentaram escore de condição entre 2,0 e 3,0.

4.1 GRUPOS DE TRATAMENTO

Nesse experimento, as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos (G1, controle, n = 4; G2, superovulado, n = 4 e G3, estimulado, n = 4). Os protocolos de sincronização, estimulação e superovulação utilizados nesse trabalho constam no anexo A. Resumidamente, todos os animais receberam um implante vaginal contendo 1g de progesterona (Dispositivo Intravaginal Bovino – DIB; Progesterona 1g; Primer[®]; Buenos Aires, Argentina) e uma injeção intramuscular de 2mg de benzoato de estradiol (Estrogin[®]; Syntex[®]; Buenos Aires, Argentina) no dia 0. No dia 8, foram retirados os implantes intravaginais e administrado 0,150mg de prostaglandina F2 α (PGF_{2 α} , Prolise[®]; Arsa, Buenos Aires, Argentina) nas fêmeas dos grupos controle e estimulado. As vacas do grupo controle não receberam eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina, Novormon[®] Syntex; Buenos Aires, Argentina), enquanto as do grupo estimulado receberam 400 UI. Após 48 horas da retirada do dispositivo de progesterona, esses animais receberam 0,025mg de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH; Gestran Plus[®], Arsa, Buenos Aires, Argentina). Nas fêmeas do grupo superovulado, foram administrados 2000 UI de eCG no dia 4 e 0,150mg de PGF2 α no dia 6. No dia 7, foram retirados os implantes intravaginais e administrada PGF2 α e, 12 horas após a retirada do dispositivo, foram administrados 0,025mg de GnRH.

Grupo 1 – Controle (n = 4)

Grupo 2 – Superovulados (n = 4)

Grupo 3 – Estimulados (n = 4)

Anexo A – Representação esquemática dos tratamentos para sincronização, estimulação e superestimulação da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona associado ou não ao eCG em vacas. 1 – Benzoato de estradiol[®] - Syntex; 2 - BID[®] - Syntex; D = dia; M = manhã; T = tarde.

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO:

Os CL foram cortados em 4 fragmentos da periferia e 4 fragmentos do centro, com 3 mm³ cada; estes fragmentos foram fixados em solução de Karnovsky modificada, contendo 2,5% de glutaraldeído (Merck) e 2% de paraformaldeído (F1021-01 BL, Labsynth produtos para laboratório Ltda) em solução tampão de fosfato de sódio a 0,1 M (pH 7,3), por um período de 24 horas em temperatura ambiente (Watanabe e Yamada, 1978). Em seguida, os tecidos foram lavados três vezes em solução tampão fosfato de sódio a 0,1M (pH 7,3) por 15 minutos cada. Posteriormente foi realizada a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (Cat. 19100, Osmium Tetroxyde, Electron Microscopy Sciences) tamponado a 2% por 2 horas a 4° C. O material foi lavado três vezes em PBS por 5 minutos cada. Um terceiro fixador, o acetato de uranila a 0,5%, overnight, foi utilizado. No segundo dia, a desidratação foi feita em série crescente de alcoóis (álcool 70% ao absoluto), por 15 minutos cada. Em seguida, o material foi embebido por óxido de propileno (Cat. 20401, Propylene Oxyde, Electron Microscopy Sciences), por duas vezes de 15 minutos cada e iniciado o processo de infiltração, onde se misturou a resina spurr[®] (Cat. 14300, Low Viscosity Embedding Kit, Electron Microscopy Sciences) com óxido de propileno em uma proporção de 1:1, e então, o material foi colocado em um misturador rotatório por um período de 4 horas. Após esse período, trocou-se essa mistura pela resina spurr[®] pura, e o material foi deixado no misturador rotatório por 18 horas, com a tampa aberta.

No terceiro dia ocorreu a continuação da infiltração, onde se trocou a resina do dia anterior por uma nova resina pura, e este material permaneceu na estufa a 37°C por uma hora, e os tubos ficaram com a tampa aberta. A inclusão final do material foi feita com resina pura, e o material ficou a 60°C por um período de 72 horas.

Os blocos foram cortados em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, através do uso de facas de vidro para confecção de cortes semi-finos, de aproximadamente 0,5 µm, montados em lâminas de vidro e corados com solução de azul de toluidina a 0,5%, para estudo em microscopia de luz. Cortes ultrafinos, de 90 nm (nanômetros)

de espessura, foram feitos em ultramicrotomos Leica Ultracut UCT com facas de diamante e coletados em telas de cobre (Cat. G200-Cu, Electron Microscopy Sciences), de 200 “mesh”. O contraste foi feito com o uso de acetato de uranila (Watson, 1958; Watanabe e Yamada, 1983 apud Watanabe e Ogawa, 2007) ou citrato de chumbo (Reynolds, 1963; Watanabe e Yamada, 1984 apud Watanabe I. e Ogawa K.,2007). A observação foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Morgagni 268 (FEI Company), através do programa Mega View - Soft Imaging System.

4.3 ESTEREOLOGIA APÓS MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A estereologia é um método utilizado para interpretar um arranjo estrutural tridimensional interno, tendo sua base de análise em cortes da estrutura que apresentam uma informação bidimensional. Para realização desta técnica utilizou-se o material processado para a microscopia eletrônica de transmissão, onde se seguiu o protocolo referido anteriormente.

O processo de amostragem teve início com uma seleção randômica de 2 blocos de cada animal. Um corte único de cada bloco forneceu 24 micrografias, que foram selecionadas sistematicamente. Foram necessários 3 diferentes aumentos para mostrar os componentes do corpo lúteo bovino, o total de micrografias por animal foi de 48. 8 micrografias tiveram baixa magnificação (x 3600) para mostrar a célula inteira, 8 micrografias tiveram uma magnificação intermediária (x 11000), e 8 micrografias tiveram alta magnificação (x 22000) com foco na mitocôndria. Estas micrografias correspondem a “tomadas” de quadrículos selecionados aleatoriamente, a partir de secções individuais do corpo lúteo. Testes de pontos randômicos foram atribuídos nas micrografias de baixa magnificação, e foi estimada a densidade volumétrica da mitocôndria (V_{vm}) nas células (Figura 1); a estimativa do número de mitocôndrias por unidade de área (N_m) foi obtida utilizando-se as micrografias de magnificação intermediária (Figura 2) (INUWA, 2005).

Para a análise de densidade volumétrica das mitocôndrias (V_{vm}) nas células utilizou-se o princípio mais eficiente para a microscopia eletrônica de transmissão, quando a medida necessária é meramente uma contagem. Um sistema teste de pontos foi colocado aleatoriamente em uma micrografia eletrônica tirada

aleatoriamente de um corte aleatório do material processado. A informação solicitada foi obtida pela contagem diferencial dos pontos Pm encontrados na organela. Assim a fração de Ppm presentes na transecção seria, uma estimativa do Vvm:

$$V_{vm} = P_{pm};$$

O volume absoluto V(m) de um determinado componente no tecido pode ser calculado a partir do Vv(m) se o volume total do órgão (V) for conhecido:

$$V_m = V_{vm} \times V$$

Figura 1 - Modelo de sistema teste para a estimativa da densidade volumétrica das mitocôndrias (Eletromicrografia em aumento de X3600).

Já a análise da estimativa do número de mitocôndrias por unidade de área (Nam) foi baseada no número de transecções de mitocôndrias contadas na unidade de área do corte aleatório, onde Nam é proporcional a Nvm, mas essa relação depende de vários fatores que devem ser determinados por outros métodos. O mais

importante depende do formato do componente de interesse, além de ser necessário o conhecimento sobre a distribuição do tamanho dos componentes. Há duas relações básicas entre N_{vm} e N_{am} :

$$N_{am} = N_{vm} \times \overline{D_m}$$

$$\overline{D_m} = \text{diâmetro médio "tangente" das estruturas}$$

Segundo o princípio desenvolvido por Weibel e Gomez é necessário ter, somente, o conhecimento do formato das estruturas. E esta informação é colocada na relação entre N_a e N_v , na forma de um coeficiente adimensional, β . Deve-se ter o prévio conhecimento do volume (V_{vm}) ocupado pela mitocôndria no tecido, aplicando-se, então, à fórmula, onde β possui o valor de 1,382, que é apropriado para mitocôndrias esferóides; e 2.25 para as mitocôndrias elipsóides:

$$N_{vm} = \frac{1,05 \times N_{am}^{3/2}}{\beta \overline{V_{vm}}^{1/2}}$$

Figura 2 - Modelo de sistema teste para estimativa do número de mitocôndrias por unidade de área (Eletromicrografia com aumento de X11000).

4.4 MICROSCOPIA DE LUZ

Os animais foram abatidos no dia 6 após a ovulação, os ovários foram coletados, e, em seguida, os CL foram dissecados. Depois de serem fragmentados, estes foram submersos em paraformaldeído 2,5% para que ocorresse a fixação do tecido. Após 24 horas de fixação no paraformaldeído (F 1021-01 BL, Labsynth Produtos para laboratório Ltda) 2,5% os fragmentos foram embebidos em PBS por mais 24 horas. No dia seguinte o material foi submetido a um processo para emblocagem em parafina (Erv Plast Parafina Histológica – EasyPath). Para isso, o material primeiramente foi desidratado em uma série crescente de alcoóis (A 1084.01 BJ, Labsynth Produtos para laboratório Ltda) (do 70% ao absoluto), onde permaneceu por 1 hora em cada série. Depois este material foi embebido, duas vezes por trinta minutos cada, em xilol (Reagentes Analíticos Dinâmica), para que ocorresse a diafanização. Após o processo de diafanização, este material foi colocado em parafina, dentro da estufa, por uma hora; e em seguida, foi colocado em uma nova parafina overnight. No outro dia, o material foi emblocado na parafina, em posição vertical.

Os blocos de parafina contendo o material foram desbastados em micrótomo (Leica RM2125 RT), para depois serem submetidos a cortes que, então, foram corados por hematoxilina-eosina (HE). O protocolo de HE utilizado para a realização da coloração teve início com a desparafinização das lâminas em xilol, duas vezes por 10 minutos cada; em seguida, as lâminas foram submetidas à hidratação do tecido em série decrescente de alcoóis (do absoluto para o 70%) por 3 minutos cada. Logo após, as lâminas foram submersas em água corrente por 3 minutos; e depois, deixada na hematoxilina por 4 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, para que fosse retirado o excesso do corante. Após essa lavagem, as lâminas foram submetidas à coloração com eosina, por 3 minutos e meio. As lâminas receberam um banho rápido com água destilada, para a retirada do excesso de corante; e depois foram banhadas 3 vezes em álcool 95%; e em seguida, estas foram desidratadas em álcool absoluto, duas vezes de 2 minutos cada. E subseqüentemente foram imersas em xilol, duas vezes de 2 minutos cada, e em seguida os cortes histológicos foram sobrepostos por lamínulas utilizando-se permount para que estas se aderissem na lâmina.

As lâminas coradas por HE foram visualizadas e fotografadas por microscopia de luz (Olympus BX 60) em um aumento de 40X para que fossem quantificadas as células luteínicas grandes bem como as medidas do maior diâmetro dessas células, através do programa (AxioVision - AxioCam Câmeras Zeiss). As micrografias foram tomadas a partir dos maiores diâmetros vertical e horizontal, em relação ao corte histológico, tendo, então, um formato de cruz; e de modo que um campo não sobressaísse outro, evitando-se que uma mesma célula fosse contada duas vezes. A fim de se obter a quantidade de células luteínicas grandes, foram selecionadas aleatoriamente 10 micrografias de 3 animais por grupo, assim, para cada grupo foram contadas um total de 30 micrografias. Já para realização das medidas dos maiores diâmetros das células luteínicas grandes, foram feitas as mensurações dos maiores diâmetros de 200 células luteínicas grandes, utilizando-se das mesmas micrografias usadas na quantificação destas células.

Figura 3 – Metodologia utilizada para fazer a medição dos maiores diâmetros das células luteínicas grandes e pequenas (Fotomicrografia com aumento X40).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises de variância (ANOVA paramétrico) foram utilizadas para comparações dentro de um mesmo grupo. A análise estatística foi realizada utilizando-se as médias das amostras dos animais de cada grupo, e foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$, e utilizou-se o programa GraphPrism. Já as amostras independentes foram analisadas pelo teste t-Students. Os gráficos foram construídos a partir da média das amostras de cada grupo, do desvio e/ou erro padrão.

4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

O material fixado e processado de forma rotineira para inclusão histológica em parafina foi seccionado em cortes histológicos de 3 μ m de espessura. No protocolo de imunofluorescência utilizando as lâminas contendo os tecidos parafinizados foram imersas em xilol (Reagentes Analíticos Dinâmica) aquecido a 60°C por 20 minutos, e em seguida, em xilol à temperatura ambiente por mais 20 minutos, para que fossem desparafinizados. Logo depois foram hidratados com etanol 100%, duas vezes de 10 minutos cada. Em seguida, em álcool 90% e 70%, por 10 minutos cada. Na sequência, foram lavados com água destilada por 10 minutos, e em água corrente por mais 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada ao colocar as lâminas sob ação de tampão citrato de sódio (pH6,0) aquecido por 10 minutos. Depois o material foi lavado duas vezes em PBS sob agitação, por 5 minutos cada vez. A permeabilização foi feita com a incubação, por 15 minutos, em PBS contendo 0,2% de Triton X-100 (Triton®, Merck).

Após a permeabilização, foram realizadas três lavagens das lâminas com PBS, por 5 minutos cada. Em seguida, foi feita a incubação deste material com Peroxidase Blocking (Ref. S2001, Dako®) por 30 minutos, para que ocorresse o bloqueio das ligações dos anticorpos não-específicos. O material foi lavado duas vezes em PBS, sob agitação, por 5 minutos cada. Depois houve a incubação com Protein Block (Ref. X0909, Dako®), por 30 minutos. Novamente o material foi lavado com PBS por 5 minutos; e em seguida, incubado com o anticorpo primário (Complex V-OxPhos inhibitor protein, mouse IgG, monoclonal 5E2, A21355, Invitrogen®), overnight, e em câmara úmida.

No dia seguinte, observou-se o material para verificar se o anticorpo primário não havia extravasado ou secado, e então, iniciou-se a segunda etapa da imunofluorescência, onde o material, primeiramente foi lavado uma vez em PBS, por 5 minutos; e em seguida, incubado com o anticorpo secundário que continha o fluoróforo (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, A11029, Invitrogen®), por 2 horas no escuro. Depois, o material foi lavado mais uma vez em PBS, por 5 minutos; e em seguida, foi feita a montagem das lâminas utilizando-se Vectashield (mounting médium for fluorescence with DAPI – H-1200, Vector Laboratories, Inc), e finalmente sendo selada, também no escuro, com esmalte para prevenir a secagem e a movimentação sob o microscópio. As lâminas foram armazenadas no escuro à 4°C. O material foi observado e fotografado ao microscópio (Olympus BX 60), utilizando-se o programa AxioVision (AxioCam HRc – Zeiss).

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A artéria ovariana foi canulada e o tecido lavado com PBS (1,4% de NaCl; 0,28% de Na₂HPO₄; 0,08% de KH₂PO₄, em pH 7,4) (Amselgruber et al, 1999); em seguida injetou-se BLUE Mercocox®, através da cânula. O tecido, então, foi fixado em solução Karnovsky, conforme descrito acima com pH 7,2, por 24 horas. Após esta fixação, os tecidos moles foram removidos com solução de hidróxido de sódio (H2000.01.AH, Labsynth produtos para laboratório Ltda) a 10% com trocas diárias, por 6 dias, e mantidos em estufa em temperatura de 60°C, durante esse período. Após estas passagens, as amostras foram submetidas às lavagens em água corrente, de forma suave, para que os debris teciduais se soltassem dos moldes, por 5 dias consecutivos. As amostras foram montadas em bases metálicas e cobertas com íons de ouro em aparelho Íons EMITECH K550 que utiliza o argônio como meio de distribuição do ouro por todo o molde. As amostras, então, foram examinadas ao microscópio eletrônico de varredura (LEO 435VP) e a documentação das imagens foi obtida através do computador.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS BOVINAS

Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar que as células luteínicas grandes são uniformemente poliédricas, possuem um formato angular e medem cerca de 25-50 μm no seu diâmetro maior. Seus núcleos são centrais, além de possuírem um citoplasma abundante. Já as células luteínicas pequenas são mais angulares ou alongadas e seus contornos são mais difíceis de serem delimitados. Devido a sua forma irregular é difícil de se obter medidas significativas, mas as suas dimensões raramente passam de 15 a 20 μm no seu diâmetro maior, e seus núcleos são menos arredondados (Figura 4).

Células Luteínicas Pequenas:

As células luteínicas pequenas muitas vezes estão interpostas entre capilares e células luteínicas grandes. Os núcleos, geralmente, possuem formato oval, com um traçado irregular, contendo um ou mais nucléolos. Essas células são irregulares em linhas gerais, afinando-se em processos citoplasmáticos que se prorrogam por distâncias consideráveis da região do núcleo. Cada célula possui um único núcleo situado dentro do citoplasma (Figura 4).

O citoplasma dessas células contém uma grande quantidade de retículo endoplasmático, predominantemente do tipo tubular, e estes estão associados com aglomerados dispersos de ribossomos. Assim, embora este retículo endoplasmático seja predominantemente liso, em muitas micrografias havia ribossomos. O REL apresenta voltas concêntricas que dão a impressão de uma “impressão digital” (Figura 5). Um pequeno número de ribossomos livres também estão presentes.

Estas células possuem um número moderado de mitocôndrias de tamanho variável, e com formato predominantemente redondo, mas também foram visualizadas mitocôndrias ovais ou alongadas. Tanto as cristas tubulares como as cristas lamelares estavam presentes. Muitas mitocôndrias continham pequenos

grânulos eletrôn-densos de matriz. Um ou mais complexos de Golgi pequenos associados com numerosas vesículas pequenas revestidas estavam presentes. Havia, também, um pequeno número de grânulos densos de membrana-limitados, espalhados por todo o citoplasma (Figura 6).

Figura 4 - Eletromicrografia evidenciando uma célula luteínica grande (LLC) e uma célula luteínica pequena (SLC) (x3600). A LLC caracteriza-se por apresentar-se em formato poliédrico, o núcleo arredondado, localizado centralmente em seu citoplasma abundante. A SLC caracteriza-se por apresentar-se em formato alongado e irregular; seu núcleo possui um formato oval com traçado irregular e contém um ou dois nucléolos. As SLCs, geralmente estão interpostas entre um capilar e uma LLC.

Figura 5 – Eletromicrografia de uma SLC (X11000). O citoplasma dessas células contém retículo endoplasmático liso e abundância (setas).

Figura 6 – Eletromicrografias de SLCs (X22000). Presença de mitocôndrias de tamanho variável, com formato predominantemente redondo (A), mas também foram visualizadas mitocôndrias ovais ou alongadas. Um ou mais complexos de Golgi pequenos associados com numerosas vesículas pequenas revestidas estavam presentes (B, seta larga). Presença de grânulos secretórios (B, setas finas).

As estruturas das células luteínicas grandes que as difere das pequenas são:

- (a) não visualização de inclusões intranucleares contendo material citoplasmático;
- (b) uma quantidade de ribossomos aparentemente menor no retículo endoplasmático tubular;
- (c) algumas pilhas de cisternas achatadas espalhadas, típicas do retículo endoplasmático rugoso (Figura 7);
- (d) Aparentemente há mais mitocôndrias, com tamanhos regulares e, geralmente, menores (Figura 8);
- (e) cristas mitocondriais aparentemente tubulares e pregueadas;
- (f) matriz mitocondrial densa;
- (g) a formação da lâmina basal na superfície, sem prolongamentos citoplasmáticos, parece ser bem marcada;
- (h) numerosos grânulos densos envoltos pela membrana, algum dos quais são liberados no espaço intercelular. Em relação aos grânulos maiores, grânulos lisosomais, e o número de gotículas lipídicas, as células luteínicas pequenas e grandes não apresentavam diferenças qualitativas.

Figura 7 – Eletromicrografia de uma LLC. Um dos componentes que diferenciam as LLCs das SLCs é a presença de pilhas de cisternas achatadas típicas do retículo endoplasmático rugoso (seta).

Figura 8 – Eletromicrografia de uma LLC (X11000). As LLCs apresentam, aparentemente, mitocôndrias mais numerosas, mais regulares em tamanho e, geralmente, menores; e com uma matriz mais densa (setas), quando comparadas às SLCs

Grânulos secretórios:

Os grânulos secretórios estão ligados à membrana e, devido ao seu teor de proteína incorpora o ósmio durante a fixação, dando-lhes uma aparência negra na microscopia eletrônica (Figura 6B).

5.2 DENSIDADE DE MITOCÔNDRIAS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM CONJUNTO COM A ESTEREOLOGIA

Um sistema teste com 256 pontos, bem como um sistema teste com uma linha sólida (de exclusão) e outra linha tracejada (de aceitação), foram inseridos sobre as micrografias de microscopia eletrônica de transmissão, para que fosse calculada a fração volumétrica das mitocôndrias no CL bovino. Obtivemos, então, proporções médias iguais a 0.10, 0.11 e 0.12 nos grupos controle, estimulado e superovulado, respectivamente. Os dados estatísticos mostraram que não houve uma diferença significativa entre os grupos estudados, onde os valores de P foram: 0.5533, quando comparados os grupos controle e estimulado; 0.6505, entre os grupos estimulado e superovulado, e 0.2076, entre os grupos controle e superovulado. Para os dois últimos resultados houve a correção pelo teste de Welch, cujos valores foram respectivamente, iguais a 0.4555 e 1.274 (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Estimativa da fração volumétrica das mitocôndrias no CL bovino, através do uso de sistemas testes. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de quatro animais por grupo e oito campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Já para o cálculo do volume total das mitocôndrias no CL bovino utilizou-se os valores obtidos na fração volumétrica das mitocôndrias, e estes foram multiplicados pelo volume do CL (larguraXcomprimentoXaltura), medidos anteriormente. Foram obtidas as seguintes médias: $0.91527\mu\text{m}^3$, $1.2174\mu\text{m}^3$ e $1.80457\mu\text{m}^3$, para os grupos controle, estimulado e superovulado, respectivamente. Estatisticamente houve diferença significativa do grupo superovulado em relação aos grupos controle ($P<0,001$) e estimulado ($P<0,01$); porém não houve uma diferença significativa quando comparamos estes dois últimos grupos ($P>0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Estimativa do volume total das mitocôndrias no CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de quatro animais por grupo e oito campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$).

Para calcularmos a densidade numérica das mitocôndrias utilizamos o princípio de Weibel e Gomez (1962), onde 1.05 é o valor de K; e β possui dois valores, 1.382 apropriado para as mitocôndrias esferóides, e 2.25, para as mitocôndrias elipsóides. Realizados os cálculos obteve-se para as mitocôndrias elipsóides as seguintes médias: 99.02 (grupo controle), 67.76 (grupo estimulado) e 44.38 (grupo superovulado). Na análise estatística não houve diferença significativa entre os grupos estudados: ao compararmos os grupos controle e estimulado o valor de P foi igual a 0.5571; entre os grupos estimulado e superovulado, $P=0.0833$; e entre os grupos controle e superovulado, $P=0.9786$ (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Estimativa da densidade numérica das mitocôndrias elipsóides no CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de quatro animais por grupo e oito campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Já para as mitocôndrias esferóides obtivemos médias iguais a 70.46, 110.32 e 72.26 para os grupos controle, estimulado e superovulado, respectivamente. Após as análises estatísticas observou-se diferença significativa do grupo estimulado comparado aos grupos controle ($P=0.0234$) e superovulado ($P=0.7473$), mas não houve diferença significativa entre o grupo controle e o superovulado ($P=0.0833$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Estimativa da densidade numérica das mitocôndrias esferóides no CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de quatro animais por grupo e oito campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5.3 IMUNOFLOURESCÊNCIA

A síntese do ATP a partir da ADP e P_i na mitocôndria é catalisada por uma ATP-sintase (ou complexo V), dirigida pelo processo de transporte de elétrons. Composta por duas unidades funcionais F_0 , que é um canal de prótons transmembrânico; e F_1 , que é composta por várias subunidades ($\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$) e dentre elas, a subunidade β catalisa a reação de síntese de ATP. Através da microscopia fluorescente com uso do anticorpo que inibe a ATP sintase (F_1F_0), que ocorre na membrana mitocondrial interna (Figura 9), observamos que os animais do grupo superovulado apresentaram visualmente uma marcação mais fluorescente quando comparado aos grupos controle e estimulado. Além disso, o grupo estimulado apresentou uma marcação mais intensa em relação ao grupo controle (Figura 10).

Figura 9 – Representação gráfica do local de ocorrência da ATP sintase na membrana mitocondrial interna (modificado de Invitrogen®).

Figura 10 – Micrografias de Imunofluorescência (x40). O controle negativo esta sendo representado pela micrografia A, o grupo controle pela B, o grupo estimulado pela C, e o grupo superovulado pela D. Visualmente, podemos notar que o grupo superovulado apresenta uma marcação fluorescente mais evidente quando comparado aos grupos controle e estimulado. E o grupo estimulado apresenta uma marcação fluorescente um pouco mais evidente quando comparado ao grupo controle.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS GRANDES NOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS

Através de micrografias de microscopia de luz foi possível calcular a quantidade de células luteínicas grandes presente no CL bovino nos diferentes grupos de animais deste experimento. O grupo controle apresentou uma média de 61,07 de células luteínicas grandes por campo, enquanto o grupo dos animais submetidos ao tratamento estimulatório apresentou uma média de 133,3; e o grupo de animais superovulados uma média de 48,5. Assim, por meio de análises estatísticas verificou-se que houve diferença significativa entre os três grupos. Ao compararmos os três grupos de animais notou-se que aqueles submetidos ao tratamento de superovulação apresentaram uma maior quantidade de células luteínicas grandes em relação ao grupo controle ($p=0,0366$) e ao grupo estimulado ($p<0,0001$). Houve

também uma diferença significativa quando comparados o grupo controle ao grupo estimulado ($p<0,0001$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Quantidade de Células Luteínicas Grandes no CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão de três animais por grupo e dez campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$).

5.5 RELAÇÃO DA QUANTIDADE DE CÉLULAS LUTEÍNICAS GRANDES COM O VOLUME DO CORPO LÚTEO

Como nossos dados de quantidade de células luteínicas grandes poderiam estar relacionados ao volume do CL, fizemos o cálculo para corrigir o número de células luteínicas grandes pelo volume, entre os grupos experimentais, e os mesmos resultados foram encontrados, ou seja, estimulado>controle>superovulado. Deste modo, obteve-se uma diferença significativa ($p<0.0001$) entre os três grupos estudados, onde as médias foram: 6.65, 12.40 e 3.07, para o grupo controle, estimulado e superovulado, respectivamente (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Relação da quantidade de células luteínicas grandes com o volume do corpo lúteo bovino de cada grupo experimental. Barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três animais por grupo e dez campos contados por animal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5.6 MEDIDAS DO DIÂMETRO DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS GRANDES COMPARANDO OS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS

Foram mensurados os maiores diâmetros de 200 células luteínicas grandes nos três grupos de animais. Obteve-se, então, uma média de $31,59\mu\text{m}$ de diâmetro para o grupo controle; já para o grupo estimulado observou-se uma média de $29,44\mu\text{m}$, e de $32,32\mu\text{m}$ para o grupo superovulado. Análises estatísticas realizadas através de dados obtidos nas micrografias por microscopia de luz mostraram que houve uma diferença significativa quanto às medidas do maior diâmetro das células luteínicas grandes quando comparados os grupos controle e o estimulado ($p < 0,001$), bem como entre o grupo estimulado e o grupo superovulado ($p < 0,0001$), e uma tendência a ser diferente entre o grupo controle e o superovulado ($P = 0,0647$) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Medidas dos diâmetros maiores das Células Luteínicas Grandes do CL bovino. Barras representam a média $\pm$ erro padrão da contagem de duzentas células pro animal e três animais por grupo. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5.7 MÉDIA DOS MAIORES DIÂMETROS MULTIPLICADA PELA QUANTIDADE DE CÉLULAS LUTEÍNICAS GRANDES

Hipotetizando-se que poderia haver uma compensação do menor número de células nos grupos controle e superovulado por um aumento do diâmetro destas células, multiplicou-se o diâmetro das células luteínicas grandes pelo número das mesmas, e observamos que ainda assim, os animais do grupo estimulado apresentaram valores maiores do que os demais grupos e ainda que o grupo controle apresentou um valor maior do que os animais do grupo superovulado. Assim sendo, o grupo controle apresentou uma média de 1917.65, e os grupos estimulado e superovulado apresentaram uma média de 4108.65 e 1567.95, respectivamente. A análise estatística nos mostrou que houve uma diferença significativa entre os três grupos estudados, onde $p < 0.0001$ entre estes grupos (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Média dos maiores diâmetros multiplicada pela quantidade de células luteínicas grandes. Barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três animais por grupo. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Três ou quatro ramos arteriais ováricos se inserem separadamente no hilo do ovário. Eles seguem de maneira tortuosa, com cursos helicoidais no interior da medula, e posteriormente, se dividem em numerosos ramos menores enrolados em espiral, onde abastecem a região medular, e em ramos maiores, que são ramos com menos convulsões e que passam para o córtex. Estas artérias maiores geralmente correm paralelamente à superfície ovariana, emitindo pequenos ramos que suprem o tecido cortical e, muitas vezes formam anastomoses entre os arcos arteriais intra-ovarianos. A maioria dos ramos arteriais que são fornecidos ao córtex são vasos espiralados e que diminuem gradualmente de diâmetro. A maioria é emitida radialmente das arcadas arteriais descritas, ou são ramos terminais das artérias corticais que não formam arcadas.

Os folículos ovulatórios (de Graaf) e os corpos lúteos geralmente são supridos por ramos simples originários diretamente das artérias corticais. No caso do corpo lúteo, o ramo primeiramente é enrolado. À medida que se aproxima da superfície lútea, divide-se em dois ou mais vasos maiores que se ramificam sobre a superfície do corpo lúteo, produzindo uma coroa de vasos circunferenciais ao redor da superfície do corpo lúteo (Figura 11B). Em vários pontos sobre a superfície dessas

artérias são emitidos ramos menores orientados radialmente para o tecido luteínico (Figura 11B). E posteriormente estes se dividem em ramos menores que adentram o tecido luteínico (Figura 11D).

As veias são menos enroladas do que as artérias correspondentes e se apresentam com menor tendência a formar arcadas anastomóticas. O CL, geralmente, é drenado por uma ou duas veias principais, estas são emitidas a partir de uma veia cortical e que é acompanhado por uma artéria homônima, então, estas veias correm um curso relativamente direto para a medula, onde se fundem com outras veias, formando um canal único, grande e paralelo à superfície hilar do ovário, onde a veia ovárica surge. Dentro do córtex e da medula, as veias tendem a formar anastomoses, mas as formações de arcadas são menos proeminentes do que as artérias correspondentes.

A única fonte arterial para o CL indica que as artérias luteínicas são artérias terminais, e que a sua obstrução levaria à isquemia do CL como um todo. No entanto, as artérias de maior calibre formam extensas anastomoses entre si, e é apenas na porção da artéria com menor calibre que fecha o CL, o que a torna uma artéria terminal. A anastomose é, naturalmente, uma característica da artéria ovárica em si e dos ramos ováricos dentro e fora do ovário. A presença de anastomoses e de vários ramos que suprem o ovário deve assegurar que o ovário, como um todo, esteja bem protegido contra a oclusão de qualquer artéria única.

Figura 11 – Eletromicrografia da Microvascularização do CL bovino do grupo controle (A e B), e do grupo superovulado (C e D). À medida que a artéria se aproxima da superfície lútea, ela se divide em dois ou mais vasos maiores que se ramificam sobre a superfície do corpo lúteo, produzindo uma coroa de vasos circunferenciais ao redor da superfície do corpo lúteo (B – seta lilás). Em vários pontos sobre a superfície dessas artérias são emitidos ramos menores orientados radialmente para o tecido luteínico (B – seta cheia rosa). E posteriormente, ela se divide em ramos menores que entram no tecido luteínico (D – seta cheia verde).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Hoje em dia já está bem estabelecido que a função ovariana seja regulada principalmente pelas gonadotrofinas da hipófise: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), bem como seus receptores (FSHR, LHR). É evidente, também, que os fatores produzidos localmente, tais como hormônios esteróides, peptídeos e fatores de crescimento têm um papel modulador no desenvolvimento folicular (FORTUNE, 1994). O presente estudo avaliou características morfológicas das células luteínicas de animais submetidos a tratamento estimulatório (estímulo do folículo dominante com eCG) ou superovulatório (indução de ovulação múltiplas, também com ECG, porém em maiores doses). Foram verificadas alterações na quantidade de células luteínicas grandes, no tamanho destas células assim como no volume de mitocôndrias e na quantidade das mitocôndrias esferóides entre os diferentes grupos estudados. Não foram encontradas diferenças significativas em relação à quantidade total de mitocôndrias nem à quantidade de mitocôndrias elipsóides.

A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e o hormônio folículo estimulante (FSH) têm sido muito utilizados em tratamentos de superovulação, sendo este último preferido por muitos pesquisadores e profissionais devido a um melhor rendimento do embrião (ELSDEN; NELSON; SEIDEL, 1978;. GOULDING *et al.*, 1991). Apesar da correlação entre as concentrações de P4 e os resultados do tratamento de superovulação serem uma questão controversa (revisado por BRITT e HOLT, 1988), aceita-se que os perfis anormais de P4 são relacionados negativamente com a resposta deste tratamento, com o rendimento e a qualidade do embrião (CALLESEN; GREVE; HYTTEL, 1986, 1988; GREVE *et al.*, 1995). Em estudo realizado por Fátima, comunicação pessoal, em que se utilizaram os mesmos animais deste presente estudo, observou-se que a concentração média de progesterona foi maior nos animais do grupo estimulado, que receberam uma dose de 400UI de eCG, em relação aos animais do grupo superovulado que receberam 2000UI de eCG ($p=0.01$) e ao grupo controle ($p=0,03$), que não receberam eCG. No experimento realizado por Nogueira *et al.* (2003), houve um aumento nas concentrações plasmáticas de P4 nos animais que receberam as doses de eCG de 400 e 600 UI, compatíveis com as utilizadas em nosso estudo.

O aumento do LH pré-ovulatório provoca a formação de CL, induzindo alterações funcionais e morfológicas nas células da teca e granulosa do folículo que ovulará (RAHE *et al.*, 1980). Diferenças na frequência de pulsos do LH se devem ao efeito da progesterona sobre o gerador de pulsos putativo no hipotálamo. Pesquisas em ovelhas indicaram que, na ausência do suporte do LH, o peso luteínico foi reduzido (DENAMUR; MARTINET; SHORT, 1966) e a concentração de progesterona na circulação diminuiu (KALTENBACH *et al.*, 1968; DENAMUR, MARTINET e SHORT, 1966; FULLER e HANSEL, 1970). Os pulsos de LH durante a fase luteínica do ciclo estral em ovelhas, mulheres e macacos induziu um aumento concomitante na secreção de progesterona pelo CL (RAHE *et al.*, 1980, BACKSTROM *et al.*, 1982; FILICORI; BUTLER; CROWLEY, 1984). Sabe-se que a atividade do eCG mimetiza a do FSH e a do LH (LICHT *et al.*, 1979) e que em ruminantes (HERVÉ *et al.*, 2004) a atividade semelhante à do FSH é mais pronunciada do que nos eqüinos. O papel do LH no eCG parece ser responsável pelas modificações descritas acima, o que explica o uso desta gonadotrofina de ação longa nas tentativas de melhorar as taxas de gestação em bovinos; diferentes abordagens têm sido tomadas para aumentar as concentrações de P4, antes ou no momento da inseminação artificial (ROBINSON; LESLIE; WALTON, 1989, WAGNER *et al.*, 1973, NAKAO *et al.*, 1983, BRUEL *et al.*, 1990, LEWIS *et al.*, 1990, SIANANGAMA e RAJAMAHENDRAN, 1992). No estudo realizado por Callesen, Greve, Hyttel (1986), o tratamento de superovulação induziu níveis anormais de LH e os níveis de P4 foram identificados e relacionados com a baixa competência dos oócitos. Corteel *et al.* (1988) relataram que as frequências de estro, ovulação e prenhez foram maiores nas ovelhas com um tratamento combinado de progesterona e eCG do que em ovelhas tratadas apenas com progesterona. Além disso, estudos anteriores relataram um alto nível de sincronização do estro utilizando-se uma combinação de progesterona e eCG em ovelhas (MUTIGA e MUKASA-MUGERWA, 1992) e cabras (ROMANO, 2002). O LH estimula a luteinização das células da granulosa e da teca, que se transformarão em células luteínicas grandes e pequenas, respectivamente. Em nosso estudo foram contadas as células luteínicas grandes, principais produtoras de P4, nos três grupos de animais estudados. O critério para a separação das populações de células do CL

varia de estudo para estudo, o que torna difícil as comparações diretas. Em nosso estudo adotamos um diâmetro para as células luteínicas pequenas $<20\mu\text{m}$, e para as células luteínicas grandes $> 20\mu\text{m}$ até $50\mu\text{m}$; enquanto que Chegini *et al.* (1984) utilizou para as células luteínicas grandes um diâmetro $>18\mu\text{m}$, e Weber *et al.* (1987) usou $23\mu\text{m}$. Já para as células luteínicas pequenas Koss e Hansel (1981) utilizaram $25\mu\text{m}$, e Rodgers *et al.* (1986) $26\mu\text{m}$ como valores para os diâmetros destas células. Estabelecido o diâmetro a ser utilizado para realizar a quantificação observamos que o grupo de animais superovulados (2000 UI de eCG) apresentou uma menor quantidade de células luteínicas grandes quando comparado aos grupos controle (sem eCG, $p=0,0366$) e ao grupo estimulado (400UI de eCG, $p<0,0001$), enquanto que o grupo estimulado apresentou uma maior quantidade em relação ao grupo controle ($p<0,0001$). De acordo com os dados de literatura, este resultado parece ser contraditório, uma vez que maiores quantidades de eCG deveriam gerar maiores quantidades de P4 e, provavelmente também de células produtoras de P4. Adicionalmente então dividimos a quantidade de células luteínicas grandes pelo volume do corpo lúteo e os mesmos resultados foram encontrados: estimulado $>$ controle $>$ superovulado. Estes resultados corroboram os encontrados por Fátima (comunicação pessoal) relativos à concentração plasmática de P4, o que também está de acordo com o descrito por Glass *et al* (1985) ao descreverem que as LLCs possuem mais receptores para LH quando comparadas às SLCs e podem então, responder melhor ao tratamento ao qual foram submetidas.

Por outro lado, o diâmetro das LLCs foi menor ($p<0,001$) no grupo estimulado ($29,44\mu\text{m}$) quando comparado com os grupos controle ($31,59\mu\text{m}$) e superovulado ($32,32\mu\text{m}$). Ao se multiplicar o diâmetro das células luteínicas grandes pelo número das mesmas, hipotetizando-se que poderia haver uma compensação do menor número de células nos grupos controle e superovulado por um aumento do diâmetro destas células, observou-se que ainda assim os animais do grupo estimulado apresentam valores maiores do que os demais grupos e ainda que o grupo controle apresenta valor maior do que os animais do grupo superovulado.

Como o primeiro passo da esteroidogênese ocorre na mitocôndria, foram realizadas análises para verificar se havia diferenças nas densidades numéricas e volumétricas dessa organela no CL bovino dos diferentes grupos estudados neste

trabalho. Observou-se, então, que não houve diferença significativa da quantidade das mitocôndrias por célula entre os grupos estimulado, superovulado e controle. Porém, o grupo superovulado apresentou um maior volume de mitocôndrias quando comparado aos grupos controle ($p < 0.001$) e estimulado ($p < 0,01$), mas não houve diferença significativa entre os dois últimos grupos ($p > 0,05$). Está bem documentado que repetidos tratamentos utilizando gonadotrofinas podem induzir alterações morfológicas no ovário e adicionalmente gerar um estresse oxidativo, que envolve alterações mitocondriais (MIYAMOTO *et al.*, 2010). A dose utilizada para os animais superovulados (2000 UI) foi consideravelmente maior do que a utilizada para os animais estimulados (400 UI), o que pode ter gerado este resultado de aumento volumétrico das mitocôndrias devido ao estresse. Tal hipótese pode ser ainda corroborada por nossos resultados de síntese de progesterona, maior nos animais do grupo estimulado, ou seja, não submetidos a estresse oxidativo.

Quanto à densidade numérica das mitocôndrias foram feitas duas análises: 1) estimativa numérica das mitocôndrias com formato elipsóide e 2) estimativa numérica das mitocôndrias esferóides. Na primeira análise não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Mas na segunda análise houve diferença significativa do grupo estimulado em relação aos grupos controle e superovulado, porém não houve diferença significativa entre os grupos controle e superovulado. A presença de mitocôndrias esféricas densas é um indicativo da sua contribuição para a secreção da progesterona circulante (O'SHEA *et al.*, 1979), o que está de acordo para os animais do presente estudo conforme relatado por Fátima (comunicação pessoal) para os animais do grupo estimulado. Ademais Tuckey e Atinkson (1989) relataram há duas décadas que o tratamento com eCG aumenta a atividade esteroidogênica nas mitocôndrias. Campbell *et al.* (1980) relataram que a mitocôndria do CL sintetiza mais pregnenolona que as mitocôndrias dos folículos, e que as mitocôndrias luteínicas podem converter a pregnenolona em progesterona, enquanto que as mitocôndrias foliculares não realizam este processo (DIMINO, 1977). Na microscopia eletrônica de transmissão Dimino *et al.* (1979), demonstraram que as mitocôndrias foliculares contêm cristas tubulares, enquanto que as luteínicas possuem, principalmente, cristas tubulovesiculares. A luteinização do tecido ovariano é acompanhada pelo aumento da capacidade esteroidogênica das suas mitocôndrias (DINIMO, 1977; DIMINO e BERMAN, 1979), o que pode ser estimulado

pelo tratamento com eCG após o desvio folicular, como demonstrado em nosso estudo. E Campbell *et al.* (1980) sugerem que a habilidade da mitocôndria ovariana para sintetizar ATP para a oxidação do substrato respiratório também aumenta como resultado da luteinização. O oxigênio consumido pelas mitocôndrias é utilizado tanto na fosforilação oxidativa quanto na síntese de pregnenolona (CAMPBELL *et al.*, 1980). O passo limitante na síntese de P4 pelas células luteínicas é a conversão do colesterol em pregnenolona pelo complexo enzimático de clivagem da cadeia lateral do colesterol (citocromo P450_{scc}) que está associado com a membrana mitocondrial interna (KENNY; FARIN; NISWENDER, 1989) além do transporte do colesterol até esta organela. A principal proteína responsável pelo transporte da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna é a StAR (HAWKINS *et al.*, 1995), que também está aumentada apenas nos animais do grupo estimulado (FÁTIMA, comunicação pessoal), o que contribui para a afirmação de que doses estimulatórias de eCG aumentam a capacidade de síntese de progesterona e podem, conseqüentemente aumentar a receptividade do útero para gestar aumentando as taxas de prenhez nos rebanhos (SÁ FILHO *et al.*, 2010).

Nosso estudo também abordou a microvascularização do CL após superovulação com eCG. Os CLs dos animais estimulados não foram estudados por dificuldade de obtenção de um maior número de animais. Os resultados apontaram para aumento da microvascularização do CL nos animais superovulados, em acordo com o observado por Moura (2003) para CL de animais superovulados após aplicação de FSH. Os dados obtidos por Papa *et al.* (2007) e Prado *et al.* (2004) apontam que adicionalmente ao aumento da microvascularização, ocorreu aumento da expressão de fatores de crescimento angiogênicos, o que explica o aumento vascular. A literatura relata que também após a estimulação com eCG, os folículos pequenos (<4mm) apresentaram baixos níveis de VEGF, já os folículos grandes (>5mm) tiveram níveis mais elevados e uniformes, enquanto que apenas uma porção de folículos médios (4-5mm) produziram uma quantidade substancial de VEGF. Isto sugere que os folículos médios sob o estímulo de gonadotrofinas são capazes de iniciar um processo angiogênico que pode criar as condições necessárias para continuar com seu crescimento pré-ovulatório (MATTIOLI, 2001) já que os folículos pré-ovulatórios possuem uma rede capilar maior que os folículos subordinados (SHIMIZU *et al.*, 2002). Tem-se especulado a relação entre a produção

de VEGF e o fornecimento do sangue no ovário, embora a mesma esteja associada com uma maior extensão e permeabilidade dos vasos sanguíneos. Da mesma forma, a relação entre a angiogênese e sua função nas células do folículo também vem sendo estudada. No estudo realizado por Shimizu *et al* (2002) mostrou-se que os folículos pré-ovulatórios possuem uma rede capilar maior que os folículos subordinados. Ademais, foi relatado por Jiang *et al.* e Feranil *et al.* (2003 e 2004) que a angiogênese aumenta durante o crescimento folicular bovino e ocorre de forma desigual em diferentes regiões do interior da teca. O VEGF é capaz ainda de estimular a proliferação das células endoteliais microvasculares (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997; STACKER e ACHEN, 1999; CONNOLLY, 1991; SENGER *et al.*, 1993). O mRNA do VEGF foi detectado, primeiramente, nas camadas das células da teca e da granulosa dos folículos secundários tardios (WULFF *et al.*, 2001). O aumento na sua expressão foi observado no interior das células da granulosa dos folículos na fase terciária, enquanto que sua expressão está reduzida nos folículos atresícos, nas células da granulosa, e não é muito detectável nas células da teca (WULFF *et al.*, 2001). A secreção do VEGF é estimulada pelo LH e IGF-1 (SCHAMS *et al.*, 1999), sugerindo que a principal via de ativação depende da cAMP (KOBAYASHI *et al.*, 2001), via esta que também pode ser ativada pelo eCG (WANG *et al.*, 2007)

Em algumas espécies, como os bovinos, as veias uterinas confluem para a ilíaca interna, enquanto que a veia ovárica esquerda conflui para a veia ilíaca comum, e a veia ovárica direita conflui para a veia cava caudal; e nos suínos, a artéria ovárica fica em aposição à parede da veia uterina cranial (GINTHER, 1974). A área de contato entre a veia e a artéria percorre um caminho tortuoso sobre a superfície da veia. Na confluência da veia uterina cranial com a veia ovárica, a artéria ovárica é enrolada em torno de um ou mais canais venosos colaterais proeminentes, e as “bobinas” da artéria estão enredados por uma rede de vênulas, que se originou a partir dos canais colaterais. A artéria ovárica segue um caminho tortuoso sobre a superfície da veia uterina cranial e encontra-se em estreita colaboração com a parede da veia ao longo do comprimento desta. Na maioria da superfície de contato entre recipientes que contém sangue venoso uterino e a artéria ovárica há um grande aumento de circunvoluções e do caminho tortuoso da artéria

ovárica, bem como o enrolamento da artéria em torno dos canais colaterais venosos e o enrolamento da artéria por vênulas (GINTHER, 1974). Era intenção deste estudo, dissecar os arranjos arterial e venoso no útero após injeção de látex. Acreditava-se que os animais submetidos ao tratamento com eCG pudessem apresentar diferenças quantitativas em relação à vascularização deste órgão, sobretudo na parte em contato mais estreito com o ovário. Como a qualidade do material pós-fixação não permitiu esta descrição, restringimo-nos a discutir que também no útero, em seu terço médio, foram encontradas diferenças quantitativas da microvascularização nos animais submetidos ao tratamento com doses estimulatórias e superovulatórias de eCG (PINTO, 2009), o que nos leva a crer que a região mais cranial do útero também pudesse apresentar tais diferenças e então determinar maior ou menor interação útero-ovariana.

Reynolds (1948) observou que, em coelhos, do ramo arterial para entrar no hilo ovariano como um único vaso perto do polo caudal da gônada, partem ramificações menores para a tuba uterina. As artérias se ramificavam ainda mais, reduzindo gradualmente seu calibre, mas mantendo sua configuração em espiral, com exceção dos vasos que estavam dispostos radialmente na margem cortico-medular e que seguia em direção ao córtex. Nessas áreas, as artérias eram cercadas por uma rede capilar, formada por vasos capilares finos, e suas ramificações terminavam em pequenas arteríolas. Esses vasos supriam o estroma cortical e o plexo capilar. O plexo capilar apresentava um formato arredondado e pertencia aos folículos em desenvolvimento ou aos CLs, suas arteríolas eram retas ou ligeiramente onduladas. Já as vênulas coletoras se apresentaram desenroladas e planas, seu calibre era maior que o das arteríolas, e sua função era a drenagem dos folículos e dos CLs. Estes vasos, juntamente com as vênulas de drenagem do estroma, se tornaram confluentes através do seu curso em direção ao hilo. Os CLs estudados neste trabalho são supridos por ramos simples originários diretamente das artérias corticais, e o seu ramo, primeiramente, é enrolado. À medida que se aproxima da superfície lútea, divide-se em dois ou mais vasos maiores que se ramificam sobre a superfície do CL, produzindo uma coroa de vasos circunferenciais ao redor da superfície deste. Em vários pontos sobre a superfície dessas artérias são emitidos ramos menores orientados radialmente para o tecido luteínico, que posteriormente se dividem em ramos menores e adentram o tecido luteínico. O CL geralmente é

drenado por uma ou duas veias principais, estas são emitidas a partir de uma veia cortical e que é acompanhado por uma artéria homônima, então, estas veias correm um curso relativamente direto para a medula, onde se fundem com outras veias, formando um canal único, grande e paralelo à superfície hilar do ovário, onde a veia ovárica surge. O arranjo observado é o mesmo para os animais submetidos ou não ao tratamento com doses superovulatórias de eCG, o que difere entre eles é a quantidade de vasos.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. A forma das mitocôndrias presentes nos animais submetidos ao tratamento com eCG se modificou de elipsóides para esferóides, o que pode contribuir para o aumento da produção de P4.
2. Doses superovulatórias de eCG (administradas antes do desvio folicular) levam ao aumento do volume total de mitocôndrias no CL contribuindo também para a atividade esteroidogênica das células luteínicas.
3. Doses estimulatórias de eCG (400 UI aplicados após o desvio folicular) levam ao aumento da quantidade de células luteínicas grandes e pode explicar o aumento da P4 observado para este grupo.
4. Doses estimulatórias de eCG foram capazes de induzir diminuição do diâmetro das LCCs, o que não se refletiu na diminuição da produção de P4.
5. Doses superovulatórias de eCG aumentam a densidade vascular do CL e podem contribuir para aumento da capacidade de síntese de P4.

REFERÊNCIAS

Referências Bibliográficas

ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, p. 759–767, 2003.

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

ADASHI, E. Y. Intraovarian peptides. Stimulators and inhibitors of follicular growth and differentiation. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 21, p. 1-17, 1992.

ALILA, H. W.; DOWD, J. P.; CORRADINO, R. A.; HARRIS, W. V.; HANSEL, W. Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 645-655, 1988.

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

ALILA, N. W.; CORRAADINO, R. A.; HANSEL, W. Differential effects of luteinizing hormone on intracellular free Ca²⁺ in small and large bovine luteal cells. **Endocrinology**, v. 124, p. 2314-2320, 1989.

ALLEN, S. E.; FOOTE, R. H. An enzyme-linked immunoassay of milk progesterone as a diagnostic aid in embryo transfer programs. **Theriogenology**, v. 29, p. 893–903, 1988.

AL-ZIABI, M. O.; FRASER, H. M.; WATSON, E. D. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. **Reproduction**, v. 123, p. 67-77, 2002.

AL-ZIABI, M. O.; WATSON, E. D.; FRASER, H. M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction**, v. 125, p. 259-270, 2003.

AMBROSE, J. D.; PIRES, M. F. A.; MOREIRA, F.; DIAZ, T.; BINELLI, M.; THATCHER, W. W. Influence of deslorelin (GnRHagonist) implant on plasma progesterone first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 50, p. 1157–1170, 1998.

AMSELGRUBER, W. M.; SCHÄFER, M.; SINOWATZ, F. Angiogenesis in the bovine corpus luteum: an imunocytochemical and ultrastructural study. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 28, p. 157-166, 1999.

AMSTERDAM, A.; ROTMENSCH, S. Structure–function relationships during granulosa cell differentiation. **Endocrine Reviews**, v. 8, p. 309–337, 1987.

ARMSTRONG, D. T.; PFITZNER, A. P.; WARNES, G. M.; RALPH, M. M.; SEAMARK, R. F. Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 67, p. 395–401, 1983.

ARTINI, P. G.; DE MICHEROUX, A. A.; D'AMBROGIO, G. Growth hormone cotreatment with gonadotropins in ovulation induction. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 11, p. 763-779, 1996.

ARTINI, P. G.; MONTI, M.; FASCIANI, A.; TARTAGLIA, M. L.; D'AMBROGIO, G.; GENAZZANI, A. R. Correlation between the amount of follicle-stimulating hormone administered and plasma and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in women undergoing in vitro fertilization. **Gynecological endocrinology**, v. 12, p. 243-247, 1998.

ARTONI, L. P.; MOURA, C. B.; CAMPOS, D. B.; PEREIRA, F. T. V.; KFOURY JR., J. R.; MIGLINO, M. A.; BARUSELLI, P. S.; PFARRER, C.; LEISER, R.; PAPA, P. C. Ultrastructural features from superovulated corpora lutea of water buffalo. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...**2004 p. 363.

AUGUSTIN, H. G. Ovarian angiogenesis: phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. **American Journal of Pathology**, v. 147, p. 339-351, 1995.

BACKSTROM, C. J.; MCNEILLY, A. S.; LEASK, R. M.; Baird, D. T. Pulsatile secretion of LH, FSH, prolactin, oestradiol and progesterone during the menstrual cycle. **Clinical Endocrinology**, v. 17, p. 29-42, 1982.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; FERRAZE, M. L.; BARNABE, R. C. O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: perspectiva de aplicação comercial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 285-292, 2007.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; PORTO-FILHO, R.; CARVALHO, N. A. T.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, Z. Failure of oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. **Theriogenology**, v. 53, p. 491, 2000. Apresentado: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 25, 2000.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 479-486, 2004.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 77-88, 2006.

BAUER, M.; REIBIGER, I.; SPANEL-BOROWSKI, K. Leucocyte proliferation in the bovine corpus luteum. **Reproduction**, v. 121, p. 297-305, 2001.

BAUMANN, O.; WALZ, B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. **International Review of Cytology**, v. 205, p. 149-214, 2001.

BEN JEBARA, M. K.; CARRIÈRE, P. D. ; PRICE, C. A. Decreased pulsatile LH secretion in heifers superovulated with eCG or FSH. **Theriogenology**, v. 42, p. 685-694, 1994.

BERGFELT, D. R.; BÓ, G. P.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p.1-12, 1997.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast

growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, v. 167, p. 371-382, 2000.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193–204, 1995.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 225–239, 1993.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRÍBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17b treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555–69, 1994.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

BÓ, G. A.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. **Theriogenology**, v. 36, p. 169–83, 1991.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53–72, 2002.

BOVE, S. E.; PETROFF, M. G.; NISHIBORI, M.; PATE, J. L. Macrophage migration inhibitory factor in the bovine corpus luteum: characterization of steady-state messenger ribonucleic acid and immunohistochemical localization. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 879–885, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRANNSTROM, M.; MAYRHOFER, G.; ROBERTSON, S. A. Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the preovulatory period. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 277-286, 1993.

BRANNSTROM, M.; NORMAN, R. J. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1762-1775, 1993.

BRANNSTROM, M.; PASCOE, V.; NORMAN, R. J.; McCLURE, N. Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. **Fertility and sterility**, v. 61, p. 488-495, 1994.

BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or somatic cells? **Molecular and cellular Endocrinology**, v. 187, p. 11-18, 2002.

BRAW-TAL, R.; TISDALL, D. J.; HUDSON, N. L.; SMITH, P.; McNATTY, K. P. Follistatin but not alpha or beta A inhibin subunit mRNA is expressed in fetal ovaries in late gestation. **Journal of molecular endocrinology**, v. 13, p. 1-9, 1994.

BRITT, J. H.; HOLT, L. C. Endocrinological screening of embryo donors and embryo transfer recipients: a review of research with cattle. **Theriogenology**, v. 29, p. 189–202, 1988.

BRUCE, N. W.; MOOR, R. M. Capillary blood flow to ovarian follicles, stroma and corpora lutea of anesthetized sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.46, p. 299-304, 1976.

BRUEL, K. F. ; SPITZER, J. C. ; THOMPSON, C. E.; BRUEL, F. F. First-service pregnancy rate in beef heifers as influenced by human chorionic gonadotropin administration before and/or after breeding. **Theriogenology**, v. 34, p. 139–145, 1990.

BUKOVSKY, A.; PRESI, J. Ovarian function and the immune system. **Medical Hypotheses**, v.5, p. 415-436, 1979.

CALDER, M. D.; MANIKKAM, M.; Salfen, B. E.; YOUNGQUIST, R. S.; LUBAHN, D. B.; LAMBERSON, W. R.; GARVERICK, H. A. Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Δ^4, Δ^5 isomerase compared to normal dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 471-476, 2001.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 25, p. 71–86, 1986.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory evaluation of the superovulatory response in donor cattle. **Theriogenology**, v. 30, p. 477–488, 1988.

CAMERON, A. W. N.; BATT, P. A. PMSG may directly stimulate ovulation in female goats. **Animal Reproduction Science**, v. 25, p. 233–239, 1991.

CARROLL, D. J.; GRUMMER, R. R.; CLAYTON, M. K. Stimulation of luteal cell progesterone production by lipoproteins from cows fed control or fat-supplemented diets. **Journal of dairy science**, v. 75, p. 2205–2214, 1992.

CARRUTHERS, T. D. Principles of hormone therapy in theriogenology. In: MORROW, D. A. (Ed.). **Current therapy in theriogenology**: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Philadelphia: WB Saunders, 1986. v. 2, p. 1–13.

CAVENDER, J. L.; MURDOCH, W. J. Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 989–997, 1988.

CHANNING, C. P. Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. **Journal of endocrinology**, v. 45, p. 297–308, 1969.

CHRISTENSON, L. K.; STOUFFER, R. L. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. **Endocrinology**, v. 37, p. 367–374, 1997.

CLARK, B. J.; WELLS, J.; KING, S. R.; STOCCO, D. M. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. **Journal of Biology Chemistry**, v. 269, p. 28314–28322, 1994.

CONNOLLY, D. T. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 47, p. 219–223, 1991.

CORTEEL, J. M.; LEBOEUF, B.; BARIL, G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. **Small Ruminants Research**, v. 1, p. 19-35, 1988.

DAVIS, J. S. Mechanism of hormone action: luteinizing hormone receptors and second-messenger pathways. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 6, p. 254-261, 1994.

DAVIS, J. S. Modulation of luteinizing hormone stimulated inositol phosphate accumulation by phorbol esters in bovine luteal cells. **Endocrinology**, v. 131, p. 749-757, 1992.

DAVIS, J. S.; ALILA, H. W.; WEST, L. A. ; CORRADINO, R. A.; WEAKLAND, L. L.; HANSEL, W. Second messenger systems and progesterone secretion in the small cells of bovine corpus luteum: effects of gonadotropins and prostaglandin F_{2α}. **Journal of Steroidogenesis Biochemistry**, v. 32, p. 643-649, 1989.

DAVIS, J. S.; MAY, J. V.; KEEL, B. A. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45; p. 1351-1380, 1996.

DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. **Frontiers in bioscience**, v. 7, p. 949-978, 2002.

DAVIS, J. S.; WEAKLAND, L. L.; FARESE, R. V.; WEST, L. A. Luteinizing hormone increases inositol triphosphate and cytosolic free Ca²⁺ in isolated bovine luteal cells. **Journal of Biology Chemistry**, v. 262, p. 8515-8521, 1987.

DE ROBERTIS JR., E.; HIB, J.; PONZIO, R.; **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 414p.

DECHAT, T.; PFLEGHAAR, K.; SENGUPTA, K.; SHIMI, T.; SHUMAKER, D. K.; SOLIMANDO, L.; GOLDMAN, R. D. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. **Genes Development**, v. 1, n. 22, p. 832-853, 2008.

DEL VECHIO, R. P.; THIBODEAUX, J. K.; HANSEL, W. Contact-associated interactions between large and small bovine luteal cells during the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, p. 25-33, 1994.

DEL VECHIO, R. P.; THIBODEAUX, J. K.; SAATMAN, R. HANSEL, W. Interactions between large and small luteal cells collected during the mid- or late-luteal stages of the bovine oestrus cycle. **Reproduction, fertility and development**, v. 7, p. 35-40, 1995.

DENAMUR, R.; MARTINET, J.; SHORT, R. V. Secretion of progesterone by corpus luteum of the ewe after hypophysectomy, pituitary stalk section and hysterectomy. *Acta Endocrinol (Copenh)*, v. 52, p. 72-90, 1966.

DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M. Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle. **Molecular reproduction and development**, v. 36, p. 271-273, 1993.

DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M.; DE LOOS, F. A. M. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology*, v. 39, p. 25-41, 1993.

DIMINO, M. J. Differences in mitochondrial steroidogenesis between follicular and luteal tissues of porcine ovaries. *Endocrinology*. v. 101, p. 1844-1849. 1977.

DIMINO, M. J.; BERMAN, S. K. Increases in mitochondrial steroidogenesis after short term incubation of porcine ovarian follicles with luteinizing hormone. *Endocrinology*. v. 104, p. 780-783. 1979.

DIMINO, M. J.; ELFONT, E. A.; BERMAN, S. K. Changes in ovarian mitochondria: early indicators of follicular luteinization. *Advances in experimental Medicine and Biology*. v. 112, p. 505-510. 1979.

DOODY, K.J.; LORENCE, M.C.; MASON, J.I.; SIMPSON, E.R. Expression of messenger ribonucleic acid species encoding steroidogenic enzymes in human follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 70, p. 1041-1045, 1990.

DRIANCOURT, M. A.; FRY, R. C. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. **Animal Reproduction and Science**, v. 27, p. 279–292, 1992.

DRUMMOND, A. E. TGF- β signalling in the development of ovarian function. **Cell Tissue Research**, v. 322, p. 107–115, 1995.

ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D.; SEIDEL, G. E. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, v. 9, p. 17–26, 1978.

EPIFANO, O.; DEAN, J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. **Endocrinology and metabolism**, v. 13, p. 160–173, 2002.

ESPEY, L. L. Ovulation as an inflammatory response - a hypothesis. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 73–106, 1980.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 298–215, 1997b.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v. 195, p. 327–336, 1997a.

FAIRCHILD, D. L.; BENYO, D.; PATE, J. L. Tumor necrosis factor- α alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. **Endocrinology**, v. 130, p. 854–860, 1992.

FAIRCHILD, D. L.; PATE, J. L. Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon- γ . **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 357–363, 1991.

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G. D. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the oestrus cycle. **Biology of reproduction**, v. 35, p. 1299–1308, 1986.

FÁTIMA, L. A. **Expressão de fatores angiogênicos em corpo lúteo cíclico e superovulado de búfalas**. 2008. f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, p. 4–25, 1997.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.

FILICORI, M.; BUTLER, J. P.; CROWLEY, W. F. Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest*, v. 73, p. 1638-1647, 1984.

FINDLAY J.K. Angiogenesis in reproductive tissues. **Journal of Endocrinology**. v. 111, p. 357-366, 1986.

FITZ, T. A.; MAYAN, M. H.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. D. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.27, p. 703-711, 1982.

FORTUNE, J. E. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 292–299, 1986.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of reproduction**, v. 50, p. 225-232, 1994.

FRASER, H. M.; LUNN, S. F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. **British medical bulletin**, v. 56, p. 787-797, 2000.

FRASER, H. M.; WULFF, C. Angiogenesis in the corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 88, 2003.

FULLER, G. B.; HANSEL, W. Regression of sheep corpora lutea after treatment with antiovine luteinizing hormone. **Journal of animal science**, v. 31, p. 99-103, 1970.

FUNKENSTEIN, B.; WATERMAN, M. R.; SIMPSON, E. R. Induction of synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin by follicle-stimulating hormone, 8-bromo-cyclic AMP, and low density lipoprotein in cultured bovine granulosa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 8572–8577, 1984.

GARVERICK, H. A.; SMITH, M. F.; ELMORE, R. G.; MOREHOUSE, G. L.; AGUDO, L. S.; ZHALER, W. L. Changes and interrelationships among luteal LH receptors, adenylate cyclase activity and phosphodiesterase activity during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 61, p. 216-223, 1985.

GEMMEL, R. T. STACY, B. D. THORBURN, G. D. Ultrastructural study of secretory granules in the corpus luteum of the sheep during the oestrus cycle. **Biology of reproduction**, v. 11, p. 447-462, 1974.

GINTHER, O. J. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. **Journal of animal science**, v. 39, p. 550-564, 1974.

GIRSH, E.; MILVAE, R. A.; WANG, W.; MEIDAN, R. Effect of endothelin-1 on bovine luteal cell function: role in prostaglandin F₂α-induced antisteroidogenic action, **Endocrinology**, v. 137, p. 1306-1312, 1996.

GLASS, J. D. FITZ, T. A. , NISWENDER, G. D. Cytosolic receptor for estradiol in the corpus luteum of the ewe variation throughout the estrous cycle and distribution between large and small steroidogenic cell types. **Biology of reproduction**, v. 31, p. 367-374, 1985.

GORE-LANGTON R.E e ARMSTRONG D.T. Follicular steroidogenesis and its control. In KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.) **The Physiology of Reproduction; New York: Raven Press, 1994.**, v. 1, p. 571–628, 1994.

GOTO, K.; NAKANISHI, Y.; OHKUTSU, S.; OGAWA, K.; TASAKI, M.; OHTA, M.; INOHAE, S.; TATEYAMA, S.; KAWABATA, T. Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated Japanese black cattle. *Theriogenology*, v. 27, p. 819–826, 1987.

GOULDING, D.; WILLIAMS, D.H.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. Superovulation in heifers using either pregnant mare's serum gonadotrophin or follicle stimulating

hormone during the mid-luteal stage of the estrous cycle. *Theriogenology*, v. 36, p. 949–958, 1991.

GRASSELLI, F.; BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; TAMANINI, C. Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. **Reproduction in domestical animals**, v. 37, p. 362-368, 2002.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; KILLILEA, S. D.; KRAFT, K. C.; REYNOLDS, L. P. Production of mitogenic factor(s) by ovine corpora lutea through the estrous cycle. **Endocrinology**, v.130, p. 3625-3632, 1992.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P.; KIRSCH, J. D.; REDMER, D. A. Gap junctional intercellular communication of bovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. **Biology of reproduction**, v. 54, p. 538-545, 1996.

GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P.; HOIER, R.; ASSEY, R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 41–50, 1995.

HALL, P. F.; ALMAHBOBI, G. The role of the cytoskeleton in the regulation of steroidogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 43, p. 769-777, 1992.

HARTUNG, S., RUST, R., BALVERS, M.; IVELL, R. Molecular cloning and in vivo expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 215, p. 646–653, 1995.

HAZZARD, T. M.; CHRISTENSON, L. K.; STOUFFER, R. L. Changes in expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 and -2 in the macaque corpus luteum during the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n.11, p. 993-998, 2000.

HAZZARD, T. M.; MOLSKNESS, T. A.; CHAFFIN, C. L.; STOUFFER, R. L. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. **Molecular human reproduction**, v. 5, p. 1115-1121, 1999.

HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A.; BERISHA, B.; KOSMANN, M. R.; OKUDA, K.; SCHAMS, D. Regulation of angiotensin II production and angiotensin receptors in

microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. **Biology of reproduction**, v. 62, p. 162-167, 2000.

HAYASHI, K. VEGF (Vascular endothelial growth factor). **Nihon rinsho**, v. 57, p. 805-807, 1999, supplement.

HEATH, E.; WEINSTEIN, P.; MERRITT, B.; SHANKS, R.; HIXON J. Effects of prostaglandins on the bovine corpus luteum: granules, lipid inclusions and progesterone secretion. **Biology Reproduction**, v. 29, p. 977-985, 1983.

HERRIER, A.; ELSAESSER, F.; NIEMANN, H. Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. *Theriogenology*, v. 33, p. 415-422, 1990.

HERVÉ, V.; ROY, F.; BERTIN, J.; GUILLOU, F.; MAUREL, M. C. Antiequine chorionic gonadotropin (eCG) antibodies generated in goats treated with eCG for the Induction of ovulation modulate the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone bioactivities of eCG differently. **Endocrinology**, v. 145, p. 294-303, 2004.

HOYER, P. B.; FITZ, T. A.; NISWENDER, G. D. Hormone-independent activation of adenylate cyclase in large steroidogenic ovine luteal cells does not result in increased progesterone secretion. **Endocrinology**, v. 114, p. 604-608, 1984.

HOYER, P. B.; KEYES, P. L.; NISWENDER, G. D. Size distribution and hormonal responsiveness of dispersed rabbit luteal cells during pseudopregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 905-910, 1986.

HOYER, P. B.; NISWENDER, G. D. The regulation of steroidogenesis is different in the two types of ovine luteal cells. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 63, p. 240-248, 1985.

JABLONKA-SHARIFF, A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 133, p. 1871-1879, 1993.

JEFCOATE, C. R.; McNAMARA, B. C.; ARTEMENKO, I.; YAMAZAKI, T. Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450 scc in steroid hormone synthesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 751-767, 1992.

JIANG J. Y.; MACCHIARELLI, G.; TSANG, B. K.; SATO, E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. **Reproduction**, v. 125, p. 211-223, 2003.

JONES, P. C.; HSUEH, A. W. Regulation of progesterone-metabolising enzyme by adrenergic agents, prolactin, and prostaglandin in cultured rat ovarian granulosa cells. **Endocrinology**, v. 109, p.1347-1354, 1981.

JUENGEL, J. L.; NISWENDER, G. D. Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p.193–205, 1999. Supplement.

KALTENBACH, C. C.; GRABER, J. W.; NISWENDER, G. D.; NALBANDOV, A. V. Luteotrophic properties of some pituitary hormones in non-pregnant or pregnant hypophysectomized ewes. **Endocrinology**, v. 82, p. 818-824, 1968.

KENNY, N.; FARIN, C.E.; NISWENDER, G. D. Morphometric quantification of mitochondria in the two steroidogenic ovine luteal cell types. **Biology of Reproduction**. v. 40, p. 191-196. 1989.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2alpha. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 369–380, 2001.

KOHRAM, H.; TWAGIRAMUNGU, H.; BOUSQUET, D. ; DUROCHER, J. ; GUILBAULT, L. A. Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. **Theriogenology**, v. 49, p.1175–1186, 1998.

KOSS, R.D.; HANSEL, W., 1981. The large and small cells of the bovine corpus luteum: ultrastructural and functional differences. In: ____ Dynamics of Ovarian Function, New York, Raven Press, p. 197-203, 1981.

KUO, T. C.; ENDO, K.; DHARMARAJAN, A. M.; MIYAZAKI, T.; ATLAS, S. J.; WALLACH, E. E. Direct effect of angiotensin II on in-vitro perfused rabbit ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v. 92, p. 469-474, 1991.

KURAN, M.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. The response of bovine granulosa cells to different gonadotrophins in culture. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 1–12, 1996.

LABRIE, F.; SIMARD, J.; LUU-THE, V.; BELANGER, A.; PELLETIER, G. Structure, function and tissue-specific gene expression of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 805–826, 1992.

LAMMING, G. E.; DARWASH, A. O.; BLACK, H. L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 245–252, 1989.

LAWLER, D. F.; HOPKINS, J.; WATSON, E. D. Immune cell populations in the equine corpus luteum throughout the oestrous cycle and early pregnancy: an immunohistochemical and flow cytometric study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 281-290, 1999.

LEE, A.; CHRISTENSON, L. K.; PATTON, P. E.; BURRY, K. A.; STOUFFER, R. L. vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. **Human Reproduction**, v. 12, n. 12, p. 2756-2761, 1997.

LEMON, M.; LOIR, M. Steroid release in vitro by two luteal cell types in the corpus luteum of pregnant sow. **Journal of endocrinology**, v. 72, p. 351-359, 1977.

LEMON, M.; MAULÉON, P. Interaction between two luteal cell types from the corpus luteum of the sow in progesterone synthesis in vitro. **Journal of reproduction and fertility**, v. 64, p. 315-323, 1982.

LEUNG, P. C.; STEELE, G. L. Intracellular signaling in the gonads. **Endocrine Reviews**. v. 13, p. 476-498, 1992.

LEUNG, L. K.; WANG, T. T. Y. Paradoxical regulation of Bcl-2 family proteins by 17β -estradiol in human breast cancer cells MCF-7. **British Journal of Cancer**, v. 81, p. 387-392, 1999.

LEWIS, G. S.; CALDWELL, D. W.; REXWAD JR, C. E.; DOWLER, H. H.; OWEN, J. R. Effects of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on pregnancy rate in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 73, p. 66–72, 1990.

LICHT, P. GALLO, A. B. AGGARWAL, B. B. FARMER, S. W. CASTELINO, J. B. PAPKOFF, H. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. **Journal of endocrinology**, v. 83, p. 311-322, 1979.

LISZEWSKA, E.; REKAWIECKI, R.; KOTWICA, J. Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 78, p. 67-81, 2005.

LODISH, M. B.; POWELL, A. C.; ABU-ASAB, M.; COCHRAN, C.; LENZ, P.; LIBUTTI, S. K.; PINGPANK, J. F.; TSOKOS, M.; GORDEN, P. Insulinoma and gastrinoma syndromes from a single intrapancreatic neuroendocrine tumor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 4, p. 1123-1128, 2008.

MAC CLURE, N.; HEALY, D.; ROGERS, P. A. W.; SULLIVAN, J.; BEATON, L.; HANING JR., R. V.; CONOLLY, D. T.; ROBERTSON, D. M. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. **The Lancet**, v. 344, p. 235-236, 1994.

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; MAPLETOFT, R. J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, p.757-769, 2000.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; ZANNONI, A.; CASTELLANI, G.; BERARDINELLI, P. ; SCAPOLO, P. A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.1014-1019, 2001.

MAYBIN, J. A.; DUNCAN, W. C. The human corpus luteum: which cells have progesterone receptors? **Reproduction**, v. 128, n. 4, p. 423-431, 2004.

MEYER, G. T.; BRUCE, N. W. Structural and functional reserve of steroidogenic membranes in stimulated luteal cells of pregnant rats. **Journal Anatomy**, v. 177, p. 31–40, 1991.

MILLER, W. L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. **Endocrine Reviews**, v. 9, p. 295–318, 1988.

MILLER, W. L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. **Biochimica and biophysica acta**, v. 1171, p. 663-676, 2007.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2 α in corpus luteum function. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 1-5, 2000.

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

MIYAMOTO A.; KOBAYASHI, S.; ARATA, S.; OHTANI, M.; FUKUI, Y.; SCHAMS, D. Prostaglandin F2 alpha promotes the inhibitory action of endothelin-1 on the bovine luteal function in vitro. **Journal of endocrinology**, v. 152, p. 7-11, 1997.

MIYAMOTO A.; OKUDA, K.; SCHWEIGERT, F. J.; SCHAMS, D. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. **Journal of endocrinology**, v. 135, p. 103-114, 1992.

MIYAMOTO, A.; SCHAMS, D. Oxytocin stimulates progesterone release from microdialyzed bovine corpus luteum in vitro. **Biology of reproduction**, v. 44, p. 1163-1170, 1991.

MIYAMOTO, K.; SATO, E. F.; KASAHARA, E.; JIKUMARU, M.; HIRAMOTO, K.; TABATA, H.; KATSURAGI, M.; ODO, S.; UTSUMI, K.; INOUE, M. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 674-681, 2010.

MOOR, R. M.; HAY, M. F.; SEAMARK, R. F. The sheep ovary: regulation of steroidogenic, haemodynamic and structural changes in the largest follicle and adjacent tissue before ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 45, p. 595–604, 1975.

MORI, T. Immuno-endocrinology of cyclic ovarian function. **American journal of Reproductive Immunology**, v. 23, p. 80-89, 1990.

MOUTON, P. R. Principles and practices of unbiased stereology. An introduction for bioscientist. **Baltimore: John Hopkins University Press**, 2002 p. 214.

MOUTON, P. R.; GOKHALE, A. M.; WARD, N. L.; WEST, M. J. Stereological length estimation using spherical probes. **Journal of Microscopy**, v. 206, p. 54-64, 2002.

MURDOCH, W. J. Treatment of sheep with prostaglandin F₂ alpha enhances production of a luteal chemoattractant for eosinophils. **American journal of reproductive immunology and microbiology**, v.15, p. 52-56, 1987.

MURDOCH, W. J.; STEADMAN, L. E.; BEIDEN, E. L. Immunoregulation of luteolysis. **Medical Hypotheses**. v. 27, p. 197-199, 1988.

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

MUTIGA, E. R.; MUKASA-MUGERWA, E. Effect of the method of estrus synchronization and PMSG dosage on estrus and twinning in Ethiopian Menze sheep. **Theriogenology**, v. 38, p. 727-734, 1992.

NAKAO, T.; NAVITA, S.; TANAKA, K.; HORN, H.; SHIVAKAURA, J.; NOSHIRE, H. Improvement of first-service pregnancy rate in cows with gonadotropin-releasing hormone analogue. **Theriogenology**, v. 20, p. 111–119, 1983.

NEULEN, J.; YAN, Z.; RACZEK, S.; WEINDEL, K.; KECK, C.; WEICH, H. A.; MARME, D.; BRECKWOLDT, M. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, p. 1967–1971, 1995.

NISHIMURA, K.; SHIBAYA, M.; SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Progesterone stimulation by LH involves the phospholipase-C pathway in bovine luteal cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, p. 257-261, 2004.

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

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

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

NISWENDER, G. D.; NETT, T. M. The corpus luteum and its control in infraprimate species. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.) **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994. v. 1, chap14, p. 781-816.

NORTHEY, D. L.; BARNES, F. L.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Relationship of serum progesterone, luteinizing hormone and the incidence of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v. 23, p. 214, 1985 [abstract].

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

O'SHEA J. D. CRAN, D. G. MAY, F. M. the small luteal cell of the sheep. **Journal of anatomy**, v. 128, p. 239-251, 1979.

O`SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; DOCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 483-487, 1989.

OTALA, M.; MAKINEN, S.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; PENTIKAINEN V, MATIKAINEN, T.; DUNKEL, L. Effects of testosterone, dihydrotestosterone, and 17beta-estradiol on human ovarian tissue survival in culture. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 1077-187 Supplement 3

PAAVOLA, L. G. The corpus luteum of the guinea pig IV: fine structure of macrophages during pregnancy and postpartum luteolysis and the phagocytosis of luteal cells. **American journal of Anatomy**, v. 154, p. 337-364, 1979.

PAAVOLA, L. G. CHRISTENSEN, A. K. Characterization of granule types in the luteal cells of sheep at the time of maximum progesterone secretion. **Biology of reproduction**, v. 25, p. 203-215, 1981.

PAPA, P. C, MOURA, C. E, ARTONI, L. P, FÁTIMA, L. A, CAMPOS, D. B, MARQUES, J. E JR, BARUSELLI, P. S, BINELLI, M., PFARRER, C, LEISER, R. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. **Domestic animal endocrinology**, v. 33, p. 379-389, 2007.

PATE, J. L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1884-890, 1994.

PATE, J. L. Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. **Journal of reproduction and fertility**, v. 49, p. 365-377, 1995.

PATE, J. L.; CONDON, W.A. Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 28, p. 551-562, 1982.

PEPPERELL, J. R.; WOLCOTT, K.; BEHRMAN, H. R. Effects of neutrophils in rat luteal cells. **Endocrinology**, v. 130, p. 1001-1008, 1992.

PETROFF, M. G.; PETROFF, B. K.; PATE, J. L. Expression of cytokine messenger ribonucleic acids in the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 140, p.1018–1021; 1999.

PHAN, B.; RAKENIUS, A.; PIETROWSKI, D.; BETTENDORF, H.; KECK, C.; HERR, D. hCG-dependent regulation of angiogenic factors in human granulosa lutein cells. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 7, p. 878-884, 2006.

PHILLIPS HS.; HAINS J.; LEUNG D ; FERRARA. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. **Endocrinology**, v. 127 p. 965-967, 1990.

PIETROWSKI, D.; KECK, C. Differential regulation of ANG2 and VEGF-A in human granulosa lutein cells by choriogonadotropin. **Experimental Clinical Endocrinology and Diabetes**. v. 112, p. 08-14. 2004.

PLENDL, J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 29, p. 257-266, 2000.

PLENDL, J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anatomia Histologia Embryologia*. v. 29, p. 257-266. 2001.

DO PRADO, C.; GARBELOTTI, F.; DE MOURA, C. E. B.; ARTONI, L. P.; CAMPOS, D. B. ; PFARRER, C.; PAPA, P. C. . Imunolocalização do FGF-2 em corpo lúteo de búfalos ao longo do ciclo estral. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 8, p. 36-39, 2004.

PROCKNOR, M.; DACHIR, S.; OWENS, R. E.; LITTLE, D. E.; HARMS, P. G. Temporal relationship of the pulsatile fluctuation of luteinizing hormone and progesterone in cattle: a time series cross-correlation analysis. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 191-198, 1986.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915–926, 1995.

RAHE, C. H.; OWENS, R. E.; FLEEEGER, J. L.; NEWTON, H. L.; HARMS, P. G. Patterns of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. **Endocrinology**, v. 107, p. 498-503, 1980.

REDMER, D. A.; DORAISWAMY, V.; BORTNEM, B. J.; FISHER, K.; JABLONKA-SHARIFF, A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the development ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 879-889, 2001.

REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P. Contact-dependent intercellular communication of bovine luteal cells in culture. **Endocrinology**. v. 129, p. 2757-2766. 1991.

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 1, p. 182-192, 1996.

REKAWIECKI, R.; KOWALIK, M. K.; SLONINA, D.; KOTWICA, J. Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. *Journal of Physiology and Pharmacology*. v. 59, p. 75-89. 2008.

REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. **International Journal of Experimental Pathology**., v. 83, p. 151-163, 2002.

REYNOLDS, S. R. Physiology of reproduction. **Annual review of physiology**, v. 10, p. 65-92, 1948.

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

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**. v. 47, p. 698-708. 1992.

RICHARDS, R. G.; ALMOND, G.W. Tumour necrosis factor-alpha differentially alters progesterone and prostaglandin F2 alpha production by porcine luteal cells. **Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 75–83, 1994.

RICKE, W. A.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Growth and cellular proliferation of pig corpora lutea throughout the oestrus cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 369-377, 1999.

ROBINSON, N. A. ; LESLIE, K. E. ; WALTON, J. S. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v. 72, p. 202–207, 1989.

RODGERS R. J.; O`SHEA, J. D.; BRUCE, N. W. Morphometric analysis of the cellular composition of the ovine corpus luteum. **Journal of anatomy**, v. 138, p. 757-770, 1984.

RODGERS, R. J.; O'SHEA J. D.; FINDLAY, J. K. Progesterone production in vitro by small and large ovine luteal cells. **Journal of reproduction and fertility**, v. 69, p. 113-125, 1983.

RODGERS, R. J RODGERS, H. F. WATERMAN, M. R. SIMPSON, E. R. Immunolocalization of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P-450 and ultrastructural studies of bovine corpora lutea. **Journal of reproduction and fertility**, v. 78, p. 639-652, 1986.

RODGERS, F. E.; YOUNG, F. M.; FRASER, H. M.; ILLINGWORTH, P. J. Endothelial cell proliferation follows the mid-cycle luteinizing hormone surge, but not human chorionic gonadotrophin rescue, in the human corpus luteum. **Human Reproduction**, v. 112, p. 1723-1729, 1997.

ROMANO, J. E. Does in proestrus-estrus hasten estrus onset in does estrous synchronized during breeding season. **Appl Animal Behavior Science**, v. 77, p. 329-334, 2002.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, p. 651-658, 2010.

SAKUMOTO, R.; ANDO, Y.; OKUDA, K. Progesterone release of bovine corpus luteum in response to oxytocin in different culture systems. **Journal of Reproduction and Development**, v. 42, p. 199-204, 1996.

SAKURADA, Y.; SHIROTA, M.; INOUE, K.; UCHIDA, N., SHIROTA, K. New approach to in situ quantification of ovarian gene expression in rat using a laser microdissection technique: relationship between follicle types and regulation of inhibin-alpha and cytochrome P450aromatase genes in the rat ovary. **Histochem Cell Biology**. v. 126, n. 6, p. 735-741, 2006.

SALLES, F. J.; STRICKLAND, S. Analysis of poly(A) tail lengths by PCR: the PAT assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 118, p. 441-448, 1999.

SAWYER, H. R. ABEL, J. H. McCLELLAN M. C. SCHMITZ, M. NISWENDER, G. D. Secretory granules and progesterone secretion by ovine corpora lutea in vitro. **Endocrinology**, v. 104, p. 476-486, 1979.

SENGER, D. R.; VAN de WATER, L.; BROWN, L. F.; NAGY, J. A.; YEO, K. T.; YEO, T. K.; BERSE, B.; JACKMAN, R. W.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 12, p. 303–324, 1993.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle – an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 241–251, 2004.

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

SCHAMS, D. LIEBERMANN, J.; MIYAMOTO, A. Luteotropic role of bovine luteal oxytocin in vitro. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 395, p. 543-544, 1995.

SCHMITT, E. J. P. ; DIAZ, T. ; BARROS, C. M. ; DE LA SOTA, R. L.; DROST, M.; FREDRIKSSON, E. W. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1074–1183, 1996.

SEGARS, J. H.; DRIGGERS, P. H. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades I: membrane associated signaling complexes. **Trends Endocrinol Metabolism**, v. 13, p. 349-354, 2002.

SENGER, D. R.; VAN de WATER, L.; BROWN, L. F.; NAGY, J. A.; YEO, K. T.; YEO, T. K.; BERSE, B.; JACKMAN, R. W.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 12, p. 303-317, 1993.

SHELTON, K.; GAYERIE DE ABREU, M. F.; HUNTER, M. G.; PARKINSON, T. J.;

LAMMING, G. E. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 1–10, 1990.

SHIKONE, T.; YAMOTO, M.; NAKANO, R. Follicle-stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. **Endocrinology**, Wakayama, v. 131, n. 3, p. 1063-1068, 1992.

SHIMIZU, T.; JIANG, J. Y.; SASADA, H.; SATO, E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. **Biology of Reproduction**, Aoba-ku, v. 67, n. 6, p. 1846-1852, 2002.

SHIRASUNA, K.; YAMAMOTO, D.; MOROTA, K.; SHIMIZU, T.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Prostaglandin F2a Stimulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Depending on the Existence of Bovine Granulosa Cells: Analysis by Co-culture System of Endothelial Cells, Smooth Muscle Cells and Granulosa. **Cells Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p. 592–598, 2008.

SHUMAKER, D. K.; KUCZMARSKI, E. R.; GOLDMAN, R. D. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 358-366, 2003.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; NEUFELD, G.; GITAY-GOREN, H.; KESHET, E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 2235-2243, 1993.

SIANANGAMA, P. C.; RAJAMAHENDRAN, R. Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. **Theriogenology**, v. 38, p. 85–96, 1992.

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

SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G. M.; OKUDA, K. Regulation of luteal function and corpus luteum regression: hormonal control, immune mechanisms, and inter-cellular communication. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 43, p. 57-65, 2008 supplement 2.

SKARZYNSKI, D. J.; MLYNARCZUK, J.; KOTWICA, J. Involvement of high-density lipoprotein in stimulatory effect of hormones supporting function of bovine corpus luteum. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 51, p. 111-120, 2003.

SPANEL-BOROWSKI, K.; RICKEN, A. M. Evidence for the maintenance of macrophage-like cells in long-term bovine granulosa cell cultures. **Cell and tissue research**, v. 288, p. 529-538, 1997.

STACKER, S. A.; ACHEN, M. G. The vascular endothelial growth factor family: signaling for vascular development. **Growth Factors**, v. 17, p. 1-11, 1999.

STANDAERT, F. E; ZAMORA, C. S.; CHEW, B. P. Quantitative and qualitative changes in blood leukocytes in the porcine ovary. **American journal of reproductive immunology**, v. 25, p. 163-168, 1991.

STOCCO, D. M. A StAR search: implications in controlling steroidogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 328–336, 1997.

STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 221–244, 1996.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 1, p. 117–149, 2007.

SUH, D. Y.; HUNT, T. K.; SPENCER, M. Insuline-like growth factor-I reserves the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats. **Endocrinology**, v. 131, p. 2399-2403, 1992.

SUNDERKÖTTER, C.; STEINBRINK, K; GOEBELER, M.; BHARDWAJ, R.; SORG, C. Macrophages and angiogenesis. **Journal of leukocyte biology**, v. 55, p. 410-422, 1994.

SUZUKI, T.; SASANO, H.; TAKAYA, R.; FUKAYA, T.; YAJIMA, A.; NAGURA, H. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. **Human Reproduction**, v. 13, p. 953–959, 1998.

TALAVERA, F.; PARK, C. S.; WILLIAMS, G. L. Relationships among dietary lipid intake, serum cholesterol and ovarian function in Holstein heifers. **Journal of Animal Science**, v. 60, p. 1045–1051, 1985.

TAMURA, H.; GREENWALD, G. S. Angiogenesis and its hormonal control in the corpus luteum of the pregnant rat. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 1149–1154, 1987.

TOWNSON, D. H.; PATE, J. L. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin-1 β in cultured bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 480–485, 1994.

TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F $_{2\alpha}$ induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1016–1022, 1997.

TUCKEY, R. C.; ATKINSON, H. C. Pregnenolone synthesis from cholesterol and hydroxycholesterols by mitochondria from ovaries following the stimulation of immature rats with pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. **European journal of biochemistry**, v. 186, p. 255–259, 1989.

URSELEY, J. Varying response to luteinizing hormone of two luteal cell types isolated from bovine corpus luteum. **Journal of Endocrinology**, v. 83, p. 303, 1979.

VAN BLERKOM, J.; MOTTA, P. A scanning electron microscopic study of the luteofollicular complex. III. Repair of ovulated follicle and formation of the corpus luteum. **Cell Tissue Research**, v. 189, p. 131–153, 1978.

VOS, P. L. A. M.; VAN DER SCHANS, A.; DE WIT, A. A. C.; WILLEMSE, A. H.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. Effect of neutralization of pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-superovulated heifers on follicular function and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 387–393, 1994.

VOSS, A. K.; HANSEL, W. Estradiol-17 β has a bifasic effect on oxytocin secretion by bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1404-1409, 1993.

WAGNER, J. F.; VEENHUIZEN, E. L.; TONKINSON, L. V.; RATHMACHER, R. P. Effect of placental gonadotropin on pregnancy rate in the bovine. **Journal of Animal Science**, v. 36, p. 1129–1136, 1973.

WANG, Z.; SHI, F.; JIANG, Y. Q.; LU, L. Z.; WANG, H.; WATANABE, G.; TAVA, K. Changes of cyclic cAMP levels and phosphodiesterase activities in the rat ovary. **Journal of reproduction and development**, v. 53, p. 717-725, 2007.

WARBRITTON, V. The cytology of the corpora lutea of the ewe. **Journal of Morphology**, v. 56 p. 181-202, 1934.

WATANABE, I.; OGAWA, K. **Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução**. 1. ed. São Paulo: Editora Paulo's, 2007. p. 11-12.

WEBER, D. M.; FIELDS, P. A.; ROMRELL, L. J.; TUMWASORN, S.; BALL, B. A.; DROST, M.; FIELDS, M. J. Functional differences between small and large luteal cells of the late-pregnant vs. nonpregnant cow. **Biology of Reproduction**. v. 37, p. 685-697. 1987.

WEEMS, C. W.; WEEMS, Y. S.; RANDEL, R. D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.

WILLIAMS, M. T.; CLARK, M. R.; LING, W. Y.; LeMARIE, W. J.; CARON, M. G.; MARSH, J. M. The role of cyclic AMP in the action of luteinizing hormone on steroidogenesis in the corpus luteum. **Advances in Cyclic Nucleotide Research**. v. 9, p. 573-582, 1978.

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

WILTBANK, M. C.; DISKIN, M. G.; FLORES, J. A.; NISWENDER, G. D. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II. Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F2 alpha. **Biology of reproduction**, v. 42, p. 239-245, 1990.

WOLFENSON, D.; SONEGO, H.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; SHPIRER, Y.; MEIDAN, R. Comparison of the steroidogenic capacity of bovine follicular and luteal cells, and corpora lutea originating from dominant follicles of the first or second follicular wave. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 241-247, 1999.

WULFF, C.; WIEGAND, S. J.; SAUNDERS, P. T. K.; SCOBIE, G. A.; FRASER, H. M. Angiogenesis during follicular development and inhibition by Flt-1-Fc (VEGF Trapa40) in the primate. **Endocrinology**, v. 142, p. 3244-3254, 2001.

ZELEZNIK, A. J. Modifications in gonadotropin signaling: a key to understanding cyclic ovarian function. **Journal of the society for gynecologic investigation**, v. 8, p. 24-25, 2001.

ZELEZNIK, A. J.; SCHULER, H. M.; REICHERT, J. L. E. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. **Endocrinology**, v. 109, p. 356–362, 1981.

ZHENG, J.; FRICKE, P. M.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Evaluation of growth, cell proliferation and cell death in the bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 623-632, 1994.

ZHENG, J. REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. **Biology of reproduction**, v. 49, p. 1177-1189, 1993.

YAN, Z.; WEICH, H. A.; BERNART, W.; BRECKWOLDT, M.; NEULEN, J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in luteinized human granulosa cells in vitro. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 77, p. 1723-1725, 1993.

YOSHIMURA, Y. KARUBE, M. ODA, T.; KOYAMA, N.; SHIOKAWA, S.; AKIBA, M.; YOSHINAGA, A.; NAKAMURA, Y. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in vitro perfused rabbit ovaries. **Endocrinology**, v. 133, p. 1609-1616, 1993.