CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA

Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos

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 a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo

2003

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1316 FMVZ	<p>Moura, Carlos Eduardo Bezerra de Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos / Carlos Eduardo Bezerra de Moura. – São Paulo : C. E. B. Moura, 2003. 122 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2003.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.</p> <p>1. Búfalos. 2. Glândulas endócrinas. 3. Hormônios progestágenos. 4. Vascularização em animais. 5. Fatores de crescimento. I. Título.</p>
----------------	---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão do VEGF e seus receptores: possíveis correlações com a microvascularização do corpo lúteo de bubalinos em estágios definidos do ciclo estral", Protocolo nº 198/2002, 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 sendo aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "VEGF and VEGFRs expression: correlation with microvascularization of water buffalo corpus luteum during defined stages of estrous cycle" protocol number 198/2002, under the responsibility of Profª Drª Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting.)

São Paulo, 02 de dezembro de 2002

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MOURA, Carlos Eduardo Bezerra de

Título: Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos

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 Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho, a minha mãe.

“Mãe, seu amor por mim me faz compreender um pouco da
amplitude do Amor de Deus”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser, vem de ti Senhor;

A Profa. Paula de Carvalho Papa, não apenas pela confiança, conselhos e orientação, acima de tudo pelo carinho, amizade e pelo exemplo de ética e profissionalismo;

A Profa. Maria Angélica Miglino, coordenadora deste curso de pós-graduação, pela oportunidade e confiança depositadas em mim;

Ao Prof. Pietro Sampaio Baruselli pelos conselhos e fornecimento do material de búfalas superovuladas;

Ao Prof. Dr. Dieter Schams do Institute of Physiology da Technical University of Munich, pela doação do anticorpo anti-VEGF;

Ao Prof. Dr. h. c. Rudolf Leiser e a Dra. Christiane Pfarrer, pela doação dos anticorpos anti-VEGFR-1, anti-VEGFR-2 e lecitina biotinilada;

Ao Doutorando Nélcio Antônio Tonizza de Carvalho, pelos contatos como os bubalinocultores, colaborando na obtenção dos animais e nos cedendo material de seus experimentos de superovulação em búfalas;

Ao Prof. Francisco Javier Hernandez Blazquez pelos conselhos e por ter disponibilizado a infra-estrutura de seu laboratório;

Ao Prof. José Roberto Kfoury Júnior, por ter disponibilizado seu laboratório, para realização de parte dos experimentos;

Ao Prof. José Fernando Gomes de Albuquerque, mesmo não participando diretamente deste trabalho, serei eternamente grato por tudo que já fez por mim. Mais uma vez repito que me orgulho de ser seu discípulo;

Ao Prof. Moacir Franco de Oliveira, por terem me acolhido em São Paulo no momento em que mais precisei, foi mais que hospitaleiro. Adotou-me como um filho;

A Flávia Thomaz Verechia Pereira, pelo auxílio no processamento do material. Antes minha companheira de coleta, hoje uma amiga;

A Danila Barreiro Campos e Laura Pacheco Artoni, pela ajuda essencial nas correções finais e impressão dos exemplares. Meninas, vocês foram demais;

Ao meu irmão, Wirtton Peixoto Costa e família, por terem me adotado. Considero vocês como minha família;

Aos meus amigos Rafael Cardoso Carvalho, Karina Gagliardo Martinez e Naianne Clebis, simplesmente porque vocês existem na minha vida;

Aos meus amigos de república: Helder de Moraes Pereira, Henrique Ribeiro Alves Resende, Luciano Alonso e Alexandre Marques, pela amizade, convivência e paciência;

Ao meu avô, José Albino Neres, pelos conselhos, apoio e exemplo de vida;

Aos meus familiares, em especial: minha avó Maria Auxiliadora Bezerra e minha tia Anete Maria Bezerra da Silva, pelo amor devoto a mim;

A meus amigos de Mossoró, que mesmo de longe sempre torceram por mim;

Aos colegas de pós-graduação, dos quais ganhei o apelido de Cadu, por terem acolhido tão bem mais um nordestino;

A todos do Setor de Anatomia desta Faculdade, pela convivência, carinho e amizade;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da Bolsa e apoio financeiro.

A todos, muitíssimo obrigado.

“Não é o crítico que importa ao apontar como é que o homem forte tropeça, ou onde aquele que fez algo poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que está desfigurado pelo pó, suor e sangue, que com fé luta valorosamente, cheio de entusiasmo e grande devoção, mas que ao final conhece o triunfo do êxito, numa causa louvável de modo que o seu lugar nunca será como essas almas frias e tímidas que não conhecem nem vitórias, nem derrotas”.

Ellen. G. White

RESUMO

MOURA, C. E. B. **Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos**. [Expression of VEGF and vascularization of corpus luteum in buffalos]. 2003. 122 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

O corpo lúteo é uma glândula endócrina temporária que regula tanto o ciclo estral quanto a prenhez, apresentando extrema dependência de aporte sanguíneo adequado. O tratamento superovulatório aumenta a concentração sérica de progesterona (P_4) e conseqüentemente as taxas de concepção e de prenhez. Esse trabalho objetivou quantificar a vascularização dos corpora lútea (CLL) de animais controle e superovulados, correlacionando-a com a P_4 sérica e expressão de VEGF e seus receptores. Foram utilizadas 30 búfalas, cujos CLL foram divididos em cinco grupos: superovulados (receberam 400 mg de FSH divididos em doses diárias decrescentes: 80 mg, 60 mg, 40 mg e 20mg a cada 12 horas durante 4 dias), corpos hemorrágicos (CH), corpo lúteo maduro (CL), CL em regressão (CR) e *corpo albicans* (CA), que não receberam nenhum tratamento. Três CLL de cada grupo foram fixados em formol tamponado para quantificação da densidade vascular e imunolocalização de VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2. Os três restantes foram injetados com resina Mercocry para análise da microvascularização. Amostras de sangue foram coletadas e a P_4 mensurada através de RIA convencional. A densidade capilar média encontrada foi de $37,78 \pm 8,89$; $17,8 \pm 3,33$; $11,92 \pm 3,57$; $10,83 \pm 2,42$ e $3,46 \pm 1,66$ vasos/ mm^2 respectivamente para os cinco grupos, indicando maior vascularização ($p < 0,001$) para o grupo superovulado. A microvasculatura apresentou

comportamento semelhante para ambos os grupos, revelando apenas maior densidade da rede capilar dos CLL de animais superovulados, o que se refletiu nos valores séricos de progesterona que foram significativamente maiores ($p < 0,05$) para estes animais, com concentração média de 5,58 (0,97ng/ml vs 2,02 (0,16 ng/ml para os animais controle na mesma fase. O VEGF, bem como seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) foram encontrados imunohistoquimicamente no CLL de búfalas. A imunoreatividade para o VEGF e receptores, pode ser observada nas células endoteliais e luteínicas a partir do 2º dia após a ovulação (p.o.) até a fase de corpo lúteo em regressão (17º dia p.o.), com forte reação nas fase luteínicas inicial e média. A imunoreatividade foi mais intensa nos animais submetidos a superovulação.

Palavras-chave: Búfalos. Glândulas endócrinas. Hormônios progestágenos. Vascularização em animais. Fatores de crescimento.

ABSTRACT

MOURA, C. E. B. **Expression of VEGF and vascularization of corpus luteum in buffalos**. [Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos]. 2003. 122 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Corpus luteum is a temporary organ, which regulates the estrous cycle and pregnancy; it is extremely dependent on vascularization. During corpus luteum life span P_4 production is associated with an increase of capillary number known as angiogenesis. The angiogenic process is modulated by many factors, including VEGF (vascular endothelial growth factor), which is considered the most important of them. Hyperstimulation of ovarian function, a largely spread technique employed in cattle raising, is associated with high levels of estradiol and P_4 , as well as an increase of capillary invasion of the new formed CL. This study intended to quantify the vascularization of normal and superovulated corpora lutea (CLL), trying to correlate this parameter with blood P_4 concentrations and expression of VEGF and its receptors. For that purpose thirty buffalo cows were divided into five groups: superovulated (received 400 mg FSH divided in decreasing doses of 80 mg, 60 mg, 40 mg e 20mg 12/12h during 4 days), *corpus hemorrhagicans* (CH), mature *corpus luteum* (CL), regression CL (CR) e *corpo albicans* (CA), that received no treatment and were slaughtered at days 2, 9, 17 and 26 after ovulation. After slaughter ovaries were collected and corpora lutea prepared as follows: three animals from each group had their CLL fixed in buffered formol solution, cut into 0,5 cm pieces, dehydrated in increasing ethanol concentrations, cleared in xylene and embedded in paraffin using

conventional procedures. Five μm slices were prepared for quantification of vascular density and immunolocalization of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2. The ovaries of the remaining animals were injected with Mercor resin through ovarian artery in order to have the microvascularization evaluated by electron scanning microscopy. Blood samples were collected and P_4 measured through conventional RIE. Capillary density during CL life span was $37,78 \pm 8,89$; $17,8 \pm 3,33$; $11,9 \pm 3,57$; $10,83 \pm 2,42$ and $3,46 \pm 1,66$ vessels/ mm^2 respectively for superovulated (CS), CH, CL, CR and CA, indicated higher vascularization ($p < 0,001$) for superovulated group. The microvasculature showed similar behavior: the density of capillary network was higher in CLL of superovulated animals. Values of serum progesterone were significantly higher ($p < 0,05$) for CS animals: $5,58 \pm 0,97$ ng/ml vs $2,02 \pm 0,16$ ng/ml for control animals in the same stage of estrous cycle. The VEGF system and its receptors (VEGFR-1 e VEGFR-2) were immunolocalized in CLL of buffalo cows. The immunoreactivity could be detected in endothelial and luteal cells since day two post ovulation (p.o.) until the stage of regression corpus luteum (Day 17 p.o.), with strong immunostaining at the early and midluteal phase. The immunostaining was more intense in CLL of animals submitted to superovulation.

Key Words: Buffalos. Endocrine glands. Progestational hormones. Vascularization in animals. Growth factors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Concentrações médias (média $\pm$ desvio padrão) de progesterona sérica em búfalas durante o ciclo estral..... 66
- Figura 2 - Fotomicrografia do corpo hemorrágico de búfala não tratada. A- Reação de imunohistoquímica para lecitina. Observar os inúmeros lóbulos (L) marcados por cavidades centrais e os vasos (➔) localizados no septo interlobular (S). B- Vasos sanguíneos (➔) localizados no septo entre dois lóbulos luteínicos. Coloração HE, Barra=10 μ 68
- Figura 3 - Fotomicrografia do corpo lúteo maduro de Búfala não tratada. A- Reação de imunohistoquímica para lecitina. Observar os inúmeros vasos sanguíneos localizados no septo interlobular e dentro do parênquima lobular (➔). B- Células luteínicas com núcleos esféricos e centrais, citoplasma marcado pela intensa vacuolização (➔). Coloração HE, Barra=10 μ 68
- Figura 4 - Fotomicrografia do corpo lúteo em regressão de búfala não tratada. A- Reação de imunohistoquímica para lecitina. Observar células endoteliais intensamente coradas para lecitina (seta cheia) e a desorganização das células luteínicas (➔). B- Invasão de tecido conjuntivo (➔). Coloração HE, Barra=10 μ 69
- Figura 5 - Fotomicrografia do corpo albicans de búfala não tratada. A- Reação de imunohistoquímica para lecitina. Observar os vasos sanguíneos cercados por camadas concêntricas de fibroblastos (➔). B- Verificar o predomínio de fibroblastos (➔). Coloração HE, Barra=10 μ 69
- Figura 6 - Gráfico representando a densidade vascular dos CLL de búfalas nas diversas fases do ciclo estral e em animais superovulados. Corpo hemorrágico (CH) 2º dia pós-ovulação (p.o.), corpo lúteo maduro (CL) 9º dia p.o., corpo lúteo em regressão (CR) 17º dia p.o., *corpus albicans* (CA) 26º dia p.o. e corpo lúteo de animal superovulado (CS) dia 9º p.o. 71
- Figura 7 - Gráfico representando a densidade vascular do CL em relação aos níveis de progesterona sérica ao longo do ciclo estral em animais não tratados. Corpo hemorrágico (CH) 2º dia pós-ovulação (p.o.), corpo lúteo maduro (CL) 9º dia p.o., corpo lúteo em regressão (CR) 17º dia p.o., corpo albicans (CA) 26º dia p.o..... 72
- Figura 8 - Densidade vascular em relação à concentração plasmática de progesterona nos animais superovulados (CS) e grupo controle na mesma fase do ciclo estral (9 dias após a ovulação). Os valores correspondem a média $\pm$ desvio-padrão de três diferentes animais por grupo. * indica diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos para densidade capilar e ** diferença significativa entre os grupos para concentração de progesterona 73

- Figura 9 - Fotomicrografias da reação de imunohistoquímica para VEGF em CLL de búfalas superovuladas e em diversas fases do ciclo estral em animais não tratados. A- corpo hemorrágico, exibe algumas células luteínicas com citoplasma corado para VEGF (→) e células do estroma negativas (➤). B- Corpo lúteo maduro, observar células luteínicas com citoplasma fortemente corado (→) e algumas delas negativas (seta cheia). C- Corpo lúteo em regressão, mostrando apenas algumas células luteínicas positivas e células do estroma negativas (S). D- Corpo albicans, observar células endoteliais (E), luteínicas (→) e do estroma negativas (seta cheia). E- Células luteínicas, do Corpo lúteo de animal superovulado, intensamente imunoreativas (→). F- Controle negativo da reação. Barra=10μ 76
- Figura 10 - Fotomicrografias da reação de imunohistoquímica para VEGFR-1 em CLL de búfalas superovuladas (9º dia p.o.) e em diversas fases do ciclo estral em animais não tratados A- Corpo hemorrágico, observar a reação na forma de granulações no citoplasma das grandes células luteínicas e algumas células luteínicas pequenas (▶). B- Corpo lúteo maduro com células luteínicas imunocoradas para o VEGFR-1 (▶) e algumas células endoteliais negativas (➔). C- Corpo lúteo em regressão, células endoteliais positivas (➔) e nas proximidades células luteínicas fracamente coradas(▶). D- corpo lúteo superovulado, observar células luteínicas positivas (➔). Barra=10μ 77
- Figura 11 - Fotomicrografias da reação de imunohistoquímica para VEGFR-2 em CLL de búfalas superovuladas (9º dia p.o.) e em diversas fases do ciclo estral em animais não tratados. A- Corpo hemorrágico, observar células luteínicas fortemente coradas (seta cheia) e células do estroma negativas (➔). B-Corpo lúteo maduro com células luteínicas imunocoradas para o VEGFR-2 (seta cheia), células endoteliais positivas (➔) e células perivasculares negativas (seta vazia). C- Corpo lúteo em regressão, células endoteliais positivas (➔). D- Corpo lúteo superovulado, observar células luteínicas intensamente corados (➔). Barra=10μ 78
- Figura 12 - Eletromicrografia do corpo lúteo maduro de Búfala do grupo controle. A- Observar a angioarquitetura que acompanha a estrutura lobular do órgão. Artéria septal (AS) e artéria parenquimatosa superficial (APS). B- centro lobular do corpo lúteo maduro de Búfala não tratada, mostrando o arranjo dos vasos nesta região. Artérias parenquimatosas profundas com maior calibre (APP) e veias parenquimatosas profundas (→) 81
- Figura 13 - Eletromicrografia do corpo lúteo maduro de Búfala do grupo controle. **A-** Porção terminal do vaso aferente, marcada por inúmeras constrições que representam as impressões de esfíncteres (→). Foco de extravasamento de resina Mercor, devido as grandes fenestrações capilares (➤) **B-** capilares luteínicos altamente fenestrados, exibindo projeções laterais (→) 82
- Figura 14 - Eletromicrografia do corpo lúteo maduro de Búfala. A- CL de animal não tratado mostrando uma veia septal (VS) recebendo

várias veias parenquimatosas (AP) que drenam o sangue de vênulas (→). As setas cheias são as áreas de estreitamento correspondente as válvulas. B- CL de búfala superovulada, observar arranjo vascular e a densa rede capilar. Artéria septal (AS), veia septal (VS), rede capilar (→)..... 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Detalhes dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica - São Paulo - 2003	62
Tabela 2 -	Concentrações médias de progesterona sérica (ng/ml) de búfalas em diversas fases do ciclo estral e nos animais superovulados - São Paulo – 2003	65
Tabela 3 -	Densidade vascular média (vasos/mm ²) dos CLL de búfalas nas diversas fases do ciclo estral e nos animais superovulados -São Paulo – 2003.....	70
Tabela 4 -	Classificação da reação de imunohistoquímica nas células do corpo lúteo de búfalas durante o ciclo estral e nos animais superovulados - São Paulo – 2003.....	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 Anatomia do corpo lúteo	26
3.1.1 Histologia do corpo lúteo	28
3.1.2 Modificações na anatomia do corpo lúteo durante o ciclo estral	30
3.2 Vascularização do corpo lúteo	32
3.2.1 Modificações na irrigação sanguínea do corpo lúteo	33
3.3 Angiogênese e vasculogênese	36
3.3.1 Angiogênese no ovário	36
3.4 Fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos no ovário	38
3.4.1 VEGF (vascular endothelial growth factor) e seus receptores	40
3.5 Hormônios ovarianos e VEGF	45
3.6 Densidade vascular e os fatores angiogênicos	47
3.7 Superovulação	48
4 MATERIAL E MÉTODO	51
4.1 Determinação da fase do ciclo estral no grupo controle	52
4.1.1 Exame macroscópico do útero e ovário	53
4.1.2 Exame microscópico dos corpos lúteos	53
4.1.3 Dosagem de progesterona sérica	53
4.1.4 Imunohistoquímica para Lecitina	55
4.2 Protocolo para indução da superovulação	56
4.3 Preparação do material para microscopia eletrônica de varredura	57
4.4 Fixação dos tecidos para imunohistoquímica	58
4.5 Tratamento das lâminas com 3-aminopropyltriethoxy-silane (APES)	58
4.6 Preparação do tecido luteínico para quantificação da densidade vascular	59
4.7 Determinação da densidade vascular	59
4.8 Imunohistoquímica do fator e seus receptores	60
4.10 Análise estatística	62

5 RESULTADOS	63
5.1 Determinação do dia do ciclo estral	64
5.1.1 Concentrações séricas de progesterona	64
5.1.2 Achados microscópicos dos corpos lúteos.....	66
5.2 Densidade vascular dos corpos lúteos	70
5.3 Correlação entre a progesterona sérica e a densidade vascular.....	71
5.4 Imunolocalização do VEGF e seus receptores	74
5.5 Microvascularização dos corpos lúteos	79
6 DISCUSSÃO	84
6.1 Densidade vascular ao longo do ciclo estral.....	86
6.2 Concentrações séricas de progesterona	93
6.3 Correlação entre a progesterona sérica e a densidade vascular.....	96
6.4 Imunohistoquímica do VEGF e seus receptores	97
6.5 Análise da microvasculatura dos corpos lúteos de búfala	104
6 CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS.....	112

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a criação de búfalos apresentou uma taxa de 50% de crescimento no mundo e a produção leiteira dessa espécie aumentou 200% (Food and Agriculture Organization - FAO, 1999). A população de bubalinos do Brasil apresentou um crescimento anual de 12% nos últimos 10 anos (MATTOS, 1992). Este crescimento demonstra as possibilidades futuras da bubalinocultura como atividade emergente no País e no mundo, representando uma fonte de carne e leite para atender à demanda nacional. O notável desenvolvimento desta atividade parece estar relacionado às inúmeras vantagens que a criação destes animais apresenta, principalmente sua alta resistência a um grande número de doenças, apresentando poucas patologias reprodutivas se comparados aos bovinos, além de serem altamente adaptados aos climas tropicais e subtropicais e os únicos adaptados às áreas alagadas (MIRANDA, 1986).

Para assegurar o sucesso da exploração zootécnica desta espécie, faz-se necessário alcançar uma eficiência reprodutiva, que pode ser representada pela obtenção de um maior número de gestações durante a vida reprodutiva da fêmea. Sendo assim, torna-se fundamental a caracterização do ciclo estral, principalmente dos eventos relacionados à formação do corpo lúteo, uma glândula temporária cuja secreção de progesterona (P_4) é necessária para implantação e manutenção da prenhez. Já uma produção inadequada de P_4 é a principal causa de infertilidade e morte embrionária (WEBB et al. 2002).

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos através da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vasos pré-existentes (PLENDL, 2000). É um evento essencial, na formação e manutenção do CL permitindo que este desempenhe suas funções (YAN et al., 1998). Além disso, sabe-se que existe uma íntima relação entre vascularização deste órgão com o aumento do fluxo sanguíneo e a produção hormonal (KOBAYASHI et al., 2001; STORMSHAK et al., 1963).

A angiogênese no corpo lúteo é um fenômeno que depende do balanço entre fatores estimuladores e inibidores. Fatores polipeptídicos angiogênicos, como o Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e Fibroblast Growth Factor (FGF) produzidos pelo próprio CL foram demonstrados em várias espécies: bovina, canina, ovina e murina e humana. O VEGF é considerado o principal fator mitogênico das células endoteliais, induzindo à migração, diferenciação e proliferação destas células, participando também na maturação e estabilização dos vasos sanguíneos (FAVIER, 2001). A sua supressão inibe o desenvolvimento vascular luteínico, prejudicando conseqüentemente a atividade do CL, podendo resultar na infertilidade (FERRARA et al., 1998).

O conhecimento da regulação da atividade angiogênica cíclica no sistema reprodutor feminino, especificamente no CL, abre a possibilidade de estimular ou inibir estes mecanismos de controle, permitindo a interferência na função reprodutiva (Fraser et al., 2000) e o desenvolvimento de novas metodologias para regular a fertilidade (REYNOLDS; RENDER, 1998), favorecendo ainda um melhor entendimento de

doenças que dependam da angiogênese e a identificação de novos agentes terapêuticos (GERWINS et al., 2000).

Drost et al. (1983) iniciaram a múltipla ovulação e transferência de embriões em búfalas, no intuito de aprimorar a reprodução desta espécie. O sucesso alcançado foi limitado, já que as búfalas superovuladas frequentemente apresentavam baixas taxas de recuperação de embriões (BARUSELLI et al., 2000), fato este relacionado às altas concentrações plasmáticas de estradiol (BEG et al., 1997), capazes de afetar o funcionamento do infundíbulo e conseqüentemente o transporte de oócitos (MISRA et al. 1998). A hiperestimulação da função ovariana é uma técnica que conduz a muitas alterações. níveis altos de P_4 e estradiol (DOLDI et al., 1997), como também um aumento na invasão capilar do novo CL (MORBIDELLI et al., 1997).

O hormônio folículo estimulante (FSH), comumente utilizado no tratamento superovulatório, estimula a síntese de VEGF (REDMER; REYNOLDS, 1996). Este fator apresenta correlação positiva com os níveis séricos de progesterona e estradiol (DOLDI et al. 1997). Sendo assim, a caracterização da expressão deste fator em animais submetidos à superovulação se faz necessária para melhor caracterização do processo reprodutivo.

Embora existam muitos trabalhos referentes à expressão do VEGF, até o momento não se encontra, na literatura especializada nenhum estudo em relação aos búfalas. Diante deste fato, o presente trabalho se propõe a caracterizar a expressão do VEGF e seus receptores em estágios diferentes do ciclo estral desta espécie, buscando correlacionar os resultados com o desenvolvimento vascular no corpo

lúteo, bem como caracterizar a expressão deste mesmo fator em animais submetidos a superovulação comparando estes achados com os animais do grupo controle.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos específicos deste estudo, nos estágios de corpo hemorrágico, corpo lúteo maduro, corpo lúteo em regressão e corpo albicans do grupo não tratado e no 9º dia após a ovulação no grupo superovulado, foram:

- Determinar a fase do ciclo estral no qual os animais se encontravam através de microscopia de luz (coloração Hematoxilina-eosina) e através de imunohistoquímica;
- Quantificar a densidade vascular;
- Dosagem da concentração de progesterona sérica;
- Analisar se existe correlação entre a densidade vascular e a produção de progesterona;
- Avaliar a expressão do VEGF e seus receptores;
- Analisar, através de microscopia eletrônica de varredura, a microvascularização do CL de animais superovulados e do grupo não tratado na mesma fase do ciclo estral (9º dia p.o.)

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão a seguir, estão apresentadas informações referentes à anatomia e histologia e vascularização do corpo lúteo relacionadas às mudanças que ocorrem nesta glândula durante o ciclo estral. Em seguida, foram apresentados dados sobre a angiogênese luteínica e os fatores de crescimento envolvidos neste fenômeno. Além da expressão do VEGF e seus receptores durante o ciclo estral. Por último, estão relatadas as alterações que ocorrem no CL em resposta ao tratamento superovulatório.

3.1 Anatomia do corpo lúteo

Após a ruptura do folículo ovulatório, auxiliado pela força de contração das células musculares lisas da camada da teca (MOTTA et al. 1994), o corpo lúteo se desenvolve. O resultado do colapso folicular leva à formação de pregas macro e microscópicas que formam a parede interna do corpo lúteo e penetram em sua cavidade central. Estas pregas consistem de uma porção central de tecido estromático contendo grandes vasos altamente dilatados (HILLIER, 1994). Nesta fase, o corpo lúteo é denominado de corpo hemorrágico: é formado por uma cavidade central preenchida por fluído contendo hemácias e vários coágulos que podem ser vistos entre as pregas que se insinuam na cavidade (EL-SHEIKH; SAKLA; AMIN, 1967).

No estágio inicial, as células da granulosa que começaram a se desenvolver poucos dias antes da ovulação continuam o processo de hipertrofia e luteinização. A

camada da granulosa se torna mais espessa e seus estratos mais basais possuem células com núcleo e citoplasma consideravelmente aumentados. No entanto, nesta fase, a transformação luteínica ainda não ocorreu nos estratos mais internos: estes se apresentam aplainados, com aparência semelhante a um epitélio estratificado pavimentoso. As células da teca interna sofrem também luteinização e ocupam um volume maior que o anterior, enquanto os restos da teca externa permanecem inalterados. O ponto de ruptura do folículo é completamente cicatrizado, embora possa ser identificada uma desorientação das suas células e do epitélio germinativo cicatricial (BASSET, 1943).

O aumento de peso do CL é rápido, geralmente o período de crescimento ultrapassa a metade do ciclo estral. Na vaca, o peso do CL e a quantidade de progesterona sérica aumentam rapidamente entre os dias 3 e 12 do ciclo, permanecendo constantes até o 16º dia, quando se inicia a regressão dos vasos sanguíneos. Em búfalas, o volume médio do CL maduro aumenta cerca de 33 vezes em relação ao corpo hemorrágico, entre os dias 2 e 15 do ciclo (EL-SHEIKH; SAKLA; AMIN 1967). Na porca, esse aumento ocorre entre os dias 2 e 8, permanecendo relativamente constantes até o dia 15, quando então começa a regressão. O diâmetro do CL maduro é maior do que aquele do folículo ovulatório, com exceção da égua, na qual ele é menor (ERB et al., 1971). Na ovelha, que apresenta um ciclo estral de 21 dias, este processo atinge o máximo no dia 10 do ciclo, contando-se a partir da data da ovulação, começando a diminuir notavelmente no 12º dia e esta atividade secretória declina gradualmente até o 14º dia (WARBRITTON, 1984).

Caso não ocorra a fertilização, o CL regride, permitindo a maturação de outros grandes folículos ovarianos. À medida que essas células degeneram, todo o órgão diminui de tamanho, torna-se branco ou castanho-claro, passando a denominar-se *corpus albicans*. As alterações regressivas caracterizam-se por espessamento das paredes arteriais no CL, diminuição da granulação citoplasmática, arredondamento dos contornos celulares e vacuolização periférica das grandes células luteínicas. Depois de dois ou três ciclos, permanece apenas uma cicatriz visível do tecido conjuntivo. Remanescentes dos *corpora albicans* bovino persistem durante vários ciclos sucessivos. O corpo lúteo bovino do ciclo estral começa a regredir 14 a 15 dias depois do estro e seu tamanho pode ser reduzido pela metade dentro de 36 horas (KOOS, 1993). Em búfalas, na fase de regressão o peso do CL diminui um terço e o peso do *corpo albicans* equivale a um quarto do CL maduro (EL-SHEIKH; SAKLA; AMIN 1967).

3.1.1 Histologia do corpo lúteo

O corpo lúteo consiste de vários tipos celulares, sendo que as células produtoras de progesterona recebem a denominação de células luteínicas. As demais assumem um papel de suporte e sustentação e correspondem a 20% do volume do CL: são aquelas associadas com áreas vasculares (células endotéliais e perivasculares), macrófagos, células musculares lisas derivadas da teca folicular e fibroblastos (MOTTA et al. 1994).

Segundo Hillier (1994) na ovulação, o estrato granuloso torna-se vascularizado por vasos da teca interna. As células da granulosa aumentam, tornam-se luteínicas e

contribuem para população das grandes células luteínicas. Na maioria das espécies as células da teca interna também contribuem para formação do CL, como ocorre na vaca, as células do tipo fibroblasto da teca interna tornam-se arredondadas e juntamente com algumas células trabeculares luteínicas e paraluteínicas, ambas provavelmente com origem na teca externa, contribuem para a população das pequenas células luteínicas.

Koos (1998) afirma que a luteinização das células do folículo ovariano inclui mudanças morfológicas e bioquímicas e uma total reorganização destas células no CL. Após a onda pré-ovulatória de LH, a membrana basal localizada entre a teca interna e membrana granulosa começa a se romper. Vasos sanguíneos da teca interna invadem o espaço antral folicular sob influência dos fatores angiogênicos, desenvolvendo-se uma nova e mais rica estrutura vascular. Durante a luteinização há uma significativa hipertrofia e hiperplasia das células da teca. Com o progresso da luteinização, as células da teca estão mais livres e migram para o interior da cavidade folicular dispondo-se entre as células da granulosa luteinizadas. As células da granulosa acumulam retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e grânulos contendo glicogênio. Enquanto há uma significativa atividade mitótica nas células da teca, ocorre pouca ou nenhuma mitose em células da granulosa luteinizadas.

Ainda segundo Koss (1998) além das alterações morfológicas, ocorre durante a luteinização uma diferenciação funcional das células ovarianas. Em resposta à onda pré-ovulatória de LH, há um aumento da atividade enzimática de citocromo P450 (P450_{scc}). Estas alterações resultam no aumento da quebra dos ésteres de colesterol para formação da pregnenolona e subsequente conversão para

progesterona. Existem também mudanças na população de receptores para gonadotrofinas durante a luteinização. Receptores de FSH das células da granulosa usualmente desaparecem após a ovulação, provavelmente devido à internalização dos receptores ocupados e redução da expressão gênica dos mesmos. Depois da exposição à onda pré-ovulatória de LH, ocorre redução de seus receptores pelos mesmo motivos.

3.1.2 Modificações da anatomia do corpo lúteo durante o ciclo estral

O peso do corpo lúteo de Búfalas aumenta progressivamente de 605 mg no dia 3 para 1885 mg no dia 13, seguido de um declínio para 1292 mg no dia 18. A concentração de progesterona é de 34,5 µg/g no dia 5 aumentando para 62 µg/g no dia 13. A mais baixa concentração de 32 µg/g é observada no dia 18. (MEMON; BUCH; PATEL, 1994). Segundo El-sheikh; Sakla e Amin (1967) ocorre um aumento de quatro vezes no peso do CL maduro em relação ao corpo hemorrágico no intervalo de 13 dias.

Ireland; Murphee e Coulson (1980) classificaram e dividiram o CL de bovinos em quatro estágios, de acordo com aparência macroscópica, e os correlacionaram com a concentração de progesterona no sangue periférico. O estágio I (1 a 4 dias) inclui o intervalo entre a ovulação e o início da formação do epitélio sobre o ponto de ruptura folicular formando o ápice de um novo corpo lúteo marcando o início do estágio II. Durante o estágio II (5-10 dias), o CL está completamente formado com vascularização visível ao redor da periferia; quando este é dissecado, o ápice é vermelho ou marrom, enquanto o resto é laranja ou amarelo. O estágio III (11-17

dias) começa quando a coloração vermelha e ou marrom desaparecem deixando o CL inteiramente laranja luminoso ou amarelo. No final deste estágio, a vascularização é visível sobre o ápice do CL. Durante o estágio IV (18-20 dias), o ovário usualmente contém ao menos um folículo grande e um corpo lúteo em regressão e não existe mais uma vascularização evidente na superfície. A concentração de progesterona em ng/ml e o peso dos CLL em gramas, durante os estágios do ciclo estral foram respectivamente: no estágio I (1 a 4 dias) 1,5 e 0,8; estágio II (5-10 dias) 6,9 e 3,4; no estágio III (11-17 dias) 7,8 e 3,6 e estágio IV (18-20 dias) 1,2 e 1,3.

Durante o ciclo estral em búfalas ocorrem mudanças nas células luteínicas: sua área aumenta cerca de três vezes entre a fase de corpo hemorrágico e corpo lúteo em regressão. Ao mesmo tempo, os amplos espaços intercelulares do corpo hemorrágico diminuem no corpo lúteo maduro, principalmente devido ao aumento do volume celular e voltam a aumentar grandemente na fase de regressão devido à degeneração das células luteínicas. Estas mudanças no volume do citoplasma correspondem a uma elevação do número de grânulos citoplasmáticos e ao aumento do volume nuclear, que coincide com a atividade das células luteínicas nas diversas fases do ciclo. No *corpo albicans* observam-se os núcleos picnóticos e as células cessam de secretar progesterona. Quanto ao número destas células, ocorre um aumento de 14 vezes do estágio inicial até o corpo lúteo maduro, com uma redução de seis vezes no corpo lúteo em regressão e finalmente estas células desaparecem completamente no *corpo albicans* (EL-SHEIKH; SAKLA; AMIN, 1967).

3.2 Vascularização do corpo lúteo

De acordo com König e Amselgruber (1986) três diferentes categorias de artérias podem ser encontradas no CL maduro: artérias da cápsula surgem de uma única artéria em espiral, encontrada ao redor do corpo lúteo. Elas originam as artérias septais que acompanham a estrutura lobular do CL. Existem também as artérias parenquimatosas que formam uma densa rede capilar. Comparativamente aos de outras glândulas endócrinas, os capilares do CL são fenestrados. Aproximadamente 75% das células no CL maduro são de origem vascular. Este órgão recebe um alto suprimento sanguíneo por grama de tecido como nenhum outro órgão.

Murakami et al. (1988) ao descreverem o padrão vascular no corpo lúteo de ratas, encontraram este órgão recebendo dois ou mais vasos aferentes oriundos das artérias corticais do ovário e emitindo dois ou mais vasos eferentes contínuos com as veias corticais. Geralmente os vasos aferentes e eferentes se dividem na superfície do corpo lúteo em vários ramos, os quais se subdividem formando ramos superficiais e profundos. Esta separação permite um fluxo sanguíneo mais homogêneo na glândula. Os superficiais correm junto à camada superficial do corpo lúteo e os profundos na área central. No desenvolvimento do corpo lúteo, os ramos profundos eferentes são bem desenvolvidos e seus segmentos ao redor da área avascular no centro da glândula adquirem a forma de uma roseta, juntamente com os segmentos terminais dos ramos profundos dos vasos aferentes que também se dispõem ao redor desta área central; porém não foram descritas anastomoses arterio-venosas no corpo lúteo de ratas.

Ainda segundo Murakami et al. (1988) nos ovários, os vasos aferentes, capilares e vasos eferentes, constituem o sistema microcirculatório e correspondem a unidades independentes, completamente separadas no estroma ovariano, folículo e corpo lúteo. Esta vascularização independente explica a diferença no fluxo sanguíneo no parênquima ovariano, o qual na ovelha nos dias 14, 15 e 16 do ciclo estral, apresentaram uma taxa de fluxo sanguíneo (em ml por mim em gramas de tecido) de 1122, 708 e 116 para corpo lúteo; 157, 258 e 140 para o estroma; 673, 742 e 1096 para folículos, respectivamente (BRUCE; MOOR 1976), observando-se que entre as duas fases do ciclo estral, a luteínica e a folicular, o fluxo ovariano é maior na fase luteínica (VARGA; GREENWALD, 1979). Durante esta fase, o aporte sanguíneo é maior no corpo lúteo (FORSMAN; McCORMACK, 1992) pois sua presença funcional aumenta consideravelmente a irrigação sanguínea do ovário; no entanto, durante a regressão, este fluxo declina bruscamente (NISWENDER et al., 1976).

3.2.1 Modificações na irrigação sanguínea do corpo lúteo

Corpo hemorrágico: No corpo lúteo de ratas, há um progressivo desenvolvimento vascular 10 a 16 horas após a ovulação: dilatação dos capilares que começam a penetrar na granulosa luteinizada e rápida transformação dos capilares que adquirem um padrão sinusoidal e estabelecem inúmeras anastomoses laterais entre si. Surgem brotos de capilares da teca externa, os quais crescem para suprir as células da teca luteinizadas (BASSET, 1943).

Corpo lúteo maduro: Na fase luteínica média, o corpo lúteo já possui forma esférica a ovalada e os vasos sanguíneos formam uma rede complexa, atingindo o pico do desenvolvimento. A rede capilar é altamente sinusoidal, com um capilar cercado por três a seis células luteínicas. Ao microscópio eletrônico de varredura, observam-se os capilares com inúmeras projeções laterais, que correspondem ao vazamento da resina pelas grandes fenestrações nestes vasos, comprovando a alta permeabilidade destes vasos (MURAKAMI et al. 1988). Neste estágio, o fluxo sanguíneo no órgão consolida-se a partir de artérias superficiais altamente calibrosas das quais partem ramos superficiais restritos em grande parte à cápsula fibromuscular. Os ramos superficiais, por sua vez, emitem curtos ramos direcionados às camadas mais externas de células luteinizadas, onde se capilarizam e tornam-se altamente fenestrados, enquanto os ramos profundos destas artérias penetram na glândula caminhando distâncias variáveis. As veias se formam a partir dos capilares, e assim como os vasos aferentes, dividem-se em ramo superficial e profundo. O sistema superficial é composto por vasos curtos e calibrosos que recebem sangue dos sinusóides superficiais e conectam-se com as calibrosas veias da cápsula ovariana. Os canais venosos profundos são maiores e recebem sangue de regiões profundas, frequentemente uma única veia profunda de grande calibre surge a partir do plexo venoso central e segue para a superfície, emergindo abruptamente na cápsula luteínica drenando o sangue para as veias superficiais do ovário (BASSET, 1943).

Corpo lúteo em regressão: O padrão vascular nesta fase é semelhante ao do corpo lúteo maduro, embora duas diferenças relacionadas aos vasos sanguíneos sejam observadas: os capilares são escassos, não apresentam mais um diâmetro

uniforme, alguns permanecem largos como na fase anterior, porém outros se mostram curtos e pouco calibrosos (GAYTAN et al. 1999 e FORSMAN; McCORMACK, 1992). A rede capilar assume a aparência de um denso nó de sinusóides, contínuos com um seio central que drena para uma calibrosa vênula. Estas observações sugerem a ocorrência de um fechamento e reabsorção da rede vascular promovendo uma rápida degeneração das células luteínicas (BASSET, 1943). Outra característica do corpo lúteo em regressão é a presença de um circuito fechado dos capilares arteriais e venosos diminuindo o fluxo nesta fase (KARDON; KESSEL, 1979 e GAYTAN et al. 1999).

Corpo albicans: Nesta fase, segundo Murakami et al. (1988) existem poucos vasos sanguíneos, porém alguns autores chegam a afirmar que o *corpo albicans* é avascular. Também não são encontradas células luteínicas neste estágio (PLENDL, 2000 e FORSMAN; McCORMACK, 1992).

De uma maneira geral pode-se afirmar que o fluxo sanguíneo arterial para o ovário varia em proporção à atividade luteínica. As modificações hemodinâmicas são importantes no controle da função e duração do corpo lúteo. Assim, modificações no fluxo sanguíneo precedem o declínio da secreção de progesterona, enquanto que a restrição do fluxo sanguíneo ovariano causa prematura regressão do CL. Por ocasião da luteólise, em ovelhas, ocorre uma redução no fluxo sanguíneo ovariano, assim como um aumento na passagem de sangue entre arteríolas e vênulas dentro do ovário (NISWENDER et al., 1976). Estas anastomoses também foram descritas por Murakami et al. (1988) no corpo lúteo em regressão de ratas e em hamster por Forsman e McCormack (1992).

3.3 Angiogênese e vasculogênese

O desenvolvimento e crescimento de células e tecidos dependem de um suprimento sanguíneo adequado. Dois processos morfogenéticos que correspondem a uma parte vital no desenvolvimento embrionário e fetal são responsáveis pela formação de vasos sanguíneos: um deles é a vasculogênese, que corresponde à formação dos vasos sanguíneos, por meio da diferenciação de células precursoras de origem mesodérmica. O segundo é a angiogênese, definida como a formação de novos vasos sanguíneos através da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vasos pré-existentes. A vasculogênese é principalmente encontrada no período pré-natal. No adulto, a angiogênese é relatada particularmente em situações patológicas como tumores em crescimento, metástases e no processo de cicatrização. A angiogênese fisiológica, no adulto, ocorre principalmente no sistema reprodutor feminino, mais precisamente no útero, placenta, ovário e glândulas mamárias durante a gestação e nos ovários e no útero a cada novo ciclo reprodutivo (PLENDL, 2000).

3.3.1 Angiogênese no ovário

Angiogênese, ou formação de novos vasos sanguíneos, ocorre no ovário durante o desenvolvimento folicular e formação do corpo lúteo; no endométrio uterino ocorre durante a fase proliferativa do ciclo estral e menstrual. Aparte estes dois locais do corpo, novos vasos sanguíneos não crescem exceto em resposta a injúria tecidual ou algumas doenças. Muitas doenças do sistema reprodutor feminino, incluindo câncer, endometrioses e prolactinomas, envolvem angiogênese. A inibição da

angiogênese pode ser uma valiosa terapia para o tratamento destas condições e para muitas outras doenças. Neste contexto o ovário aparece como modelo ideal para estudos relacionados a este fenômeno, uma vez que o crescimento de vasos sanguíneos ocorre continuada e ciclicamente durante toda a vida reprodutiva (FRANSER, 2000).

Durante o desenvolvimento do folículo, uma rica rede capilar progressivamente se desenvolve na camada tecal ao redor da camada granulosa avascular. Após a ovulação, os vasos da teca proliferam e invadem a camada granulosa. Estes novos vasos suprem as células do nascente corpo lúteo com os nutrientes necessários para o seu crescimento e biossíntese, tornando possível a comunicação endócrina entre o ovário, hipotálamo-hipófise e útero, necessária para coordenação da ovulação, fertilização e implantação (KOOS, 1998).

Após a ovulação e desintegração da lâmina basal, os vasos da teca invadem a camada granulosa para formar a rede vascular luteínica. Durante este período, a taxa de proliferação das células endoteliais (a porcentagem de células endoteliais que incorporaram timidina marcada por unidade de tempo) no desenvolvimento dos CLL nas ratas é de 36% e de 29% em 24 e 48 horas, comparada a 3% e 14% em vários tumores na mesma espécie e de 0,04% e 0,67% em tecidos normais após o mesmo tempo (HOBSON; DENEKAMP, 1984). Como resultado desta proliferação, as células endoteliais constituem o tipo celular mais numeroso no CL. Em CL de ratas, por exemplo, elas apresentam a proporção 5:1 em relação às células luteínicas no dia 22 da prenhez (KOOS, 1998).

O corpo lúteo recebe um dos maiores aportes de sangue, por grama de tecido, de todo organismo (ZHENG et al., 1993). A taxa do fluxo sanguíneo luteínico e folicular estão entre as mais altas do corpo sendo de 5 a 10 ml/min/g e 10 a 30 ml/min/g respectivamente enquanto o fluxo renal é de aproximadamente 4 a 8 ml/min/g.

Nos ovários, cada fase específica do ciclo estral é acompanhada de mudanças radicais no leito vascular. A transição do folículo para o corpo lúteo e a subsequente luteólise resultam em crescimento e regressão dos vasos sanguíneos. Essa angiogênese é regulada por fatores de crescimento e citocinas, além de fatores inibitórios da angiogênese, o que a diferencia da angiogênese patológica, que não apresenta uma regulação tão sutil (NICOSIA; VILLASCHI, 1999).

De acordo com Plendl (2000) uma rede vascular se desenvolve dentro do corpo lúteo para assegurar a função deste órgão, que funciona como uma glândula endócrina transitória e desempenha papel essencial na manutenção da gestação. Em ovelhas foi observado que capilares se desenvolvem 36 horas depois do pico do hormônio luteinizante (LH) (CAVENDER et al., 1988); em ratas, os capilares se formam 12 horas depois da ovulação (MEYER; MACGEACHIE, 1988).

3.4 Fatores pro-angiogênicos e anti-angiogênicos no ovário

A angiogênese é resultado da proliferação, migração e maturação das células endoteliais, sendo resultado de um balanço entre fatores solúveis promotores e inibitórios deste processo (FAVIER, 2001), dentre os quais os mais importantes promotores são alguns membros da família dos FGFs (fibroblast growth factors) e

outros da família dos VEGFs (vascular endothelial growth factors). Sabe-se que estes fatores são encontrados nas células da teca, fluído folicular, células da granulosa, células luteinizadas e também foi demonstrada sua presença em células do cumulus oophorus (PHILLIPS et al., 1990), sendo responsáveis pelas mudanças vasculares que acompanham a ovulação (PLENDL, 2000). Segundo Kamat et al. (1995) a expressão do VEGF nas células da granulosa e da teca nos folículos aumenta promovendo uma maior permeabilidade dos vasos sanguíneos da teca um pouco antes da ovulação. Estes fatores são controlados por regulação endócrina, parácrina e autócrina, bem como pelo próprio metabolismo celular relacionado ao teor de oxigênio (HAZZARD; STOUFFER, 1998).

VEGFs controlam a vasculogênese e a angiogênese e também são chamados de fator de permeabilidade vascular (VPF) por promoverem a vasodilatação e um aumento da permeabilidade capilar. São considerados mitogênicos específicos das células endoteliais (FAVIER; CORVOL, 2001) e agem através de receptores associados à tirosina quinase. VEGF é essencial para a angiogênese luteínica. Já foi identificado no tecido conjuntivo luteínico, células parenquimatosas e perivasculares, particularmente os pericitos. Estes produzem VEGF in vitro e possuem provavelmente uma função moduladora da vascularização durante a angiogênese (AMSELGRUBER et al., 1999). A expressão luteínica de VEGF é máxima no início da fase luteínica e diminui acentuadamente no início da luteólise, coincidindo com a vascularização luteínica (FERRARA et al., 1998).

Até o momento, pouco se sabe sobre o controle negativo da angiogênese no ovário e corpo lúteo. Uma vez que a angiogênese tem início com a degradação da

membrana basal por proteinases e metaloproteinases, supõe-se que um fator anti-angiogênico em potencial seja um fator inibidor da metaloproteinase. Conseqüentemente, inibidores das proteases são considerados anti-angiogênicos por impedirem a degradação da matriz protéica, mantendo assim a integridade do endotélio (AUERBACH; AUERBACH, 1994).

De acordo com Stouffer et al. (2001) a administração de TNP-470 ou fumagilina, um potente inibidor da proliferação das células endoteliais, a camundongos resultou em poucos e pequenos corpos lúteos quando comparados ao grupo controle. Franser et al. (1999) utilizando esta mesma droga em macacas durante a fase folicular final obtiveram uma redução nos níveis de progesterona na fase luteínica média. Estes dados sugerem que fatores anti-angiogênicos interfiram no desenvolvimento vascular, influenciando eventos pré-ovulatórios e subseqüentemente a função luteínica.

3.4.1 Vascular endothelial growth factor (VEGF) e seus receptores

O VEGF é altamente mitogênico, específico para células endoteliais (KAMAT et al., 1995). No ser humano, já foram identificados cinco isoformas independentes, resultantes de um único gene, que diferem entre si pelo peso molecular (STACKER; ACHEN, 1999). A expressão de VEGF é potencializada em resposta à hipóxia, atividade de oncogenes e variação de citocinas (PLATE; WARNKE, 1997). VEGF induz a proliferação de células endoteliais, maturação e migração, inibindo também a apoptose. Induz a angiogênese bem como a permeabilização de vasos sanguíneos e sua atividade corresponde à parte central na regulação da vasculogênese. A

expressão anormal de VEGF contribui para formação de tumores sólidos por estimular a angiogênese tumoral, sendo também relacionada à etiologia de várias doenças caracterizadas pela angiogênese anormal. Conseqüentemente, a inibição do VEGF leva à interrupção do desenvolvimento de uma variedade de tumores (NEUFELD, 1999 e CHAPEIE et al., 1997).

A supressão do VEGF acarreta inibição do desenvolvimento do corpo lúteo e da liberação de progesterona. Também provoca áreas de necrose e isquemia no tecido luteínico, alterando o controle da fertilidade e o tratamento de desordens ovarianas caracterizadas por hipervascularização e hiperplasia (FRANSER et al., 2000; FERRARA et al., 1998).

Dois receptores para o VEGF, pertencentes à família de receptores tirosina-quinase foram identificados e clonados: receptor 1 para VEGF (VEGFR-1 ou Flt-1- Fms-like-tyrosine kinase receptor 1) e receptor 2 para VEGF (VEGFR-2 ou KDR- Kinase insert Domain containing Receptor). O VEGFR-3 também já foi descrito em células endoteliais de vasos linfáticos (FERRARA; DAVIS-SMYTH; 1997; STACKER; ACHEN, 1999) e em células do sinciciotroflobástico da placenta (HELSKE et al., 2001). Flt-1 e KDR são expressos em células endoteliais, mas alguns outros tipos podem expressar um ou ambos os tipos de receptores. Flt-1 é expresso também em células trofoblásticas, monócitos e células mesangiais renais. KDR por sua vez também é expresso em células tronco hematopoiéticas, megacariócitos e células retiniais progenitoras. Células luteínicas expressam os dois receptores ao longo do ciclo estral (SUGINO et al., 2000) sugerindo que este fator atue de forma parácrina no CL, regulando a produção destas células. Ambos os receptores podem traduzir

sinais de outros fatores pertencentes à família do VEGF, mas apenas as isoformas do VEGF são capazes de se ligar aos dois receptores (LEE et al., 1996). São receptores glicosilados, sendo que o KDR só é capaz de se autofosforilar em resposta ao VEGF se estiver glicosilado (NEUFELD et al., 1999).

A interação do VEGF com seus receptores ocorre através de dois domínios distintos da molécula de VEGF. Esses domínios de ligação estão localizados em terminações opostas do monômero de VEGF. Esse arranjo espacial está de acordo com observações de que mutações que atinjam o sítio de ligação do VEGFR-2 tem efeito mínimo sobre o sítio de ligação com o VEGFR-1 e vice-versa (KEYT et al., 1996).

A ativação do KDR pelo VEGF em células desprovidas de Flt-1 resulta em resposta mitogênica, enquanto que ativação do Flt-1 em células desprovidas de KDR não induz a proliferação. No entanto, a ativação do Flt-1 pelo VEGF induz migração celular, resposta que também é obtida a partir da ativação do KDR pelo VEGF (ZIMMERMANN et al., 2001; KLAGSBRUN; D'AMORE, 1996; YOSHIDA et al., 1996 e FERRARA et al. 1997). Essas observações indicam que a cascata de transdução de sinal induzido por cada um dos receptores é diferente de alguma forma e as bases dessas diferenças não foram esclarecidas até o momento.

Zimmermann et al. (2001), ao realizarem um experimento em ratas imaturas tratadas com Gonodotrofina coriônica equina (PMSG) que receberam em seguida injeção de um anticorpo monoclonal contra o KDR intraperitonealmente, em dose única ou doses múltiplas, demonstraram que anti-KDR apresentou um potente efeito inibitório sobre a angiogênese luteínica. Os corpos lúteos destes animais apresentaram

menor tamanho, demonstrando tecidos necrosados e quase completa ausência de vasos sanguíneos. A densidade vascular observada foi de $4 \pm 1,1$ vasos/mm² contra 48 ± 6 vasos/mm² nos animais superovulados, demonstrando que a ação de VEGF através do KDR desempenha papel fundamental na angiogênese luteínica. O mecanismo de ação do VEGF através do KDR leva portanto ao aumento da atividade mitogênica das células endoteliais, que é essencial para angiogênese luteínica. Geva e Jaffe (2000) afirmam que a utilização de outros receptores para o VEGF (Flt-1 ou Flt-4) não é capaz de compensar a perda da função desempenhada pelo KDR.

Berisha (2000) afirma que todos os componentes do sistema VEGF foram encontrados no CL bovino durante o ciclo estral e prenhez. A concentração da proteína VEGF no CL foi significativamente mais alta na fase inicial, acompanhada de um decréscimo na fase luteínica final, especialmente depois da regressão do CL. Essa alta concentração inicial de VEGF coincide com a vascularização do tecido luteínico. Redmer et al. (1996) demonstraram em ovinos três variantes do VEGF a partir do tecido luteínico (VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ e VEGF₁₈₈), mas não correlacionaram a expressão dessas isoformas com o ciclo estral.

Boonyaprakob et al. (2003) estudaram a expressão do VEGF e seus receptores no corpo lúteo de porcas durante a fase luteínica nos dias 4, 7, 10, 13 e 15 logo após o estro. Encontraram sinais de expressão constantes para o VEGF, embora a expressão do VEGFR-1 (Flt-1) tenha sido mais baixa no dia 4, aumentado no dia 7 e apresentado-se mais alta nos dias subsequentes. Por outro lado, o VEGFR-2, permaneceu sem mudanças do 4º ao 13º dia, porém um decréscimo foi observado

no 15º dia. A hibridização in situ revelou que o RNAm do VEGF foi localizado predominantemente nas células luteínicas maiores, já VEGFR-1 e VEGFR-2 foram localizados nas células menores. Estes dados sugerem que o sistema VEGF esteja envolvido na regulação da angiogênese luteínica, e que, mesmo não ocorrendo mudanças na expressão do VEGF durante a fase luteínica, variações na expressão dos receptores indicam que a regulação diferencial desta expressão é a chave para o controle do crescimento vascular nas diferentes fases de desenvolvimento e maturação do corpo lúteo de porcas.

A expressão do VEGF em corpo lúteo de cabras foi descrita por Kawate et al. (2003). Neste estudo, um grupo recebeu um potente antagonista do GnRH, que comprovadamente inibe a liberação de LH e o outro grupo, controle, não recebeu nenhum tratamento. Animais de ambos os grupos tiveram os ovários coletados nos dias 0 (dia da ovulação), dia 4, 8 e 14. Através de RT-PCR para RNAm do VEGF foram encontradas duas isoformas do VEGF no corpo lúteo de cabras: uma curta e uma longa, correspondentes ao VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅, respectivamente. No grupo controle, os níveis de RNAm do VEGF₁₆₅ aumentaram significativamente do dia 0 ao 8, enquanto o RNAm do VEGF₁₂₁ permaneceu constante. A expressão de KDR/Flk-1 mostrou-se elevada entre os dias 0 e 8; já o RNAm do Flt-1 aumentou entre os dias 8 e 14. Estes resultados sugerem que o aumento na expressão do VEGF₁₆₅ e KDR/Flk-1 durante o desenvolvimento luteínico possa estar associado à elevação da taxa de angiogênese e que o aumento do RNAm do VEGF₁₂₁ e do Flt-1 durante a manutenção do corpo lúteo esteja relacionado a uma atividade não angiogênica, como controle da permeabilidade vascular, por exemplo. No grupo tratado com o antagonista do GnRH, os níveis de todos os RNAs foram semelhantes aos

encontrados para o grupo controle. Isso indica que mudanças nos RNAs de VEGF₁₆₅ e KDR durante o desenvolvimento do corpo lúteo são provavelmente independentes da regulação por LH.

3.5 Hormônios ovarianos e VEGF

A expressão do VEGF, nas células da granulosa e células luteínicas do ovário, bem como nas células endometriais, está restrita e é detectável apenas em alguns estágios do ciclo ovariano ou endometrial. Estes achados sugerem que a ativação do VEGF sofra regulação hormonal. Além disso, estas células são produtoras e/ou responsivas aos hormônios esteróides. Todas estas células que expressam o VEGF produzem hormônios esteróides em resposta ao hormônio luteotrófico. Shweiki et al. (1993) encontraram uma correlação e co-localização do RNAm do VEGF e o RNAm que codifica a enzima esteroidogênica citocromo P450 no corpo lúteo. É possível que a síntese do VEGF também seja induzida pelo LH ou hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) do mesmo modo que estes hormônios atuam induzindo a transcrição dos RNAs que codificam enzimas esteroidogênicas.

Stouffer et al. (2001) e Charnock-Jones et al. (2000) também relatam que as gonodotrofinas promovem a produção de VEGF, mas os hormônios esteróides sintetizados em resposta a elas, no folículo maduro e no corpo lúteo, também influenciam a síntese de VEGF. Assim sendo, estes tecidos podem ser considerados tanto locais de síntese quanto de ação dos esteróides. Entretanto, foi demonstrado que o bloqueio na síntese de hormônios esteróides (via inibição da 3 β -hidroxiesteróide dehidrogenase) não altera a produção de VEGF. Por outro lado

Martinez-Chequer et al. (2001) afirmam que o LH sozinho é capaz de promover a síntese deste fator.

Christenson e Stouffer (1997), investigando o efeito do FSH, LH e hCG de maneira dose-dependente em células da granulosa não luteinizadas de macacas encontraram altos níveis da produção de VEGF e um acréscimo de 50 vezes em relação ao grupo controle. Ravindranath et al. (1992) ao utilizarem um antagonista do GnRH observaram que a ausência de LH conduziu à redução da expressão de VEGF no corpo lúteo de macacas, apontando o LH como o maior regulador da angiogênese no ovário (STOUFFER et al. 2001).

Quintana et al. (2001) afirmam que células da granulosa geram uma maior produção de VEGF em resposta ao FSH, LH, gonodotrofina coriônica humana (hCG) e à hipóxia. Este aumento na síntese de VEGF é fundamental para a conversão do folículo pré-ovulatório avascular em corpo lúteo, um órgão altamente vascularizado.

Entretanto, foi verificado em cultura de células da granulosa de bovinos (VERNON; SPIDER, 1994) e de ratos (YAN et al., 1993) que o FSH inibe a secreção de progesterona. Este mesmo efeito foi descrito para células da granulosa porcinas quando tratadas com bFGF (CHANNING et al. 1983; BISWAS et al. 1988).

Schams et al. (1993) demonstraram um aumento da síntese de progesterona pelas células luteínicas bovinas, após incubação destas células com bFGF nas fases luteínicas inicial e média, comprovando o efeito direto deste fator na síntese de progesterona. Porém, o mecanismo através do qual esta estimulação ocorre ainda

não foi esclarecido: é provável que este fator atue junto às enzimas esteroidogênicas regulando a produção hormonal de maneira autócrina e/ou parácrina.

Soares; Guo e Schmitt (2003) afirmam que estrógenos promovem angiogênese para remodelagem dos tecidos. São indicativos deste papel a presença de receptores para estes esteróides nas células endoteliais, que apresentam proliferação e migração quando sob ação estrogênica (LOSORDO; ISNER, 2000) e nas células musculares lisas constituintes da parede dos vasos sanguíneos, além da presença de aromatase nas células endoteliais. Os mesmos autores também descrevem o papel do estrógeno na homeostase das células endoteliais, protegendo-as da apoptose através da inibição da caspase 3, protease que atua na cascata da apoptose. Para Losordo e Inser (2000) o papel angiogênico do estradiol também está relacionado ao VEGF e seus receptores que aumentam sua expressão em resposta a este hormônio. Estes autores mencionam também um aumento da expressão do VEGF em células musculares lisas da parede dos vasos sanguíneos em resposta ao tratamento com estradiol.

3.6 Densidade vascular e os fatores angiogênicos

Gaytan et al. (1999) ao estudarem a densidade vascular do corpo lúteo de mulheres durante o ciclo estral observaram uma abundante atividade proliferativa das células vasculares e luteínicas na fase inicial, marcada pelo crescimento de capilares e luteinização das células da granulosa resultando no aumento de 61% da densidade vascular na fase luteínica inicial, acompanhado de aumento de 52% no volume das células da granulosa luteinizadas. Um decréscimo de 53% na densidade vascular

entre as fases de corpo lúteo maduro e corpo lúteo em regressão também foi observado, acompanhado por uma redução de 69% no volume médio das células da granulosa luteinizadas. Lei et al. (1991), bem como Zheng; Redmer e Reynolds (1993) descrevem esta mudança no corpo lúteo de vacas, o que está de acordo com a baixa atividade proliferativa das células vasculares durante a regressão (PLENDL 2000). A diminuição da proliferação somada à redução no número de células luteínicas promove uma diminuição na concentração plasmática de progesterona (GAYTAN et al. 1999). Niswender et al. e Nett et al. afirmaram no ano de 1976 que os vasos sanguíneos são locais de ação dos hormônios luteolíticos, uma vez que o tratamento de ovelhas com PGF2 α promoveu uma redução do fluxo sanguíneo luteínico. Além disso, esta substância induz a liberação de ocitocina pelas células luteínicas o que resulta numa vasoconstrição e isquemia sendo também responsável pelo decréscimo da concentração de progesterona plasmática.

Quanto à correlação dos fatores angiogênicos mencionados e a densidade vascular, o trabalho desenvolvido por Asahara et al. (1995) menciona uma correlação positiva ao determinar a densidade capilar nos músculos semimembranoso e sartório de coelhos tratados com VEGF e bFGF, em conjunto e separadamente. Foi observado um aumento significativo da densidade capilar dos coelhos que receberam os fatores em relação ao grupo controle.

3.7 Superovulação

A indução da superovulação é um método amplamente utilizado para aumentar o número de embriões viáveis ou transferíveis visando a multiplicação de animais com

alto valor zootécnico. É uma técnica realizada através da administração de gonadotrofinas exógenas, que estimulam o crescimento e a múltipla ovulação dos folículos antrais (ADAMS, 1994).

Moor et al. (1984) sustentam fortemente o conceito de que as gonadotrofinas exógenas reduzem o processo de atresia nos animais superovulados. Uma redução da atresia nas classes de folículos de 1,7 mm de diâmetro, aumenta diretamente o número de folículos capazes de responder plenamente à gonadotrofina; folículos abaixo deste tamanho, seriam incapazes de atingir o tamanho pré-ovulatório nos 4 a 5 dias de tratamento com gonadotrofina e responder à onda de LH.

O FSH é uma gonadotrofina hipofisária de origem porcina ou eqüina, semelhante à Gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (MOOR et al., 1984), que é usado comumente na indução do crescimento folicular e na superovulação, produzindo um menor número de folículos anovulatórios quando comparado ao eCG (CARVALHO, 1995).

MacClaire et al. (1994) e Shweiki et al. (1993) demonstraram que em primatas e ratos, com ovários hiperestimulados ocorre uma elevação dos níveis de VEGF, predominantemente após uma onda de hormônio luteinizante (LH), sugerindo então o uso de inibidores desta onda para que ocorra decréscimo nos níveis de VEGF, em patologias como: ovário policístico. Diminuindo assim os efeitos patológicos do aumento da síntese deste fator, como por exemplo, evita aumento da permeabilidade vascular em resposta a este fator que provocaria ascite neste pacientes.

De acordo com Doldi et al. (1997) o VEGF assume importante papel na regulação do desenvolvimento vascular durante o desenvolvimento folicular e diferenciação luteínica. Existe uma correlação positiva linear entre RNAm do VEGF e os níveis séricos de progesterona e estradiol, sendo a expressão do VEGF em células da granulosa maior em pacientes com maior número de óócitos e alta taxa de fertilização. O VEGF produzido nas células luteínicas está muito bem localizado promovendo um aumento da permeabilidade vascular da teca que ocorre pouco tempo depois da ovulação. Além do mais, o VEGF contribui também com a angiogênese e acúmulo de tecido conjuntivo que acompanha o corpo lúteo e formação do *corpo albicans*. O elevado número de capilares no folículo e no CL devido à secreção de VEGF das células da granulosa e células luteínicas induz um aumento dos níveis de esteróides gonadais reforçando a correlação positiva existente entre a expressão do VEGF e a produção de estradiol e progesterona.

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização deste trabalho foram utilizados ovários de 30 fêmeas adultas da espécie bubalina (*Bubalus Bubalis*), divididas em 5 grupos de 6 animais. Estes animais tiveram o corpo lúteo extirpado em 4 fases, a saber, **grupo 1**: corpo hemorrágico (2º dia após a ovulação), **grupo 2**: corpo lúteo na fase luteínica média (9º dia p.o.), **grupo 3**: corpo lúteo em regressão (18º dia p.o.) e **grupo 4**: *corpo albicans* (26º dia p.o.). Destes animais, 6 foram obtidos no abatedouro Frivale na cidade de Cajati- SP e 18 no abatedouro Argus na cidade de Curitiba-PR. O **quinto grupo** consistiu de animais superovulados, que foram abatidos no 9º dia do ciclo na cidade de Piracicaba.

Dos seis animais de cada grupo, três tiveram os CLL destinados à realização de imunohistoquímica e quantificação da densidade vascular e os demais tiveram os ovários preparados para o estudo da microvascularização através de microscopia eletrônica de varredura.

4.1 Determinação da fase do ciclo estral no grupo controle

Para estimar a fase do ciclo estral em que se encontravam os animais utilizados neste experimento foi realizado exame macroscópico do útero e ovários, exame microscópico dos corpos lúteos, dosagem de progesterona sérica e imunohistoquímica para lecitina, como descritos a seguir:

4.1.1 Exame macroscópico do útero e ovário

O trato urogenital de cada animal foi submetido a um exame detalhado, observando-se coloração, tamanho, consistência do muco, presença de fetos no útero e verificando-se a presença de folículos e corpos lúteos nos ovários.

4.1.2 Exame microscópico dos corpos lúteos

A classificação histológica dos CLL foi realizada através do exame microscópico dos cortes de 5µm preparados em micrótomo Leica® (RM2065) e corados com hematoxilina-eosina. Os critérios utilizados foram: invasão de tecido conjuntivo (que aumenta progressivamente até a luteólise e posterior formação do corpo albicans), tamanho das células luteínicas e grau de vacuolização (indicativo do acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma) mais intenso nas células do CL em fase altamente secretória (9-14 dias após a ovulação), tamanho do espaço intersticial e número de fibroblastos.

4.1.3 Dosagem de progesterona sérica

Realizou-se punção da veia jugular de 45 búfalas utilizando agulha 40/16 descartável, em tubos a vácuo (Vacuntainer®) a fim de se obter sangue periférico para dosagem de progesterona sérica. Destes animais foram utilizados apenas aqueles cuja concentração de progesterona correspondia aos dias: 2, 9, 17 e 26 após a ovulação (6 animais por grupo) e os animais superovulados no 9º dia p.o.

O sangue periférico obtido nas coletas foi centrifugado para obtenção de amostras de soro que foram mantidas sob congelamento (-20°C) até sua utilização. Antes do início das análises, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Essas dosagens foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo método de radioimunoensaio (RIE), sendo utilizados “Kits” comerciais de RIE em fase sólida (Coat-a-Count[®] Progesterone, Diagnostic Producte Co).

Foi preparado o seguinte protocolo de trabalho para análise de progesterona: dois tubos de ensaio de polipropileno (12mm x 75 mm) sem anticorpos foram destinados a contagem total do iodo. Doze tubos serviram para confecção da curva padrão e contiveram concentrações crescentes e conhecidas de progesterona (A) 0 ng/ml (B) 0,1 ng/ml (C) 0,5 ng/ml (D) 2,0 ng/ml (E) 10,0 ng/ml (F) 20,0 ng/ml. Por último os tubos contendo as amostras de soro a serem dosadas. Todas amostras foram dosadas em duplicata.

Foi adicionado 1,0 ml de progesterona marcada com I^{125} a cada um dos tubos e agitou-se suavemente cada tubo em um vórtex. Em seguida foram mantidos por 4 horas sob 18°C . Os tubos que não continham anticorpo foram separados, pois não exigiram nenhum processo adicional. Deixou-se decantar por 10 minutos, os demais tubos. Posteriormente, todos os tubos, incluindo aqueles destinados a contagem total de iodo, foram submetidos ao contador de radiação gama (Cobra II Gamma da Packard[®]) por 1 minuto. O cálculo das concentrações de progesterona nas amostras foi determinado em ng/ml utilizando-se o programa RIASMARTtmQc[®].

Foram realizados dois ensaios, sendo a média do coeficiente de variação intra-ensaio $4,03 \pm 0,21$ e inter-ensaio $1,48 \pm 0,61$.

4.1.4 Imunohistoquímica para lecitina

A lecitina é uma proteína de origem não imune, isolada de fontes naturais, tais como: raízes de plantas, bactérias e fungos, cuja atividade é altamente específica para moléculas de carboidrato de eritrócitos e linfócitos. A imunohistoquímica para esta proteína foi realizada para auxiliar na determinação da fase do ciclo estral e contagem dos vasos sanguíneos. As secções foram desparafinizadas em xilol (20 minutos a 60°C), rehidratadas em etanol (Álcool absoluto, 96% e 70%, 5 minutos cada) e lavadas em água destilada seguida de lavagem em PBS (3 x 5 minutos). A exposição dos sítios de ligação foi realizada submetendo-se as secções ao tratamento com proteinase na concentração de 20 mg/ml (proteinase K; Sigma-Adrich Co., USA) durante 15 minutos a 37°C. Após lavagem em PBS, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com uso de peróxido de hidrogênio a 0,3% diluído em metanol, durante 30 minutos a -20 °C. A redução das ligações inesepecíficas foi realizada através do uso de soro eqüino durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, as secções foram incubadas por 20 horas a 4°C com a lecitina biotinilada (Biotin Lectin; n° de catálogo: L0651; Sigma-Adrich Co., USA). Para amplificação do sinal da reação, as secções foram incubadas por 45 minutos com complexo peroxidase-estreptovidina-biotina (Vectastain-Elite-ABC-Kit®; Vector Laboratories Inc., USA). O NovaRed (NovaRed™; Vector Laboratories Inc., USA) foi utilizado para revelar as reações específicas. As lâminas

foram contracoradas com hematoxilina por 8 segundos e lavadas em água destilada (3 x 5 minutos) para posterior montagem utilizando-se glicerina/gelatina.

4.2 Protocolo para indução da superovulação

O tratamento de superovulação dos animais consistiu na aplicação por via intramuscular de 2mg de benzoato de estradiol (BE-Estrogen[®], Farmavet, Brasil), associados ao implante de dispositivo intravaginal contendo 50mg de progesterona (P4-CIDR-B[®], InterAg, Nova Zelândia). Tais dispositivos foram inseridos com auxílio de aplicador comercial, depois de adequada anti-sepsia da região perineal.

A estimulação do crescimento folicular com FSH (Folltropin V[®], 200 mg IM, Vetrepfarm, Canadá) foi realizada 5 dias após a aplicação do dispositivo intravaginal. Este hormônio foi administrado diariamente em duas doses iguais (manhã e tarde) e em quantidades decrescentes, a saber, 80 mg no dia zero (D-0), 60 mg no dia 1 (D-1), 40 mg no dia 2 (D-2) e 20 mg no dia 3 (D-3). No dia 6 (D-6) à tarde e dia 7 (D-7) pela manhã as búfalas receberam dose luteolítica (15 mg IM) de PGF2 α (Luprostiol - Prosolvin[®], Intervet, Holanda).

Os dispositivos intravaginais de P₄ foram removidos na tarde do dia 7 (D-7). Os animais receberam 25 mg IM de LH (Lultropin[®], Vetapharm, Canadá) 24 horas após a última aplicação de FSH. A ovulação ocorreu no dia 9 (D-9) e estes animais foram abatidos no dia 18 (D-18).

4.3 Preparação do material para microscopia eletrônica de varredura

Três ovários de cada grupo, destinados ao estudo da microvascularização, tiveram a artéria ovariana canulada junto ao pedículo do ovário para injeção da resina Mercocox CL-2R-5[®] (Vilene Hospital, Tokyo, Japan). Em seguida, realizou-se a corrosão dos elementos extravasculares através da imersão em solução aquosa de hidróxido de sódio a 30% durante 20 horas em estufa a 37°C.

Os moldes de mercocox obtidos foram submetidos a sucessivas lavagens em água corrente sob baixa pressão, posteriormente incluídos em gelatina a 30% para realização de cortes medianos necessários para obtenção de planos elucidativos da microvascularização do corpo lúteo ao microscópio eletrônico. Após a confecção dos cortes, os moldes foram mais uma vez imersos em solução aquosa de hidróxido de sódio a 20% para retirada da gelatina, mantidos em estufa a 37°C por 4 horas e lavados em água. As amostras permaneceram em estufa a 37°C durante 5 horas até secagem completa.

Para visualização ao microscópio eletrônico de varredura LEO[®] 435 VP, os moldes tiveram sua superfície impregnada com sais de ouro e foram levados ao microscópio para análise da microvascularização, sendo os achados registrados em fotografias utilizado-se o filme Neopan 100 acros (Fuji Film[®]).

Para diferenciar vasos aferentes e eferentes foram utilizados dois critérios: o proposto por Leiser e Kohler (1983) relacionado à orientação da impressão negativa do núcleo das células endoteliais: núcleos esguios e orientados longitudinalmente

representam artérias e núcleos arredondados e orientados aleatoriamente representam veias. O segundo critério utilizado foi proposto por Murakami et al. (1988): vasos aferentes possuem constricções circulares e eferentes exibem impressões valvulares.

4.4 Fixação dos tecidos para imunohistoquímica

Os três ovários restantes de cada grupo tiveram CLL dissecados e cortados em pedaços 0,5 cm de largura, fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas. Foram então desidratados em uma série de etanol com concentrações crescentes (70%, 90%, absoluto I, II e III, uma hora cada), clareados em xilol (xilol I, II e III, uma hora cada) e incluídos em paraplast (paraplast I, II e de inclusão, uma hora cada) usando procedimento convencional. Cortes de 5µm foram preparados em micrótomo antes de serem submetidos à imunohistoquímica.

4.5 Tratamento das lâminas com 3-aminopropyltriethoxy-silane (APES)

Os cortes de 5 µm foram colocados sobre lâminas previamente silanizadas através de banhos em acetona 96% (2 x 3 minutos) e solução de 5% de 3-aminopropyltriethoxy-silano (APES- Sigma-Aldrich Co. USA.) diluída em acetona (15 minutos), dois banhos rápidos em acetona e um em água destilada.

4.6 Preparação do tecido luteínico para quantificação da densidade vascular

O material destinado à mensuração da densidade vascular foi submetido ao mesmo processo de fixação e confecção de cortes que o tecido destinado a imunohistoquímica. Para esta finalidade as lâminas foram limpas em álcool absoluto e os cortes corados com Hematoxilina-eosina segundo o protocolo a seguir: 2 vezes 12 minutos em xilol absoluto, 3 minutos em álcool absoluto, 3 minutos em álcool 95%, 3 minutos em álcool 70%, 1 banho rápido em água destilada, 5 minutos em hematoxilina, lavagem em água corrente até retirar o excesso de corante, passagem rápida em álcool-ácido, lavagem por 10 minutos em água corrente, 2 banhos rápidos em água destilada, 35 segundos em eosina, passagem rápida em álcool 95%, 3 passagens no álcool absoluto I, 2 minutos em álcool absoluto II, 2 minutos em álcool-xilol e 2 minutos em xilol. A montagem das lâminas foi realizada utilizando-se tolueno (Permout®[®], Fisher Chemicals, New Jersey) na interface entre lâmina e lamínula.

4.7 Determinação da densidade vascular

O estudo da microvascularização ao longo do ciclo estral nos animais controle e nos animais superovulados foi desenvolvido através da mensuração do número de vasos sanguíneos por secção do tecido luteínico sob microscópio óptico Leica DMR®. A quantificação da densidade vascular foi realizada segundo o método descrito por Asahara et al. (1995) e Zimmermann et al. (2001). Para cada animal foram feitos 6 cortes de 5µm do CL com o auxílio do micrótomo Leica[®] (RM2065), sendo posteriormente corados em hematoxilina-eosina. Em cada corte foram selecionados

aleatoriamente 2 campos na objetiva de aumento 200, no total de 12 campos por animal. Em cada campo os vasos sanguíneos foram contados e divididos pela área do campo visual, a qual por sua vez foi obtida utilizando-se uma lâmina milimetrada para determinação do diâmetro do campo visual. Este resultado foi aplicado na fórmula geométrica para obtenção da área de um círculo.

$$A = \pi R^2; \text{ onde } \pi = 3,14 \text{ e } R = D/2$$

(D é o diâmetro do campo visual e R é o raio)

4.8 Imunohistoquímica do VEGF e seus receptores

As secções em paraplast foram desparafinizadas em xilol (2 x 10 minutos), rehidratadas em uma série de etanol com concentrações decrescentes (absoluto I e II, 95%, 70% e 50%, 5 minutos cada) e lavadas em água destilada (1x 5 minutos). Todas as lavagens seguintes foram realizadas com solução tamponada de fosfato (PBS a 0,15 M; pH 7,2) 3 vezes de 5 minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram imersas em tampão citrato e receberam tratamento em microondas (3 x 5 minutos em potência máxima) para melhor exposição dos antígenos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada, durante 10 minutos, com peróxido de hidrogênio a 1,0% em PBS e, em seguida lavadas em tampão fosfato. Para reduzir as ligações inespecíficas, foram incubadas durante 20 minutos em solução de bloqueio composta de 0,07% de BSA (Bovine serum albumine; Vector Laboratories Inc., USA) e 0,0003% Triton (Triton X-100; Sigma-Adrich Co., USA) em PBS. As secções foram incubadas com anticorpo primário, por 20 horas a 4° C. Os detalhes sobre os anticorpos utilizados encontram-se na Tabela 1.

Depois da lavagem em PBS, foram incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário anti-coelho e camundongo (Anticorpo universal, IgG, BA-1400, produzido em cavalo; Vector Laboratories Inc., USA) na diluição de 1:200 e lavadas novamente em PBS. Em seguida, incubaram-se as secções por 45 minutos com complexo de peroxidase-estreptavidina-biotina (Vectastain-Elite-ABC-Kit[®]; Vector Laboratories Inc., USA) para amplificação do sinal da reação. Após lavagem em tampão fosfato, a reação de imunohistoquímica específica foi revelada utilizando-se NovaRed por 5 minutos (NovaRed[™]; Vector Laboratories Inc., USA). Finalmente, as secções foram lavadas em água destilada, contra-coradas com Hematoxilina por 8 segundos. As lâminas foram lavadas em água corrente por 15 minutos e então montadas com glicerina/ gelatina. Como controle negativo foram utilizados cortes que não receberam o anticorpo primário e foram tratados com soro equino 10%. Como controles positivos foram utilizados cortes de placenta bovina a termo, para os quais as mesmas reações haviam sido positivas em testes realizados em outros laboratórios.

As lâminas foram visualizadas em Microscópio Nikon Eclipse (E-800) equipado com câmera de vídeo (Cool snap- Pro cf color[®]). As imagens foram capturadas usando o software Image-Pro Plus.

Tabela 1 - Detalhes dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica – São Paulo – 2003.

Anticorpos	Clone, Isotipo	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor (n° de catálogo)
VEGF (Bovino)	IgG policlonal	Coelho	1:100	Prof. Schams
VEGF (Humano)	VG76e, IgG monoclonal	Camundongo	1:100	Abcam (ab-119)
VEGFR-1 (Humano)	C-17, IgG policlonal	Coelho	1:100	Santa Cruz (sc-316)
VEGFR-2 (camundongo)	C-20, IgG policlonal	Coelho	1:150	Santa Cruz (sc-315)

Para reação de imunohistoquímica do VEGF também foi utilizado um anticorpo comercial (ab-119) produzido pela Firma Abcam (Tabela 1). O protocolo empregado no uso deste anticorpo difere apenas na utilização do tampão Tris-HCl (1,0 M; pH10; Tris Buffer; Sigma-Adrich Co., USA) substituindo o tampão citrato, conforme sugestão do fabricante.

4.9 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As comparações estatísticas foram executadas com uso do teste ANOVA. No caso de haver diferença significativa, aplicou-se o teste de múltiplas comparações de Turkey-Kramer. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados para se determinar diferenças entre as médias. A correlação entre a concentração de progesterona sérica e densidade vascular foi analisada usando o método do coeficiente de correlação de Pearson.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Mensurou-se as concentrações séricas de progesterona e densidade vascular dos corpos lúteos (CLL) e dos animais estudados. Além disso, foram realizadas análise da microvasculatura luteínica, imunolocalização do VEGF e seus receptores, bem como da lecitina nos CLL de búfalas superovuladas no 9º dia p.o. e controle ao longo ciclo estral. Os resultados obtidos estão apresentados abaixo, bem como as correlações entre as variáveis estudadas.

5.1 Determinação do dia do ciclo estral

Com a finalidade de estimar o dia do ciclo estral em que os animais se encontravam, foram mensuradas as concentrações de progesterona sérica de todos os animais estudados. Estes resultados foram comparados às curvas padrão de progesterona em búfalas e somados aos achados macro e microscópicos para se estimar o dia do ciclo estral no qual se encontravam estes animais. A imunolocalização da lecitina permitiu a visualização dos vasos sanguíneos nos CLL, contribuindo também para determinação da fase do ciclo estral.

5.1.1 Concentrações séricas de progesterona

Os seguintes níveis médios de progesterona foram encontrados: $0,77 \pm 0,19$; $2,02 \pm 0,16$; $3,58 \pm 0,87$; $0,22 \pm 0,02$ ng/ml para os dias 2, 9, 17 e 26 respectivamente (Tabela 1). As concentrações de progesterona ao longo do ciclo estral estão

representadas no gráfico da figura 1, onde se observa um aumento progressivo até o dia 8 pós-ovulação (p.o.) e um aumento vertiginoso atingindo o pico em torno do dia 12, indicando a máxima atividade secretória do CL. Em seguida observou-se declínio desta atividade associada à luteólise do CL. Quando se comparam as concentrações médias de progesterona sérica entre as fases determinadas neste experimento, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os grupos.

A concentração média de progesterona sérica nos animais superovulados foi de $5,88 \pm 0,97$ ng/ml. Esta concentração média de progesterona foi significativamente maior que a concentração dos animais do grupo controle ($p < 0,01$). Considerando-se que os animais superovulados apresentaram em média 2,5 corpos lúteos por animal, a concentração de progesterona relativa foi de $2,41 \pm 0,33$ ng/ml, também maior ($p < 0,05$) do que a média dos animais controle na mesma fase.

Tabela 2- Concentrações médias de progesterona sérica (ng/ml) de búfalas em diversas fases do ciclo estral e nos animais superovulados - São Paulo - 2003.

	Animais controle				Animais superovulados
	Dia 2	Dia 9	Dia 17	Dia 26	Dia 9
P ₄	$0,77 \pm 0,19^{*a}$	$2,02 \pm 0,16^{*a}$	$3,85 \pm 0,87^{*a}$	$0,22 \pm 0,02^{*a}$	$5,58 \pm 0,97^a$

- Progesterona sérica (P₄);
- Valores são médias $\pm$ desvio-padrão de 3 animais diferentes por fase. * diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diversas fases do ciclo estral em animais não tratados e ^a diferença significativa ($p < 0,01$) entre os animais do grupo controle quando comparados aos superovulados.

Figura 1- Concentrações médias (média $\pm$ desvio padrão) de progesterona sérica em búfalas durante o ciclo estral.

5.1.2 Achados microscópicos dos corpos lúteos

Os achados microscópicos, após a coloração com hematoxilina-eosina e imunolocalização da lecitina, foram os seguintes:

Corpo hemorrágico: Possui estrutura lobular bem definida, separada por septos de tecido conjuntivo contendo a maioria dos vasos sanguíneos. Os lóbulos possuem uma cavidade central, que com o desenvolvimento do órgão passa a ser preenchida por células luteínicas e vasos sanguíneos.

Corpo lúteo maduro: Marcado pela presença de células luteínicas que apresentam núcleo central, grande e esférico, indicadores da atividade secretória. O citoplasma é rico em granulações e os espaços intercelulares são reduzidos.

Corpo lúteo em regressão: Grande invasão de tecido conjuntivo. Caracterizado pela desorganização celular e grandes espaços intersticiais. Células luteínicas com núcleo pequeno com retração da membrana e presença de densas granulações periféricas, que correspondem à cromatina fragmentada (núcleo picnótico).

Corpo Albicans: Predomínio de tecido conjuntivo fibroso, células luteínicas raramente são encontradas. Os vasos sanguíneos também são escassos, porém quando presentes, encontram-se envolvidos por camadas concêntricas de fibroblastos.

Assim foram utilizados 3 corpos hemorrágicos (Figura 2); 3 CLL maduros (Figura 3); 3 CLL em regressão (Figura 4) e 3 *Corpus albicans* (Figura 5) para determinação da fase do ciclo estral.

Figura 2- Fotomicrografia do corpo hemorrágico de búfala não tratada. A- Reação de imunohistoquímica para lecitina. Observar os inúmeros lóbulos (L) marcados por cavidades centrais e os vasos (→) localizados no septo interlobular (S). B- Vasos sanguíneos (→) localizados no septo entre dois lóbulos luteínicos. Coloração HE. Barra=10µ

Figura 3- Fotomicrografia do corpo lúteo maduro de búfala não tratada. A- Reação de imunohistoquímica para lecitina. Observar os inúmeros vasos sanguíneos localizados no septo interlobular e dentro do parênquima lobular (→). B- Células luteínicas com núcleos esféricos e centrais, citoplasma marcado pela intensa vacuolização (→). Coloração HE. Barra=10µ

Figura 4- Fotomicrografia do corpo lúteo em regressão de úfala não tratada. A- Reação de imunohistoquímica para lecitina. Observar células endoteliais intensamente coradas para lecitina (seta cheia) e a desorganização das células luteínicas (→). B- Invasão de tecido conjuntivo (→). Coloração HE. Barra=10µ

Figura 5- Fotomicrografia do corpo albicans de Búfala não tratada. A- Reação de imunohistoquímica para lecitina. Observar os vasos sanguíneos cercados por camadas concêntricas de fibroblastos (→). B- Verificar o predomínio de fibroblastos (→). Coloração HE. Barra=10µ

5.2 Densidade vascular dos corpos lúteos

A densidade vascular média ao longo do ciclo estral foi de $17,8 \pm 3,33$; $11,92 \pm 3,57$; $10,38 \pm 2,42$ e $3,46 \pm 1,66$ vasos/mm² para os corpos hemorrágicos (CH), CL maduro (CL), CL regressão (CR) e *corpus albicans* (CA), respectivamente (Figura 7). A análise estatística utilizando o teste de Tukey-Kramer evidenciou diferença significativa entre densidade média de cada fase do ciclo estral ($p < 0,01$) como pode ser observado na Tabela 2.

A densidade vascular média dos CLL dos animais superovulados foi significativamente maior ($p < 0,001$) do que a dos animais controle na mesma fase: $37,78 \pm 8,89$ vasos/mm² vs $11,92 \pm 3,57$ vasos/mm², conforme está ilustrado na figura 7.

Tabela 3- Densidade vascular média (vasos/mm²) dos CLL de búfalas nas diversas fases do ciclo estral e nos animais superovulados -São Paulo - 2003.

	Animais controle				Animais superovulados
	Dia 2	Dia 9	Dia 17	Dia 26	Dia 9
DC	$17,8 \pm 3,33$ *	$11,92 \pm 3,57$ *	$10,83 \pm 2,42$ *	$3,46 \pm 1,66$ *	$37,78 \pm 8,89$ *

- Densidade vascular média (DC);
- Valores são média $\pm$ desvio-padrão de 3 animais diferentes por fase. * indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre as fases do grupo controle e $p < 0,001$ quando comparados os animais superovulados com os do grupo controle.

Figura 6- Gráfico representando a densidade vascular dos CLL de búfalas nas diversas fases do ciclo estral e em animais superovulados. Corpo hemorrágico (CH) 2º dia pós-ovulação (p.o.), corpo lúteo maduro (CL) 9º dia p.o., corpo lúteo em regressão (CR) 17º dia p.o., *corpus albicans* (CA) 26º dia p.o. e corpo lúteo de animal superovulado (CS) 9º dia p.o.

Os dados demonstraram a ocorrência de uma redução de 33% na densidade vascular da fase corpo lúteo maduro em relação ao CH, de 6% entre o corpo lúteo maduro e corpo lúteo em regressão e de 69% do corpo lúteo em regressão e *corpus albicans*. A densidade vascular dos CLL superovulados foi aproximadamente 3 vezes maior do que no CL maduro.

5.3 Correlação entre a progesterona sérica e a densidade vascular

Assim como a densidade vascular, a progesterona sérica também foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais superovulados : $5,58 \pm 0,97$ ng/ml vs.

2,02 ± 0,16 ng/ml em relação aos animais não tratados na mesma fase (9º dia p.o.)

Os níveis de progesterona sérica dos animais superovulados foram significativamente ($p < 0,01$) mais elevados que dos animais do grupo controle em todas as fases.

A Figura 7 ilustra a relação existente entre a densidade vascular e os níveis séricos de progesterona nas diversas fases do ciclo estral nos animais não tratados.

Figura 7- Gráfico representando a densidade vascular do CL em relação aos níveis de progesterona sérica ao longo do ciclo estral em animais não tratados. Corpo hemorrágico (CH) 2º dia pós-ovulação (p.o.), corpo lúteo maduro (CL) 9º dia p.o., corpo lúteo em regressão (CR) 17º dia p.o., corpo albicans (CA) 26º dia p.o.

Na fase de corpo hemorrágico, a concentração de progesterona sérica não apresentou um aumento proporcional à alta densidade vascular, explicando a baixa correlação encontrada entre estas variáveis: quando se considerou a fase de CH, a correlação foi de apenas 0,1 ($p < 0,05$). O cálculo do coeficiente de regressão que demonstra a correlação entre os níveis de progesterona sérica e a densidade vascular foi de 0,87 ($p < 0,05$), quando analisadas as outras fases (CL, CR e CA).

A relação entre a concentração de progesterona sérica e a densidade vascular nos superovulados e nos animais do grupo controle na mesma fase do ciclo estral (9° dias após a ovulação) está representada no gráfico da figura 8.

Figura 8- Densidade vascular em relação à concentração plasmática de progesterona nos animais superovulados (CS) e grupo controle na mesma fase do ciclo estral (9 dias após a ovulação). Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão de três diferentes animais por grupo. * indica diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos para densidade vascular e ** diferença significativa entre os grupos para concentração de progesterona.

5.4 Imunolocalização do VEGF e seus receptores

O sistema VEGF e seus receptores tirosina-quinase (VEGFR-1 e VEGFR-2) foram localizados imunohistoquimicamente no corpo lúteo de búfalas em diversas fases do ciclo estral e em animais superovulados. A análise da imunohistoquímica permitiu caracterizar a imunoreatividade destas proteínas nas células do estroma, luteínicas e endoteliais do CL em: intensa, forte, fraca ou ausente.

A imunoreatividade para este fator e seus receptores, pode ser observada nas células endoteliais e luteínicas, a partir do 2º dia p.o. até a fase de corpo lúteo em regressão (17º dia p.o.).

Corpo hemorrágico: Nesta fase, várias células luteínicas e endoteliais apresentaram reação positiva para VEGF localizada no citoplasma (Figura 9-A). Em relação aos receptores, ambos possuíram forte reatividade, sendo que a reação do VEGFR-1 nas células luteínicas apresentou-se na forma de granulações no citoplasma e concentrou-se em áreas mais próximas a membrana celular (Figura 10-A), enquanto para VEGFR-2, a reação foi mais uniforme, distribuindo-se por todo o citoplasma. As células endoteliais, por sua vez, reagiram fortemente para estes receptores (Figura 11-A), porém alguns vasos foram não imunoreativos. As células do estroma não apresentaram reação.

Corpo lúteo maduro: A maioria das células luteínicas e endoteliais apresentaram forte reação citoplasmática para VEGF (Figura 9-B) se comparados às do CH. Não foi observada reação positiva nas células luteínicas pequenas, bem como nas células do estroma. A reação para VEGFR-1 e VEGFR-2 apresentou comportamento

semelhante à fase anterior (Figura 11-B), sendo que um maior número de células endoteliais não reagiram (Figura 10-B).

Corpo lúteo em regressão: Neste estágio, poucas células luteínicas encontravam-se fracamente imunocoradas para VEGF (Figura 9-C). Quando positivas, exibiam uma reação dispersa no citoplasma e não uniforme (Figura 11-C). Poucas células endoteliais também foram imnuoreativas e as células do estroma permaneceram negativas. O VEGFR-1 e VGFR-2 foram identificados nesta fase em um número menor de células (Figura 10-C e 11-C).

Corpo Albicans: Nas secções dos CLL nesta fase, não foi evidenciada a presença de células positivas para o VEGF (Figura 9-D) e seus receptores.

Nos CLL dos animais superovulados, as células luteínicas e endoteliais coraram-se intensamente para o fator (Figura 9-E). As células do estroma, assim como nas fases do ciclo estral do grupo controle, também não apresentaram reação. A imunoreatividade das células luteínicas e endoteliais para VEGFR-1 e VEGFR-2 foi intensa no CLL destes animais (Figuras 10-D e 11-D).

Tabela 4- Classificação da reação de imunohistoquímica nas células do corpo lúteo de búfalas durante o ciclo estral e em animais superovulados - São Paulo - 2003.

	CH			CL			CR			CA			CS		
	L	E	S	L	E	S	L	E	S	L	E	S	L	E	S
VEGF	+	++	-	++	++	-	+	+	-	-	-	-	+++	+++	-
VEGFR-1	+	++	-	++	++	-	+	+	-	-	-	-	+++	+++	-
VEGFR-2	+	++	-	++	++	-	+	+	-	-	-	-	+++	+++	-

- Corpo hemorrágico (CH), corpo lúteo maduro (CL), corpo lúteo em regressão (CR), corpo albicans (CA), Corpo lúteo de superovulados (CS), célula luteínica (L), célula endotelial (E), célula do estroma (S). Escore: + reação fraca; ++ forte; +++ intensa; - não imunoreativa.

Figura 9- Fotomicrografias da reação de imunohistoquímica para VEGF em CLL de búfalas superovuladas e em diversas fases do ciclo estral em animais não tratados. A- corpo hemorrágico, exibe algumas células luteínicas com citoplasma corado para VEGF (→) e células do estroma negativas (➤). B- Corpo lúteo maduro, observar células luteínicas com citoplasma fortemente corado (→) e algumas delas negativas (seta cheia). C- Corpo lúteo em regressão, mostrando apenas algumas células luteínicas positivas e células do estroma negativas (S). D- Corpo albicans, observar células endoteliais (E), luteínicas (→) e do estroma negativas (seta cheia). E- Células luteínicas, do Corpo lúteo de animal superovulado, intensamente imunoreativas (→). F- Controle negativo da reação. Barra=10μ

Figura 10 – Fotomicrografias da região de imunohistoquímica para VEGFR – 1 em CLL de búfalas superovuladas (9º dia p.o) em diversas fases do ciclo estral em animais não tratados A- Corpo hemorrágico, observar a reação na forma de granulações no citoplasma das grandes células luteínicas e algumas células luteínicas pequenas (▸). B- Corpo lúteo maduro com células luteínicas imunocoradas para o VEGFR-1 (▸) e algumas células endoteliais negativas (→). C- Corpo lúteo em regressão, células endoteliais positivas (→) e nas proximidades células luteínicas fracamente coradas(▸). D- corpo lúteo superovulado, observar células luteínicas positivas (→). Barra=10μ

Figura 11- Fotomicrografias da reação de imunohistoquímica para VEGFR-2 em CLL de búfalas superovuladas (9° dia p.o.) e em diversas fases do ciclo estral em animais não tratados. A- Corpo hemorrágico, observar células luteínicas fortemente coradas (seta cheia) e células do estroma negativas (→). B-Corpo lúteo maduro com células luteínicas imunocoradas para o VEGFR-2 (seta cheia), células endoteliais positivas (→) e células perivasculares negativas (seta vazia). C- Corpo lúteo em regressão, células endoteliais positivas (→). D- Corpo lúteo superovulado, observar células luteínicas intensamente coradas (→). Barra=10μ

5.5 Microvascularização dos corpos lúteos

O corpo lúteo de búfala é um órgão altamente vascularizado (Figura 12-A) e a análise de sua microvasculatura revela um desenvolvido arranjo vascular, semelhante ao parênquima pulmonar que se apresenta ricamente lobulado. Sua angioarquitetura acompanha a estrutura lobular do órgão (Figuras 12-A). Cada corpo lúteo possui uma região onde adentram o componente arterial e venoso, derivado respectivamente da artéria e veias corticais do ovário. Este componente arterial é único e penetra no corpo lúteo a partir do córtex ovariano, se dividindo em três categorias: artéria da cápsula, artérias septais e artérias parenquimatosas. A artéria da cápsula é única e se dispõe de forma helicoidal na superfície do CL, originada de um ramo de uma artéria cortical do próprio ovário. As artérias septais, oriundas da artéria da cápsula, seguem a estrutura lobular do órgão (Figuras 12-A) e originam as artérias parenquimatosas responsáveis pela irrigação do parênquima lobular da glândula (Figuras 12-A). Estas artérias se dividem em ramos profundos e superficiais que permitem uma irrigação homogênea de cada lóbulo luteínico (Figura 12-B), antes de formarem a rede capilar do CL (Figura 12-A e B). As porções terminais das artérias parenquimatosas são marcadas por inúmeras constrições, que correspondem a esfíncteres controladores do fluxo sanguíneo para os capilares (Figura 13-A). Estes capilares apresentam-se altamente fenestrados, permitindo o vazamento da resina Mercocryl, formando inúmeras projeções laterais em toda rede capilar (Figura 13-B). Além disso, focos de extravasamento, podem ser encontrados em vários pontos (Figura 13-A).

O CL recebe uma ou duas veias luteínicas, derivadas de uma veia cortical, que adentram o parênquima luteínico no mesmo lado que a artéria luteínica, constituindo o hilo do CL. O componente venoso possui angioarquitetura similar ao componente arterial, dividindo-se também em três categorias (Figura 14-A): veias parenquimatosas que recolhem o sangue de cada lóbulo, drenando-o para as veias septais, as quais, assim como as artérias homônimas, acompanham os septos interlobulares e conduzem o sangue para as veias da cápsula. Estas são vasos de grande calibre que seguem um trajeto helicoidal na superfície do CL, acompanhando a artéria homônima, que por sua vez desemboca em ramos corticais da veia ovariana. Foram observadas nestas veias várias impressões que correspondem a válvulas, importantes para evitar o refluxo sanguíneo no CL (Figura 14-A). Não foram encontradas anastomoses artério-venosas no CL de búfalas normais.

Na análise comparativa da microvasculatura dos CLL dos animais controle e superovulados, os arranjos vasculares arterial e venoso são semelhantes em ambos os grupos. Entretanto, a microvasculatura do CLL dos animais tratados com FSH é mais abrangente que nos animais do grupo controle, fato evidenciado por uma rede capilar mais densa (Figura 14-B).

Figura 12- Eletromicrografia do corpo lúteo maduro de Búfala do grupo controle. A- Observar a angioarquitetura que acompanha a estrutura lobular do órgão. Artéria septal (AS) e artéria parenquimatosa superficial (APS). B- centro lobular do corpo lúteo maduro de Búfala não tratada, mostrando o arranjo dos vasos nesta região. Artérias parenquimatosas profundas com maior calibre (APP) e veias parenquimatosas profundas (→).

Figura 13- Eletromicrografia do corpo lúteo maduro de Búfala do grupo controle. **A-** Porção terminal do vaso aferente, marcada por inúmeras constrictões que representam as impressões de esfíncteres (→). Foco de extravasamento de resina Mercor (➤) **B-** capilares luteínicos altamente fenestrados, exibindo projeções laterais (→).

Figura 14- Eletromicrografia do corpo lúteo maduro de Búfala. A- CL de animal não tratado mostrando uma veia septal (VS) recebendo várias veias parenquimatosas (AP) que drenam o sangue de vênulas (→). As setas cheias são as áreas de estreitamento correspondente às válvulas. B- CL de búfala superovulada, observar arranjo vascular e a densa rede capilar. Artéria septal (AS), veia septal (VS), rede capilar (→).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Para uma melhor compreensão do papel desempenhado pelo corpo lúteo é fundamental conhecer o processo angiogênico cíclico, essencial à função e desenvolvimento deste órgão (WEBB et al. 2002, YAN et al., 1998). O VEGF é considerado o principal fator modulador envolvido neste mecanismo (FAVIER, 2001; FERRARA et al. 1998; REDMER e REYNOLDS, 1996; KAMAT et al., 1995; BREIER, 2000) e sua supressão inibe o próprio desenvolvimento luteínico (ZIMMERMANN et al., 2001; FERRARA et al. 1998; FRANSER et al., 2000; FRANSER; LUNN, 2001).

A expressão do VEGF e seus receptores no corpo lúteo têm sido recentemente estudada em várias espécies, entre elas bovina (BERISHA et al. 2002; GOEDE et al., 2000), ovina (REDMER et al., 1996 e REDMER et al., 2001), murina (BACIO et al. 1995; PHILLIPS; HAINS; FERRARA, 1990), primatas (FRANSER; LUNN, 2001), caprina (KAWATE et al. 2003), suína (BOONYAPRAKOB et al., 2003) e eqüina (AL-ZI'ABI; FRANSER; WATSON, 2003). A caracterização de sua expressão ao longo do ciclo estral apresenta variações significativas relacionadas à atividade funcional desta glândula (BERISHA et al., 2000; ZHENG et al., 1993 e REDMER et al., 1996).

Na primeira etapa deste trabalho foi quantificada a densidade vascular dos CLL de búfalas ao longo do ciclo estral, bem como detalhada a microvascularização em animais controle e submetidos à superovulação. Em seguida estes resultados foram correlacionados à imunolocalização do VEGF e de seus principais receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) no tecido luteínico ao longo do ciclo estral e em animais superovulados. Os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

6.1 Densidade vascular ao longo do ciclo estral

O corpo lúteo de búfalas é uma glândula altamente vascularizada apresentando alta densidade vascular durante o período de atividade funcional, como descrito por Gaytan et al., (1999), Meyer e MacGeachie (1988) e Augustin et al. (1998). Este órgão necessita de aporte sanguíneo adequado que forneça às células luteínicas quantidades suficientes de colesterol (principal substrato para esteroidogênese) e ao mesmo tempo garanta o escoamento e a distribuição de progesterona produzida para a circulação geral e outros órgãos (GAYTAN et al., 1999 e WILTBANK, 1994).

Os valores da densidade vascular obtidos neste trabalho comprovam as mudanças bruscas que ocorrem na rede vascular do corpo lúteo em cada fase específica do ciclo estral, desde a transição de folículo para corpo lúteo até a luteólise e, por fim, a formação do *corpo albicans*. Durante toda a vida do corpo lúteo existe crescimento e regressão em massa dos vasos sanguíneos em curto espaço de tempo, conforme descrito por Augustin (2000) ao estudar a morfogênese vascular no corpo lúteo de mulheres, por Murakami et al. (1988) e Basset (1943) ao estudarem o CL de ratas; Hossain e O'Shea (1983) em porquinhos da Índia e por Forsman e McCormack (1992) em hamster. Estas mudanças vasculares no corpo lúteo tem sido objeto de estudo em várias espécies, e refletem a atividade secretória da glândula. Redmer et al (2001), ao estudarem o desenvolvimento do CL de ovinos, afirmaram que esse crescimento e regressão são fenômenos que ocorrem nos vasculares. Este crescimento vascular pode ser dividido em três fases: no primeiro momento ocorre rompimento da membrana basal dos vasculares, em seguida, proliferação e migração de células endoteliais, e por fim formação de novos vasculares através das

anastomoses entre estas células e criação de tubos, que corresponderão aos novos vasos sanguíneos conforme descrito por Losordo e Isner (2001).

A densidade vascular é um parâmetro importante, que reflete a vascularização do tecido e, conseqüentemente, seu nível de perfusão sanguínea (DHARMARAJAN; BRUCE; MEYER, 1985 e ASAHARA et al. 1995) . É considerada por Augustin et al. (1995) uma forma de avaliar a angiogênese. O estudo desta variável em búfalas confirma que além de modificações macroscópicas na estrutura do órgão, relacionadas ao seu peso e volume, ocorrem mudanças no leito vascular, as quais refletem a atividade funcional do corpo lúteo, o que está de acordo com Leavitt et al. (1971) ao estudar a relação entre estrutura e função deste órgão ao longo do ciclo estral de hamster.

Os valores deste parâmetro nas fases específicas do CL revelaram desenvolvimento acelerado da rede vascular na fase inicial do CL, o que está de acordo com o que foi descrito por Meyer e MacGeachie (1988) ao encontrarem maior número de vasos por área de CL no terceiro dia após a ovulação. Esta precocidade também foi identificada por El-Sheikh; Sakla e Amin (1967) no desenvolvimento do corpo lúteo de búfalas. Segundo Gaytan (1999) há um aumento de aproximadamente 61% na densidade vascular do CL em relação ao folículo pré-ovulatório. Este crescimento vascular acelerado também foi descrito por Franser e Lunn (2001); Plendl (2000); Meyer e Macgeachie (1988); Nicosia e Villaschi (1999) e Gaytan et al (1999) afirmaram que a angiogênese se inicia poucas horas após a ovulação, chegando a superar até mesmo o ritmo de crescimento de tumores (REYNOLDS 2000; FRANSER et al., 2001, FYNDLAY, 2000), fato que explica como o CL se torna um

órgão altamente vascularizado, mesmo se originando de um folículo, no qual os vasos sanguíneos se restringem apenas às camadas mais externas (HILLIER, 1986).

Augustin et al. (1995) afirmam que esta proliferação das células endoteliais ocorre apenas no primeiro terço do ciclo ovariano, e a partir deste momento cessa a angiogênese no CL. Dessa forma, após o acelerado crescimento vascular nas fases iniciais, os CLL mostraram diminuição progressiva desta vascularização a partir do 17º dia do ciclo, devido à luteólise morfológica, fenômeno acompanhado pela regressão dos vasos sanguíneos conforme descrito por Nicosia e Villaschi, (1999); Prendl (2000); Reynolds (2000); Redmer e Reynolds (1996) e Amselgruber; Schafer e Sinowatz (1999). Segundo Modlich; Kaup e Augustin (1996) este fenômeno de regressão vascular é marcado por dois eventos: a separação das células endoteliais da membrana basal, associada à contração e oclusão de pequenos vasos aferentes com pronunciada proliferação de células musculares lisas e à hipertrofia das células endoteliais no início do processo apoptótico, promovendo a oclusão da luz de vasculares (BAUER, 2003 e AL-ZI'ABI; FRANSER; WATSON 2002). Estes fenômenos podem ser explicados devido à ação de hormônios luteolíticos sobre os vasos sanguíneos (NETT; MCCLELLAN; NISWENDER, 1976).

A luteólise pode ser definida como redução em massa do tecido luteínico (CARAMBULA et al., 2002). Nos ruminantes, este processo é desencadeado com a liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelo endométrio, regulada pela ocitocina hipofisária que se liga aos seus receptores no endométrio estimulando a secreção desta prostaglandina no final da fase luteínica. Recentemente foi descoberto que o

Fator de necrose tumoral- α (TNF- α), produzido pelas células epiteliais do endométrio e/ ou macrófagos uterinos, estimula a síntese da PGF_{2 α} pelas células do estroma endometrial, via ativação da fosfolipase A₂ e a óxido nítrico (NO) sintetase. Este fator é considerado atualmente como gatilho para luteólise em vacas, ação esta reforçada pela ação do LH sobre seus receptores no endométrio (OKUDA; MIYAMOTO; SKARZYNSKI, 2002; WISSING et al., 1997). Além disso, o TNF- α também é produzido por macrófagos que invadem o CL, no momento da luteólise, atraídos pela PGF_{2 α} . Este fator se liga aos receptores TNFR-1 (conhecidos como receptores-morte) localizados nas células luteínicas e endoteliais, que ativam a caspase-3, considerada a principal executora da morte celular, através da sua ação proteolítica sobre: cito-esqueleto, moléculas de transdução de sinais, enzimas reparadoras do DNA, RNA e matriz protéica nuclear. A caspase-3 foi encontrada no CL de ratas, vacas e ovelhas, sendo funcionalmente essencial para apoptose durante a regressão luteínica (RUEDA et al., 1997, BOONE; TSANG, 1998).

Durante o processo apoptótico, estas células são caracterizadas por apresentarem núcleo com cromatina fragmentada e retração da membrana nuclear (YADAV; SUDHAGAR; MEDHAMURTHY, 2002). Além disso, Sawyer et al. (1990) relataram que a PGF_{2 α} também induz a liberação de ocitocina pelas células luteínicas, promovendo vasoconstrição e isquemia, o que ocasiona redução da concentração de progesterona e favorece a apoptose das células luteínicas. Essa redução nos níveis de progesterona pode provocar contração dos vasos aferentes do corpo lúteo favorecendo ainda mais o quadro de isquemia e conseqüentemente hipóxia, o que pode ser responsável pelas áreas de necrose observadas no corpo lúteo em regressão, fenômeno semelhante ao descrito por Kaiserman-Abramofl e Padykula

(1989) para o endométrio funcional. Wiltbank (1994) descreve efeito semelhante provocado pela administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em ovelhas, que provoca diminuição do fluxo luteínico devido ao efeito constritor sobre grandes artérias e arteríolas do CL.

A luteólise funcional, por sua vez, é definida como a redução dos níveis de progesterona em resposta ao aumento da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Vários mecanismos de inibição da síntese de progesterona por esta prostaglandina foram descritos, mas todos eles indicam que sua ação está mais relacionada com o prejuízo na utilização do colesterol, do que com os níveis das enzimas esteroidogênicas. Em ratas, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ prejudica o transporte do colesterol para o interior da célula, por inibir a síntese da proteína careadora do colesterol (Proteína-2-esterol) (MACRANCKEN; CUSTER; LAMSA, 1999). Além disso, existe a possibilidade da caspase-3 interferir diretamente na esteroidogênese. Porém, recentemente Carambula et al. (2002) observaram que em ratos com deficiência de caspase-3, a regressão luteínica foi retardada, porém os níveis de progesterona declinaram indiferentemente da caspase-3, explicando que esta enzima não seja mediadora direta do decréscimo na esteroidogênese associada à luteólise.

Nesta fase de regressão luteínica, Webb; Woad e Armstrong (2002) descrevem que após aumento de $\text{PGF}_{2\alpha}$, ocorre também estimulação à produção de citocinas no CL, tais como: $\text{TNF}-\alpha$, interleucina- β ($\text{IL}-\beta$) e proteína quimiotática para monócitos (MPC-1), por células endoteliais, fibroblastos e linfócitos T. Estes representam fatores quimiotáticos para células imunes, como macrófagos e linfócitos T. Os macrófagos desempenhariam seu papel fagocitário atuando na ingestão de restos celulares resultantes da apoptose das células luteínicas, porém, Plate e Landis-

Keyes (2001) sugerem uma ação direta na destruição das células luteínicas, promovendo também uma redução da esteroidogênese.

Assim como descrito por Gaytan et al., (1999) foi observado decréscimo da densidade vascular do CL na fase luteínica final, culminando em baixa densidade vascular observada nos animais do grupo 4 (26 dias após a ovulação), que corresponde à fase de corpo *albicans*. Segundo Plendl (2000), alguns autores afirmam que neste estágio o CL é totalmente desprovido de vasos sanguíneos, sendo formado apenas por acúmulo de substância hialina entre as células em degeneração. Os achados deste trabalho demonstram que em búfalas ocorre brusca redução na vascularização, mesmo porque nesta fase não se justifica elevado aporte sanguíneo, pois o órgão se encontra afuncional (HAFEZ, 1996). Verificou-se, entretanto, a presença de vasos sanguíneos, apesar de apresentarem-se fibrosados e circundados por inúmeros fibroblastos, semelhante aos resultados descritos por El-Sheikh; Sakla e Amin (1967) ao estudarem a microscopia do *corpo albicans* de búfalas.

Os animais superovulados apresentaram densidade vascular cerca de três vezes maior que a dos animais do grupo não tratado, na mesma fase do ciclo estral. Aumento significativo também foi observado por Zimmermann et al. (2001) ao estudarem a densidade vascular luteínica de ratas estimuladas com hCG e PMSG. Este fato pode ser explicado pelo próprio processo de hiperestimulação do ovário, o qual provoca inúmeras alterações na função deste órgão. Níveis altos de progesterona e estradiol (DOLDI et al. 1997), como também aumento da invasão vascular do novo CL tem sido relatados em ovários hiperestimulados (Morbideilli et

al. 1997). Uma das hipóteses que explica a maior densidade vascular observada é o fato da gonadotrofina exógena usada neste experimento (FSH) reduzir o processo de atresia folicular e, por consequência, aumentar o número de folículos capazes de responder às gonadotrofinas hipofisárias, principalmente o LH (MOOR et al., 1984). Além disso, o FSH tem efeito positivo na proliferação das células endoteliais, o que favorece a angiogênese conforme descrevem Christenson e Stouffer (1977).

Outra explicação para a alta densidade vascular encontrada está relacionada ao fato de tratamentos superovulatórios resultarem em altas concentrações de estradiol (MISRA et al., 1998), que também é um hormônio comprovadamente pró-angiogênico. O estradiol se liga aos receptores localizados nas células endoteliais induzindo a proliferação e migração destas células (BEG, SANWAL E YADAV, 1997). Este hormônio também é considerado responsável pela homeostasia das células endoteliais, por inibir a síntese das caspases, proteases estas importantes no fenômeno da apoptose de células endoteliais, conforme descrito por Soares; Guo e Schmitt (2003).

Por fim, a maior densidade vascular nos animais superovulados também pode ser explicada devido ao aumento da síntese de VEGF em resposta ao FSH o que está de acordo com Doldi et al. (1997) que, após realizarem experimento com cultivo de células da granulosa luteinizadas, estimuladas por aquele hormônio, apresentaram uma maior expressão de VEGF. MacClure et al. (1997) também relataram o mesmo fenômeno, ao investigarem a expressão deste fator em mulheres com síndrome do ovário policístico.

6.2 Concentrações séricas de progesterona

Os níveis séricos deste hormônio obtidos no presente trabalho condizem com aqueles descritos na literatura (KAMONPATANA et al. 1979, ZAYED; MEGAHED 1999; JAINUDEEN; SHARIFUDDIN; AHMAD, 1983; BEG; SANWAL; YADAV 1997 E MISRA et al., 1998; SARVAIYA; PATEL; PATHAK, 1993 e PALTA; PRAKASH; MADAN, 1996): apresentaram concentração média de 0,39 ng/ml na fase luteínica inicial, pico de 5,0 ng/ml e diminuição destes níveis, a partir do 17º dia p.o., com valores mínimos atingindo a média de 0,22 ng/ml, na fase luteínica final.

Ao analisar os níveis de progesterona encontrados, infere-se que a síntese deste hormônio apresenta aumento inicial lento até o 10º dia do ciclo. A partir deste momento, ocorre aumento acentuado em sua concentração plasmática, com pico em torno do 12º dia, correspondendo à máxima atividade secretória do corpo lúteo. O mesmo é descrito por Beg, Sanwal e Yadav (1997), que identificaram o pico em búfalas aproximadamente no 13º dia p.o. e verificaram que o CL atingiu seu tamanho e peso máximos entre o 10º e o 15º dia p.o. Posteriormente ocorreu declínio parcial da síntese, que permaneceu em níveis altos até aproximadamente o 18º dia p.o. Observamos, ainda, redução vertiginosa a partir do 20º dia até o final do ciclo, assim como descreveram Kainai e Shimizu (1984). Observou-se que níveis altos de progesterona em búfalas coincidem com a densidade vascular, a qual se mantém alta até o 17º dia do ciclo estral, como descrevem Augustin (1998) e Nicosia e Villaschi (1999) ao observarem uma alta correlação entre estas duas variáveis.

Essa diminuição, a partir do 18º dia, ocorre em virtude do processo de luteólise, no qual existe regressão dos vasos com conseqüente redução do aporte sanguíneo e diminuição do fornecimento de precursores dos hormônios esteróides (SARVAIYA; PATEL; PATHAK, 1993). Essa redução na produção de progesterona também pode ser explicada pela ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelo endométrio que apresenta uma retroalimentação negativa para LH (BJURULF; SELSTAM, 1996). A esteroidogênese luteínica é influenciada por esta gonadotrofina hipofisária, que se liga a receptores nas células luteínicas (DEVOTO et al. 2002) e está associada ao aumento da expressão de enzimas esteroidogênicas, como a citocromo P450 (P450_{scc}), que catalisa a reação de conversão do colesterol em pregnenolona nas mitocôndrias das células luteínicas, assim como a 3 β -Hidroxiesteróide-oxireductase (3 β -HSD), que participa da conversão da pregnenolona em progesterona. Porém, durante a regressão do CL ocorre decréscimo na expressão destas enzimas, bem como dos receptores para LH (YUAN; LUCY, 1996).

Relatos confirmam que a ocitocina produzida pelas células luteínicas inibe a síntese de progesterona de maneira parácrina e/ou autócrina (SCHAMS; BERISHA, 2002 e WUTTKE, 1995). Na realidade, Stouffer (2003) sugere que o declínio na produção de progesterona preceda a luteólise, segundo Webb; Woad e Armstrong (2002), esta redução é pré-requisito para apoptose das células endoteliais.

Comparando-se níveis de progesterona sérica obtidos de animais nas diferentes fases do ciclo estral dos animais controle com as concentrações de progesterona dos animais superovulados verificou-se que estas se mostraram sempre maiores ($p < 0,01$).

Essa elevada produção de progesterona nos animais superovulados, em relação à do grupo controle, pode ser atribuída ao maior número de CLL por ovário (2 a 3), com concentração média de progesterona de 5,58 ng/ml. Resultados semelhantes foram encontrados por Beg, Sanwal e Yadav (1997): ao superovularem búfalas utilizando FSH, eles explicam que este aumento significativo na produção de progesterona também se deve à luteinização dos grandes folículos anovulatórios, em resposta ao FSH. De acordo com Moor et al. (1984) o tratamento superovulatório reduz o processo de atresia folicular e aumenta o número de folículos capazes de responder às gonadotrofinas hipofisárias, principalmente ao LH, o qual está relacionado ao aumento na expressão de enzimas esteroidogênicas e à produção de progesterona (WEBB et al., 1992). Tal fato foi comprovado por Wiltbank (1994), que ao tratar ovelhas com anticorpo contra LH observou redução de 60% na concentração de progesterona e decréscimo no peso do CL.

Além disso, concentração relativa de progesterona (concentração média de progesterona dividida pelo número de CLL por animal) no grupo superovulado, foi significativamente maior do que a produção deste hormônio no grupo controle na mesma fase do ciclo estral. Este fato confirma que a maior densidade vascular nestes animais também contribuiu para aumento da síntese de progesterona, pois proporcionou maior aporte sanguíneo e melhor perfusão tecidual aumentando a disponibilidade dos precursores necessários a maior produção de progesterona (MACIEL; RODRIGUEZ-MARTINEZ; GUSTAFSSON, 1992).

6.3 Correlação entre a progesterona sérica e a densidade vascular

As concentrações séricas de progesterona, além de auxiliarem na determinação da fase do ciclo estral, permitiram correlacionar densidade vascular e a produção hormonal.

Quando consideradas todas as fases do ciclo estral, as variáveis não apresentaram alta correlação. Contrariamente Nicosia e Villaschi (1999) afirmaram que o fluxo sanguíneo ovariano está altamente correlacionado à produção de progesterona pelo CL. Os níveis séricos deste hormônio, em búfalas, aumentaram a partir do dia 2 (CH) até o dia 9 (CL), não correspondendo inteiramente ao comportamento da densidade vascular. Excluindo-se os valores correspondentes à fase de corpo hemorrágico (CH), obtivemos alta correlação entre as variáveis ($r=0,87$; $p<0,05$).

A baixa correlação encontrada na fase inicial, na qual existe uma densidade vascular alta e uma produção de progesterona baixa, deve-se, provavelmente, ao fato das células luteínicas se encontrarem ainda em processo de maturação, etapa necessária para desenvolverem atividade secretória. Este resultado está de acordo com aqueles encontrados por Juengel et al. (1994), os quais não detectaram a presença de RNAm da enzima 3- β -hidroxiesteroidesdesidrogenase no corpo hemorrágico até 48 horas após a ovulação em ovelhas. Além disso, o RNAm da enzima citocromo P450 aumentou apenas entre os dias 3 e 9 p.o. Kainai e Shimizu (1984) ainda relataram aumento significativo nos níveis de progesterona em búfalas apenas a partir do 6º dia p.o.

6.4 Imunohistoquímica do VEGF e seus receptores

Consultando-se a literatura relacionada a este fator de crescimento e seus receptores tirosina-quinase, verifica-se que este é o primeiro trabalho que relata a presença de VEGF, Flt-1 e KDR no CL de búfalas em diversas fases do ciclo estral e em animais submetidos ao tratamento superovulatório, e, apesar de não ter sido realizado Western blotting para quantificação destas proteínas, a imunohistoquímica demonstrou que ocorrem mudanças na expressão destas proteínas ao longo do ciclo estral e nos animais superovulados. Estes resultados serão discutidos a seguir.

A expressão de VEGF e seus receptores em células endoteliais tem sido relatada em vários tecidos adultos do corpo, como: miocárdio, artérias coronárias, glândulas mamárias, plexo coróide do sistema nervoso central, pulmões, glomérulos renais e músculo esquelético. Nestes tecidos, o papel do VEGF como promotor da mitose das células endoteliais, seu efeito conservador da vasculatura, bem como seu papel de ativador da permeabilidade vascular foram comprovados (YOON; LOSORDO, 2003; PEPPER et al., 2000; STACKER; ACHEN, 1999). Entretanto, no CL o VEGF e seus receptores foram identificados em outras células, além das endoteliais, tais como: células luteínicas, perivasculares e fibroblastos e células musculares lisas dos vasos sanguíneos (AMSELGRUBER et al., 1999; BERISHA et al., 2002 e GOEDE et al., 1998; FRANSER; LUNN, 2001; GOMEZ, et al., 2003; ENDO et al., 2001; REDMER et al., 1996; GOMEZ et al., 2002; WULFF, et al., 2001). A presença deste fator e seus receptores nestas células, bem como as variações na sua expressão relacionadas à atividade funcional desta glândula, ao longo do ciclo estral são indicativos que estas proteínas estejam envolvidas na regulação de outros

fenômenos além daqueles relacionados a angiogênese, como por exemplo luteólise e esteroidogênese (BERISHA et al., 2000; ZHENG et al., 1993 e REDMER et al., 1996).

Em búfalas foram observadas, imunohistoquimicamente, forte reação positiva para VEGF, Flt-1 e KDR em células luteínicas e endoteliais a partir do 2º dia p.o. (CH).O mesmo foi encontrado por Berisha et al. (2000) e Goede et al. (1998) ao estudarem o corpo lúteo de vacas. A presença deste fator de crescimento nas células luteínicas no estágio inicial do corpo lúteo sugere seu papel na regulação da angiogênese luteínica em búfalas, atuando como fator de crescimento parácrino para as células endoteliais.

A participação do VEGF no processo angiogênico pode ser explicada pelas suas ações mitogênicas, quimiotáticas e conservadoras das células endoteliais. Através da ação estimuladora do VEGF via Flt-1 ocorre produção do ativador de plasminogênio (PA). O PA promove a conversão de plasminogênio em plasmina, que por sua vez, ativa a collagenase, que atua na degradação da membrana basal dos vasos, permitindo a liberação das células endoteliais. Fenômeno semelhante ocorre nos folículos pré-ovulatórios, nos quais esta cascata proteolítica participa da ovulação, sendo também desencadeada pela maior expressão do VEGF, o qual, via Flt-1 nas células da granulosa, células da teca e endoteliais, estimula a produção de PA (OTANI et al., 1999). Assim, as células endoteliais livres migram no tecido luteínico, atraídas pelo VEGF produzido pelas células luteínicas, provavelmente em resposta a hipóxia. O fator induzido pela hipóxia (HIF) se liga ao gene do VEGF ou, através das altas concentrações de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), estimula

a transcrição do RNAm do VEGF (NEUFELD, et al., 1999; GEVA; JAFFE, 2000; FERRARA; DAVIS-SMYTH; 1997). Este mecanismo permite a vascularização das regiões ainda pouco oxigenadas do CH, explicando a alta reatividade das células luteínicas ao VEGF nesta fase do ciclo estral de búfalas.

Este fator ao se ligar aos receptores, KDR ou Flt-1, também estimula a proliferação das células endoteliais, essencial para formação da intensa rede vascular no novo CL. Porém, o conhecimento de toda a cascata de transdução do sinal dos receptores de VEGF é incompleto: sabe-se que ao se ligar com o domínio extracelular de seus receptores, ocorrem mudanças na conformação e autofosforilação do domínio citoplasmático destes receptores que, de alguma forma, estimulam a síntese de DNA favorecendo a proliferação celular (AUERBACH; AUERBACH, 1994; FERRARA et al., 1998; FAVIER; CORVOL, 2001; KAMAT et al., 1995; NEUFELD, et al., 1999; GEVA; JAFFE, 2000; FERRARA; DAVIS-SMYTH; 1997).

A intensa imunoreação do VEGF no CL maduro de búfalas, fase não angiogênica, pode ser justificada pelas funções endoteliotróficas deste fator, que atua regulando a permeabilidade vascular e também mediando a sobrevivência das células endoteliais, conforme afirmam Goede et al. (1998), Kawate et al. (2003) e Sugino et al. (2000). O papel do VEGF como ativador da permeabilidade vascular do CL, provavelmente ocorre através da cascata proteolítica da collagenase, que induz a formação de fenestrações entre as células endoteliais de pequenas vênulas e capilares permitindo a passagem de moléculas com alto peso molecular (OTANI et al., 1999; GEVA; JAFFE, 2000). Esse aumento da permeabilidade vascular permite

uma maior disponibilidade de colesterol para células esteroidogênicas, o que pode resultar no aumento da síntese de progesterona no CL durante a fase luteínica média.

Entretanto, a maior produção de progesterona nesta fase, pode estar também associada ao envolvimento direto do VEGF que, através de mecanismo autócrino, estimula a própria produção esteroidogênica, como ocorre com o bFGF, outro fator angiogênico luteínico, comprovadamente estimulador da síntese de progesterona pelas células luteínicas *in vitro* (SCHAMS et al., 1993). Este fato também foi descrito por Roy e Greenwald (1991) para Epidermal Growth Factor (EGF) que também estimulou a produção *in vitro* de progesterona em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais de hamster. Esta estimulação foi atribuída a uma maior atividade da 3- β -hidroxiesteróide-desidrogenase e ao aumento do número de receptores para LH nestas células. Estes autores também relatam que o EGF, Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) e o FSH estimularam proliferação destas células através da síntese de DNA usando AMPc como segundo mensageiro.

Outro fato que sugere a ação do VEGF na esteroidogênese, refere-se aos processos fisiológicos de produção de progesterona e secreção de VEGF demonstrarem relações temporais e espaciais: ambos ocorrem em células luteínicas e em resposta aos mesmos estímulos hormonais, tais como LH e hCG. O tratamento com antagonista do GnRH reduz as concentrações de progesterona e do RNAm do VEGF no corpo lúteo de macacas (RAIVINDRANATH et al., 1992). Geva e Jaffe (2000) e Gomez et al. (2002) afirmam que o LH e hCG modulam a expressão do VEGF, ligando-se aos seus receptores presentes nas células luteínicas induzindo a

transcrição do gene do VEGF, utilizando AMPc como segundo mensageiro. Associado a este fato, Graselli et al. (2002), assim como Redmer e Reynolds (1996) sugerem que o VEGF, da mesma forma que o LH, modula as funções esteroidogênicas das células da granulosa promovendo a diferenciação destas células e favorecendo o processo de luteinização. Provavelmente o VEGF, o LH e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) atuam de maneira semelhante induzindo a transcrição do RNAm de enzimas esteroidogênicas (SHWEIKI et al. 1993).

Christenson e Stouffer (1997) descrevem alta correlação entre a produção de progesterona e a de VEGF em cultura de células da granulosa de folículos pré-ovulatórios, fato comprovado através do uso de inibidores da produção de progesterona (inibidor da enzima 450_{sc}) que promoveram a redução na concentração de progesterona e da expressão do RNAm VEGF. Lee et al. (1997) descrevem que esta correlação entre o VEGF e a concentração de progesterona foi alta ($r= 0,84$, $p<0,01$) em cultura de células da granulosa luteinizadas de mulheres. Estes mesmos autores descrevem uma redução de 91% na concentração de progesterona após o uso de inibidor de 3β -HSD. Neste caso não ocorreu mudança na expressão do VEGF, sugerindo que a progesterona não atua como regulador autócrino do VEGF.

Os receptores para o VEGF (Ftl-1 e KDR) também foram localizados, através de imonohistoquímica, nas células endoteliais e luteínicas no CL de búfalas desde 2º até o 17º dia p.o. O mesmo padrão foi descrito por Goede et al. (1998) em vacas, Boonyaparakob et al. (2003) em porcas e por Kawate et al. (2003) em cabras. A alta imunoreatividade para os receptores nas células endoteliais na fase luteínica inicial

confirma o papel do sistema VEGF na regulação parácrina da angiogênese no CL de búfalas. A presença destes receptores em células luteínicas do CL maduro de búfalas também é outro indicativo de que o VEGF atue influenciando a função destas células, provavelmente promovendo a regulação autócrina da esteroidogênese, durante toda a fase luteínica (BERISHA et al., 2000; ENDO et al., 2001; SUGINO et al., 2000; GEVA; JAFFE, 2000).

Em búfalas, o tecido luteínico em regressão (17º dia p.o.), exibiu poucas células luteínicas e endoteliais positivas à imunoreação para VEGF. As células coradas tiveram seu número reduzido até desapareceram no 26º dia p.o. (CA), assim como descrito por Berisha et al. (2000) e Goede et al. (1998) em vacas e Ferrara et al., (1998) em primatas. Provavelmente o fenômeno da regressão dos vasos sanguíneos durante a luteólise ocorra em resposta à redução deste fator, que atuaria na manutenção das células endoteliais, como sugere Sugino et al. (2000) ao descrever que alta expressão de VEGF no corpo lúteo gravídico de mulheres em resposta ao hCG é necessária para evitar a morte das células por apoptose. Desta forma o VEGF também atua prolongando a vida do CL. Ziecik (2002) afirma que o VEGF produzido pelo endométrio antes do processo de implantação, em resposta ao LH, também favorece a manutenção dos altos níveis do próprio VEGF, prolongando a vida do CL.

Neste trabalho, observou-se ausência do VEGF e seus receptores no *Corpo albicans* de Búfalas, como relatado por Berisha et al. (2000) e Goede et al. (1998) no CL de vacas e Endo et al. (2001) em mulheres. Estes achados já eram esperados pois o CA é uma estrutura afuncional, na realidade é apenas acúmulo de substância hialina

entre as células em degeneração, onde os poucos vasos sanguíneos observados se encontram fibrosados (PLENDL, 2000; EL-SHEIKH; SAKLA; AMIN, 1967).

No corpo lúteo de búfalas superovuladas, a imunoreatividade para o VEGF e seus receptores foi marcadamente intensa, mais forte que nos animais do grupo controle na mesma fase do ciclo. Provavelmente o FSH estimulou a síntese destas proteínas o que está de acordo com MacClaire et al. (1994) e Sheiweiki et al. (1993) ao observarem um aumento da síntese VEGF em ovários em resposta ao FSH. O mecanismo pelo qual o FSH estimula a síntese do VEGF é semelhante ao anteriormente descrito para o LH. O FSH se liga a seus receptores nas células luteínicas promovendo a transcrição gênica do VEGF e a síntese desta proteína (GEVA; JAFFE, 2000).

A elevada síntese deste fator e seus receptores nos CLL do grupo superovulado pode justificar a maior densidade vascular encontrada, devido à estimulação da angiogênese. Além disso, é provável que o FSH também estimule a síntese de DNA pelas células endoteliais favorecendo a proliferação destas células, contribuindo ainda mais para a intensa vascularização do CL nestes animais, o que está de acordo com Maciel et al. (1992) ao relatar que o CL de vacas superovuladas com FSH apresentaram maior número de células endoteliais que o grupo controle.

A maior produção de progesterona pelos animais superovulados pode ser explicada como resposta à maior vascularização (NICOSIA; VILLASCHI, 1999), associada ao papel do VEGF na regulação da permeabilidade vascular como descrito anteriormente, o que favorece uma maior disponibilidade dos precursores da síntese

de progesterona. Além disso, é provável que nestes animais este fator de crescimento também atue na estimulação direta da esteroidogênese, como descrito por Doldi et al. (1997). Porém, o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre ainda não foi explicado: é provável que este fator de crescimento estimule a expressão de enzimas esteroidogênicas, o que necessita de outros estudos para comprovação.

6.5 Análise da microvasculatura dos corpos lúteos de búfalas

A análise da microvasculatura dos CLL de búfalas através de microscopia eletrônica de varredura confirma a presença de alta densidade vascular. A angioarquitetura desta glândula parece formar uma estrutura de sustentação do parênquima glandular, semelhante a um “esqueleto vascular”. A rede capilar é muito desenvolvida e confirma os achados de Azmi e O’Shea (1984) nos quais 75% das células no corpo lúteo maduro são de origem vascular. Segundo Zheng et al. (1993) o CL recebe um alto suprimento sanguíneo por grama de tecido como nenhum outro órgão.

Os achados deste trabalho estão de acordo com a vascularização descrita por Koenig e Amselgruber (1986) ao estudarem o corpo lúteo de vacas. Estes autores dividiram o componente arterial em artérias da cápsula, septais e parenquimatosas.

Em búfalas, assim como em vacas, a artéria da cápsula é única, oriunda de um ramo das artérias corticais do ovário. Descreve percurso helicoidal na superfície do corpo lúteo, assim como descrito em ratas por Murakami et al. (1988); em porquinhos da Índia por Hossain e O’Shea (1983), e em hamster por Forsman e

McCormack (1992). Em búfalas observou-se que esta artéria origina várias artérias de calibre menor, as quais acompanham os septos interlobulares, sendo chamadas de artérias septais. Este padrão comportamental é descrito no CL de vacas (KOENIG E AMSELGRUBER, 1986) e roedores (MURAKAMI et al., 1988, HOSSAIN E O'SHEA, 1983, FORSMAN E MCCORMACK, 1992). A formação destas artérias, em búfalas, deriva da proliferação e migração de células endoteliais oriundas da teca, as quais alcançam os septos interlobulares e invadem a cavidade central do corpo hemorrágico (EL-SHEIKH; SAKLA; AMIN, 1967). As artérias septais por sua vez, originavam artérias responsáveis pela irrigação de cada lóbulo do CL que são as artérias parenquimatosas, também descritas por Koenig e Amselgruber (1986) no CL de vacas. De acordo com Murakami et al. (1988) estas artérias dividiam-se em dois ramos, um profundo e outro superficial, permitindo um fluxo homogêneo no órgão; o mesmo foi observado no CL de búfalas, no presente trabalho.

Neste trabalho a porção terminal das artérias parenquimatosas frequentemente apresentou constrições que correspondem à impressão de esfíncteres controladores do fluxo sanguíneo luteínico (MURAKAMI et al., 1988). Provavelmente estes esfíncteres estão sob a ação de vários hormônios que atuam no CL, regulando o fluxo sanguíneo, tais como: LH, estradiol, progesterona, prostaglandinas $F_{2\alpha}$ e E_2 , catecolaminas, prolactina e histamina (WILTBANK, 1994). Uma injeção de LH ou hCG pode aumentar o fluxo ovariano em várias espécies (ovinos e bovinos), porém não altera o fluxo para o CL (WILTBANK et al., 1989). Niswender et al. (1976), realizaram um experimento com ovelhas imunoneutralizando o LH e obtiveram redução de 20% no fluxo total ovariano, 24 horas após a administração de anticorpo

anti-LH. Entretanto, não ocorreu alteração significativa do fluxo luteínico. Outro importante hormônio luteotrófico, o estradiol, atua promovendo dilatação da vasculatura luteínica (WILTBANK et al., 1989). Por outro lado, sua retirada reduz em 80% a concentração de progesterona sérica em coelhos. Há evidências que $\text{PGF}_{2\alpha}$ e catecolaminas também influenciem o fluxo luteínico: o primeiro por promover a contração de grandes artérias e arteríolas, e o segundo por reduzir a pressão sanguínea sistêmica. Assim sendo, durante o estresse, a liberação de catecolaminas altera diretamente o fluxo luteínico (JANSON et al., 1975).

Segundo Burden (1972), o fluxo sanguíneo no CL possui também regulação não-hormonal. Os vasos sanguíneos do CL são inervados por fibras adrenérgicas e colinérgicas que controlam o fluxo, assim como nos outros órgãos. Denervação simpática do ovário em ratas prenhes aumentou o fluxo na tuba uterina, porém não causou mudança no fluxo sanguíneo para o CL. Isso sugere que o controle neuronal da vasculatura luteínica seja direto e independente. Entretanto, Wiltbank (1994) afirma que vasos do CL possuem apenas estrutura vascular, embora alguns apresentem diâmetros maiores. Se observados à eletrofotomicrografia ou corados por imunohistoquímica, os vasos do CL apresentam-se desprovidos de camada média de células musculares lisas, comumente encontrada nos vasos de outros tecidos, como por exemplo no estroma ovariano, o que explicaria a pouca resistência vascular do CL. Desta forma, alterações do fluxo luteínico, segundo Wiltbank et al. (1994), seriam reflexo da ação desta inervação nos vasos extraluteínicos encontrados no estroma ovariano ou resultado da ação dos hormônios luteotróficos sobre os vasos luteínicos.

A partir das artérias parenquimatosas forma-se a rede de capilares altamente fenestrados, ao contrário do que ocorre em outras glândulas, como as salivares, onde os capilares são contínuos (HILLIER, 1986). A presença destas fenestrações permite que as lipoproteínas de baixa e alta densidade (LDL e HDL), principal fonte de colesterol precursor dos hormônios esteróides, alcancem as células esteroideogênicas em concentração semelhante à encontrada no plasma sanguíneo (WILTBANK, 1994) e que a progesterona sintetizada seja recolhida e distribuída para circulação geral (GAYTAN et al., 1999).

Não foram observadas anastomoses arterio-venosas no CL de búfalas, o que está de acordo com a descrição de Koenig e Amselgruber (1986), Murakami et al. (1988), Hossain e O'Shea (1983) e Forsman e McCormack (1992). A presença destas anastomoses se justificaria se fosse necessária redução do fluxo sanguíneo no CL, o que não ocorre no CL maduro de búfalas nem tão pouco nos animais superovulados. A ocorrência destas anastomoses foi relatada apenas por Murakami et al. (1988), no corpo lúteo em regressão de ratas.

Em búfalas, o componente venoso demonstrou comportamento semelhante ao descrito para o arterial, sendo que geralmente o CL apresentava-se drenado por duas veias que desembocavam nas veias corticais do ovário. Achados semelhantes foram descritos para ratas e porquinhos da Índia por Murakami et al. (1988) e Forsman e McCormack (1992), respectivamente. Verificou-se que no CL de búfalas existiam duas veias superficiais de grande calibre, várias veias septais e outras parenquimatosas, originadas a partir das vênulas. As veias luteínicas apresentavam

impressões de válvulas, que atuariam direcionado o fluxo e prevenindo o refluxo sanguíneo o que poderia prejudicar a função do órgão.

A microvasculatura dos animais superovulados mostrou comportamento semelhantemente àquela de animais do grupo controle na mesma fase do ciclo estral. Diferiram apenas na rede capilar, a qual se apresentou mais densa nos animais submetidos à superovulação, confirmando os achados referentes à densidade vascular. As alterações provocadas pela superovulação se restringiram aos capilares luteínicos, não causando grandes modificações na morfogênese vascular do CL. Tais achados estão de acordo com Redmer (1988), ao afirmar que a angiogênese ocorre nos capilares. Este maior desenvolvimento vascular é explicado por Plendl (2000) e Christenson e Stouffer (1997) como resultante da maior migração e proliferação de células endoteliais, promovidas pelo FSH. Entretanto, não se pode deixar de considerar o papel do VEGF na angiogênese, estimulando a proliferação de células endoteliais e a neovascularização (MACCLAURE et al., 1994; DOLDI et al., 1997 e SHWEIKI et al., 1993). Conforme afirmam Quintana et al. (2001), o próprio estradiol possui papel fundamental na angiogênese, mais pela estimulação da migração e formação de anastomoses entre as células endoteliais, do que pela indução de proliferação das mesmas. Além disso, este hormônio promove a homeostasia das células endoteliais, por estar envolvido no processo de apoptose. Isto se dá, provavelmente, pela proteção que confere a estas células, ao inibir a ação das caspases, família de proteases cisteínicas diretamente envolvidas neste processo (SOARES; GUO; SCHIMITT, 2003).

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

1. Os valores da densidade vascular refletem as dramáticas mudanças que ocorrem na vascularização do CL de búfalas durante o ciclo estral;
2. A densidade vascular do CL está altamente correlacionada com as concentrações plasmáticas de progesterona em búfalas nas diversas fases do ciclo estral, o que permite afirmar que variações na vascularização deste órgão influenciam a atividade secretora luteínica;
3. A densidade vascular do CL bem como os valores séricos de progesterona são significativamente maiores em búfalas superovuladas em relação aos animais não tratados na mesma fase do ciclo estral;
4. A microvascularização do CL de animais superovulados é mais densa do que nos animais controle em mesma fase do ciclo estral;
5. O sistema VEGF está presente nas células endoteliais, luteínicas e do estroma do CL de búfalas. A expressão deste fator e seus receptores varia nas diversas fases do ciclo estral, indicando o papel autócrino e/ou parácrino do VEGF na função luteínica;

6. A intensa imunoreatividade das células luteínicas e endoteliais para VEGF e seus receptores no CL dos animais superovulados sugere maior síntese e atividade deste sistema em resposta ao tratamento superovulatório.
7. Estudos adicionais se fazem necessários para compreender melhor o papel do VEGF na possível estimulação direta da síntese de progesterona pelas células luteínicas de búfalas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Selection and suppression of follicular growth in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 30, p. 259-271, 1993.
- AL-ZI-ABI, M. O.; FRANSER, H. M.; WATSON, E. D. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. **Reproduction**, v. 123, p. 67-77, 2002.
- ASAHARA, T.; BAUTERS, C.; ZHENG, L. P.; TAKESHITA, S.; ESTAMENHA, S.; IT HAD IRONED, N.; SYMES, J. F.; ISNER, J. M. Synergistic Effect of factor of Growth of Vascular endothelial and Fibroblast Growth Basic Factor in angiogenesis in alive. **Circulation**. v. 92, n. 9, p., 365-371, 1995.
- AMSELGRUBER, W. M.; SCHAFER, M.; SINOWATZ, F. Angiogenesis in the bovine corpus luteum: an immunocytochemical and ultrastructural study. **Anatomy Hstology and Embriology**, v. 28, p. 157-166, 1999.
- AUERBACH, W.; AUERBACH, R. Angiogenesis inhibition: a review. **Pharmac. Ther.** n. 63. p. 265-311, 1994.
- AUGUSTIN, H.G. Vascular morphogenesis in the ovary. **Bailieres Best Pract Res clin Obstet Gynaccol.**, v. 14, n. 6, p. 867-882, 2000.
- AUGUSTIN, H.G.; BRAUN, K.; TELEMENAKIS, I.; MODLICH, U.; KUHN, W. Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in the physiological model of blood vessel growth and regression. **American Journal of Pathology**. v. 147, n. 2, p. 339-351, 1995.
- BACIC, M.; EDWARDS, N. A.; MERRILL, M. J.; Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues. **Growth Factors**. v. 12. p. 11-15, 1995.
- BASSET, D. L. The changes in vascular pattern of the ovary of the albino rat during the oestrus cycle. **American Journal of Anatomy**, v. 73, p. 251-291, 1943.
- BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; VISITIN, J. A.; PORTO FILHO, R. M.; CARVALHO, N. A. T.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Failure oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. **Theriogenology**, v. 53, p. 491, 2000.
- BEG, M.A.; SANWAL, P. C.; YADAV, M.C. Ovarian response and endocrine changes in buffalo superovulated at midluteal and late luteal stage of the estrous cycle: a preliminary report. **Theriogenology**, v. 47, p. 423-432, 1997.
- BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPAINER, R. Expression and Tissue Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor, Its Receptors, and Localization in the Bovine Corpus Luteum During Estrous Cycle and Pregnancy. **Biology of reproduction**. Germany, n. 63, p. 1106-1114, 2000.

BREIER, G. Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. **Semin. Thromb Hemost.**, v. 26, n. 5, p. 553-559, 2000.

BONNE, D. L.; TANG, B. K. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1533-1539, 1998.

BOONYAPRAKOB, U.; GADSBY, J. E.; HEDGPETH, V.; ROUTH, P.; ALMOND, W. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrus cycle. **Reproduction**, v. 126, p. 393-405.

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

CARAMBULA, S. F.; MATIKAINEN, T.; LYNCH, M. P.; FLAVELL, R. A.; GONÇALVES, P. B.; TILLY, J. L.; RUEDA, B. R. Caspase-3 is pivotal mediator of apoptosis regression of the ovarian corpus luteum. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1495-1501, 2002.

CHAPÉIE, K.H.; WARNKE, P.C. Vascular Endothelial growth factor. **J. Neurooncology**, v.3 , n.35, p.365-372, 1997.

CHRISTENSON, L.; STOUFFER, R. L. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/ chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre and periovulatory follicles. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 7, 1997.

DEVOTO, L.; KOHEN, P.; VEGA, M.; CASTRO, O.; GONZALEZ, R. R.; RETAMALES, I.; CARBALLO, P.; CHRISTENSON, L. K.; STRAUSS, J. F. Control of human luteal steroidogenesis. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 186, n. 2, p. 137-141, 2002.

DICKSON, S. E.; BICKNELL, R.; FRASER, H. M. Mid-luteal angiogenesis and fuction in the primate is dependent on vascular endothelial growth factor. **Journal of Endocrinology**, v. 168, p. 409-416, 2001.

DHARMARAJAN, A.M.; BRUCE, N.W., MEYER, G. T. Quantitative ultrastructural characteristics relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of the pregnant rat. **American Journal Anatomy**, v. 172, n. 1, p. 87-99, 1985.

DOLDI, N.; BASSAN, M.; MESSA, A. FERRAI, A. Expression of vascular endothelial growth factor in human luteinizing granulosa cells and its correlation with the response to controlled ovarian hyperstimulation. **Gynecological Endocrinology**, v. 11, p. 263-267, 1997.

DROST, M.; WRIGHT JUNIOR, J. M.; CRIPE, W. S.; RICHTER, A. embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 20, p. 549-585, 1983.

EL-SHEIKH, A. S.; SAKLA, F. B.; AMIN, S. O. Changes in the desntiy and progesterone content of luteal tissue in the egyptian búfalo during the Oestrus cycle. **Journal Endocrinology**, v. 39, p. 163-171.

ENDO, T.; KITAJIMA, Y.; NISHIKAWA, A.; MANASE, K.; SHIBUYA, M.; KUDO, R. Cyclic changes in expresión of mRNA vascular endotelial growth factor, its receptors flt-1 and KDR/flk-1 and Ets-1 in human corpora lutea. **Reproductive biology**, v.76, n. 4, p. 762-768. 2001.

FAVIER, J.; CORVOL, P. Phisiological Angiogenesis. **Therapie**, Paris, v.5, n.56, p. 455-463,. 2001.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T.; NGUYEN, T.N.; PEERS, D.; CHISHOLM, V.; HILLAN, K.J.; SCHWALL, R.H. Vascular endothelial growth factor is essencial for corpus luteum angiogenesis. **Nature Medicine**, v.3, n.4, p.336-40, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION-fao. FAOSTAT: agriculture data. disponível em: <http://apps.fao.org/cgi-gin/nph-db.pl?=<u>agriculture/</u>>. acesso em 12 de jul. de 2003.

FORSMAN, A. D.; McCORMACK, J. T. Microcorrosion casts of hamster luteal and follicular vasculature throughout the estrus cycle. **The Anatomical Records**, v. 233, p. 515-520, 1992.

FRASER, H.M.; LUNN, S.F. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. **Reproduction**, v.3, n.121, p 355-362, 2001.

FRANSER, H.M.; LUNN, S.F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. **Br. Med. Bull**, v.3, n.56, p.787-97, 2000.

FRANSER, H. M.; DICKSON, S. E.; LUNN, S. F.; WULFF, C.; MORRIS, K.D.; CARROLL, V. A.; BICKNELL, R. Suppression of luteal angiogenesis in primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. **Endocrinology**, v. 141, n.3, p. 995-1000, 2000.

GAYTAN, F.; MORALES, C.; GARCIA-PARDOL.; REYMUNDO, C.; BELLIDO, C.; SANCHEZ-CRIADO, J.E. A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. **Biology Reproduction**. v. 60, n. 4, p. 914-919, 1999.

GERWINS, P.; SKOLDENBERG, E; CLAESSION-WELSH, L.. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. **Critical Review Oncology Hematology**, v.3, n.34, p. 185-194, 2000.

GEVA, E.; JAFFE, R. B. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. **Fertility and Sterility**, v. 74, n. 3, p. 429-438, 2000.

GOEDE, V.; SCHMIDT, T.; KIMMINAS.; KOZIAN D.; AGUSTIN H.G. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. **Laboratory Investigation**, v. 78, n. 11, p. 1385-1394, 1998.

GOMEZ, R.; SIMON, C.; REMOHI, J.; PELLICER, A. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. **Biology Reproduction**, v. 86, n. 6, p. 2164-2171, 2003.

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

HAZZARD, T.M.; STOUFFER, R.L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. **Gynecological Endocrinology**, v. 12, n. 3, p. 149-153, 1998.

HAYASHI, K.; TANAKA, J.; HAYASHI, K. G.; HAYASHI, M.; OTAN, M.; MIYAMOTO, A. The cooperative action of angiotensin II with sublytic administration of PGF2 α in inducing luteolysis and oestrus in the cow. **Reproduction**, v. 124, p. 311-315, 2002.

HELSKE, S.; VUORELA, P.; CARPÉN, O.; HORNING, C.; WEICH, H.; HALMESMAKI, E. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 3, p. 205-210, 2001.

HILLIER, S. Hormonal control of folliculogenesis and luteinization. In: **FINDLAY, J. K. Molecular biology of the female reproductive system**. California: Academic press, 1994. p. 1-27.

HOSSAIN, M. I.; O'SHEA, J. D. The vascular anatomy of the ovary and the relative contribution of the ovarian and uterine arteries to the blood supply of the ovary in the guinea-pig. **Journal of Anatomy**, v. 137, p. 457-466, 1983.

IRELAND, J. MURPHY, R.L.; COULSON, P.B. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. **Journal Dairy Science**. v. 63, p. 155-160, 1980.

JAIN, G.C.; PANDEY, R. S. Ovulatory changes in the levels of prostaglandin F2 α , luteinizing hormone, oestradiol-17 β and progesterone in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Zbl. Vet. Med.**, v. 31, p. 205-212, 1984.

JAINUDEEN, M.R.; SHARIFUDDIN, W.; BASHIR AHMAD, F. Relationship of ovarian contents to plasma progesterone concentration in the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **The Veterinary Record**, v. 15, p. 369-372. 1983.

JUENGEL, J. L.; GUY, M. K.; TANDESKI, T. R.; MCGUIRE, W. J.; NISWENDER, G. D. Steady-state concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome

P450 side-chain cleavage and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5,delta 4 isomerase in ovine corpora lutea during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 3, p. 380-384, 1994.

KAMAT, B.R. BROWN L. F.; MANSEAU E. J.; SENGHER, D. R.; DVORAK, H.F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 157-165, 1995.

KAMONPATANA, M.; KUNAWONGKRIT, A. BODHIPASHA, P.; LUVIRA, Y. Effect of PGF-2 α on serum progesterone levels in the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal Reproduction and Fertility**, n. 56, p.445-449, 1979.

KANAI, Y.; SHIMIZU, H. Plasma concentrations of LH, progesterone and oestradiol during the oestrus cycle in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Journal Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 507-510, 1984.

KAISERMAN-ABRAMOFF, PADYKULA, H. A. Angiogenesis in the postovulatory primate endometrium: the coiled arteriolar system. **Anatomical Records**, v. 224, p. 479-489, 1989.

KAWATE, N.; TSUJI, M.; TAMADA, H.; INABA, T.; SAWADA, T. Changes of messenger RNAs encoding vascular endothelial growth factor and receptors during the development and maintenance of caprine corpora lutea. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 166-171.

KEYT, F. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and flt-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. **Journal Biology Chemistry**, v. 271, n. 10, p. 5638-5646, 1996.

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

KONIG, H. E.; AMSELGRUBER, W. Vaskularisation des Corpus luteum des Rindes. **Fertilität**. n. 2. p. 205-208, 1986.

KONIG, H. E.; AMSELGRUBER, W.; RÜSSE, I. Zur Mikrozirkulation in Follikeln und Corpora lutea des Rinderovars-eine korrosionsanatomische Studie. **Tierärztl. Prax.** n. 16. p. 267-276, 1988.

KOOS, R. D. Ovarian angiogenesis. In: ADASHI, E. Y.; LEUNG, P. C. K. **The ovary**. Raven Press, 1993. p.433-453, 1993.

LAEMMLI, U. R. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. n. 227. p. 680-685, 1970.

LEAVITT, W. W.; BASOM, C. R.; BAGWELL, J. N.; BLAHA, G. C. Structure and function of the hamster corpus luteum during the estrus cycle. **American Journal of Anatomy**, v. 136, p. 235-250, 1971.

LEE, A. CHIRSTENSON, L. K.; PATTON, P. E.; BURRY, K. STOUFFER, R. L. Vascular endothelial growth factor production by human granulosa cells in vitro. **Human Reproduction**, v. 12, n. 12, p. 2756-2764, 1997.

LEE, J.; GRAY, A.; YUAN, J.; LUOH, S.; ABRAHAM, H.; WOOD, W. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase Flt-4. **Proc. Nail. Acad. Sci.**, v. 93, p. 1988-1992, 1996.

LOSORDO, D. W.; ISNER, J. M. Estrogen and angiogenesis. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v. 21, p. 6-12, 2001.

MACCRAKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 263-324, 1999.

MACIEL, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; GUSTAFSSON, H. Fine structure of corpora lutea in superovulated heifers. **Zentralbl Veterinarmed A.**, v. 39, n. 2, p. 89-97, 1992

MATTOS, J.C.A. **Patrimônio genético do rebanho do bubalino brasileiro**. São Paulo, Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 29p. 1992.

MCCLURE, 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.

MEMON, G.N.; BUCH, N.C.; PATEL, B.M. A study of follicular and luteal characteristic of the ovary at different stages of the oestrus cycle in surti buffalo heifer. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 27, n. 2, p. 301, 1971.

MEYER, G.T.; McGEACHIE, J.K. Angiogenesis in the corpus luteum of pregnant rats: a stereologic and autoradiographic study. **Anatomical Records**, v. 1, n. 222. p. 18-25, 1988.

MEYER, G.T.; BRUCE, N.W. Quantitative cell changes and vascularization in the early corpus luteum of the pregnant rat. **Anatomy Records**, v. 197 n. 3, p. 369-374, 1980.

MISRA, A. K.; KASIRAJ, R.; MUTHA RAO, M., RANGAREDDY, N.S., JAISWAL, R.S.; PANT, H. C. Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 50, p. 637-649, 1998.

MOOR, R.M.; KRUIP, T.A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? **Theriogenology**, v.21, n.1, p.103-116, 1984.

MOTTA, P. M.; VIZZA, E.; CORRER, S.; MACCHIARELLI, G.; MUGLIA, U. Na ultrastructural study of the fibromuscular caspule of the corpus luteum in mice. **Acta Anatomica**, v. 149, p. 247-254, 1994.

MURAKAMI, T.; IKEBUCHI, Y.; OHTSUKA, A.; TAGUCHI, T.; OHTANI, O. The blood vascular wreath of rat ovarian follicle, with special reference to its changes in ovulation and luteinization: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. **Archive of Histology and cytology**, v. 51, n. 4, p. 299-313.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor and its receptors. **The Faseb journal**, Israel, v.13, p. 9-22, 2000.

NISWENDER, G. D.; REIMERS, T. J.; DIEKMAN, M. A. Blood flow: a mediator of ovarian function. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 64-81, 1976.

OTANI, N.; MIMARI, S.; YAMOTO, M.; SHIKONE, T.; OTANI, H.; NISHIYAMA, R.; OTAN, T.; NAKANO, R. The vascular endothelial growth factor/ fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. **J. Clin. Endocrinol. Metabolism.**, v. 84, p. 3845-3851, 1999.

PATE, J. L.; LANDIS-KEYES, P. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 665-676, 2001.

PLATE, K.H.; WARNKE, P. C. Vascular endothelial growth factor. **Journal neurooncology**, v. 35, n. 3, p. 365-372, 1997.

PLENDL, J. Angiogenesis and Vascular Regression in the Ovary. **Anatomy Histology Embryology**, n. 29, p. 257-266, 2000.

PHILLIPS, H.S.; HAINS, J.; LEUNG, D.W.; FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth is expressed in rat corpus luteum. **Endocrinology**, v.2, n.127, p.965-7, 1990.

QUINTANA, R.; KOPCOW, L.; MARCONI, G.; SUELDO, C.; SPERANZA, G.; BARAÑAO, R.I. Relationship of ovarian stimulation response with vascular endothelial growth factor and degree of granulosa cell apoptosis. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1814-1818, 2001.

RAO, L. V.; PANDEY, R. S. Seasonal changes in plasma progesterone concentrations in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 66, p. 57-61, 1982.

RAVINDRANATH, N.; LITTLE-IRHING, L.; PHILLIPS, H.S.; FERRARA, N.; ZELENICK, A. J. Vascular endothelial growth factor ribonucleic acid expression in primate ovary. **Endocrinology**, v. 131, p. 254-260, 1992.

RATCLIFFE, K. E.; ANTHONY, F. W.; M. C.; RICHARDSON, M. C.; STONES, R. W. Morphology and functional characteristics of human ovarian microvascular endothelium. **Human Reproduction**, v. 4, n. 6, p. 1549-1554, 1999.

REDMER, D.A.; DAI, Y.; LI, J.; CHARNOCK-JONES, D.S.; SMITH, S.K.; REYNOLDS, L.P.; MOOR, R. M. Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p.157-165, 1996.

REDMER, D. A.; DORAISWAMY, V.; BORTNEM, B.J.; FISHER, K.; JABLONKA-SHARIFF, A.; GRAZUL-BILSKA, A.T. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. **Biology reproduction**, v. 65, n. 3, p. 879-889, 2001.

REYNOLDS, L.P.; GRAZUL, A.T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, v. 1, n. 12, p. 1-9, 2000.

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. **Journal Animal Sciences**, v.6, n.76, p. 1671-81, 1998.

ROY, S. K.; GREENWALD, G. S. In vitro effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-1, fibroblast growth factor and follicle stimulating hormone on hamster follicular deoxyribonucleic acid synthesis and steroidogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 889-869, 1991.

RUEDA, B. R.; TILLY, K. I.; BOTROS, I. W.; JOLLY, P. D.; HANSEN, T. R.; HOYER, P. B. Increased bax and interleukin-1 β -converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. **Biology of reproduction**, v. 56, p. 186-193, 1997.

RUZIWA, S. D.; WINTHER, H.; DANTZER, V. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the synepitheliochorial cow placenta. **Placenta**, v. 20, p. 57, 1999.

SAVAIYA, N. P.; PATEL, A.V.; PATHAK, M.M. Blood levels of ovarian steroids during cyclic stages and anestrus condition of pubertal surti buffalo heifers. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 3, n. 63, p. 296-299, 1993.

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

SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A.; BRUCKMANN, A.; SAUERWEIN, B.; AMSELGRUBER, W. SINOWATZ, F.; GOSPODAROWICZ, D. Basic fibroblast growth factor (location, binding and stimulation of secretion). **Biology of Reproduction**, v. 48, suppl. 1, p. 62, 1993.

SCHWALL RH, GAMBONI F, MAYAN MH, NISWENDER GD. Changes in the distribution of sizes of ovine luteal cells during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 5, p. 911-918, 1986.

SOARES, R.; GUO, S.; SCHMITT, F. Role of the estrogen antagonist ICI 182,780 in vessel assembly and apoptosis of endothelial cells. **Ultrastructural pathology**, v. 27, p. 33-39, 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. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2235-2243, 1993.

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

STOUFFER, R. L.; MARTINEZ-CHEQUER, J. C.; MOLSKNESS, T. A.; XU, F.; HAZZARD, M. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 567-575, 2001.

STOUFFER, R. L. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 2, p. 99-117, 2003.

SUGINO, N.; KASHIDA, S.; TAKIGUCHI, S.; KARUBE, U.M.; KATO, H. Expression of factor of growth of vascular endothelial and your receivers in the luteum of human body during the menstrual cycle and in early pregnancy. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.10, n.85, p. 3919-24, 2000.

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

VERNON, R.K.; SPICER, L.J. Effects of basic Fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating Hormone-Induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 2696-2702, 1994.

YAMAMOTO, S.; KONISHI, I.; TSURUTA, Y.; NANBU, K.; MANDAI, M.; KURODA, H.; MATSUSHITA, K.; HAMID, A.A.; YURA, Y.; MORI, T. Expression of vascular endothelial growth factor during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. **Gynecological Endocrinology**, v. 11, n. 6, p. 371-381, 1997.

YAN, Z.; NEULEN, J.; RACZEK, S.; WEICH, H.A.; KECK, C.; GRUNWALD, K.; BRECKWOLDT, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/ Vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. **Gynecological Endocrinology** Germany, v.3, n.12, p. 149-153. 1998.

YOSHIDA, A. ; ANAND-APTE, B.; ZELTER, B.R. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. **Growth Factors**, v. 13, n. 1-2, p. 57-64, 1996.

ZAYED, A.E.; MEGAHEDE, G. A. Morphological and functional observations on the cyclic corpus luteum in Egyptian buffaloes (*Bus bubalis*). **Assiut Veterinary Medicine Journal**. V. 40, n. 80, p. 1-16, 1999.

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

ZIMMERMANN, R.C.; HARTMAN, T.; BOHLEN, P.; SAUER, M.V.; KITAJEWSKI, J. Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. **Microvascular Research**, v.1, n.62, p. 15-25, jul. 2001.

WEBB, R.; WOAD, K. J.; ARMSTRONG, D.G. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 21, p. 277-285, 2002.

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

WISSING, D.; MOURITEZ, H.; EGEHLAD, M.; POIRIER, G.G.; JAATTELA, M. Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A₂ in tumor necrosis factor-induced apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 5073-5077, 1997.

WULFF, C., DICKSON, D.E. DUNCAN, W.C., FRASER, H.M. Angiogenesis in the human corpus luteum: simulated early pregnancy by HCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. **Human Reproduction**, v. 16, n. 12, p. 2515-2524, p. 2001.

WULFF, C.; WILSON, H.; RUDGE, J.; WIEGEND, S.; LUNN, S.; FRASER, H. M. Luteal angiogenesis: prevention and intervention by treatment with vascular endothelial growth factor trap A-40. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 3377-3386, 2001.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; KNOKE, I.; PITZEL, L; SPIESS, S. Luteotropic and luteolytic effects of oxytocin in the porcine corpus luteum. **Adv Exp Med Biol**, v. 395, p. 495-506, 1995..