

Marcello de Aguiar Rodrigues Cembranelli

**Eficiência de duas doses de D-Cloprostenol
para sincronização de estro em bovinos nas
diferentes fases do ciclo estral**

Alfenas-MG
2005

Marcello de Aguiar Rodrigues Cembranelli

**Eficiência de duas doses de D-Cloprostenol
para sincronização de estro em bovinos nas
diferentes fases do ciclo estral**

Dissertação apresentada a Universidade
José do Rosário Vellano, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Alfenas-MG
2005

Cembranelli, Marcello de Aguiar Rodrigues

Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro em bovinos nas diferentes fases do ciclo estral. / -- Marcello de Aguiar Rodrigues Cembranelli. -- Alfenas: Unifenas, 2005.

34p.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Velano.

1. bovinos.

CDU: 636.2 (043)

A Deus, que me ilumina e me guia e em todos os dias da minha vida.

A Sibeli minha esposa, que me incentivou e me apoiou com muito amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes**, que me acolheu como orientado, pela sua experiência científica e pelos seus ensinamentos e competência inigualáveis.

A **Marilu Martins Gioso**, pela ajuda no desenvolvimento de todo o trabalho e paciência nas análises dos resultados.

Aos meus colegas de mestrado, principalmente ao Médico Veterinário **Camilo F. Canella** e ao graduando **Braitner Mathias Pereira**, pela força que sempre me deram nas horas difíceis.

Ao meu pai e minha mãe, que são os responsáveis por quem eu sou hoje, sempre me apoiando na minha formação com muito sacrifício, amor e carinho.

A **Biotran** e seus funcionários, que me ajudaram na realização do experimento e no desenvolvimento de todo o trabalho.

À **Agropecuária Casa Branca e Fazenda Água Limpa**, que cedeu os animais para o experimento.

À **Kauê Agropastoril Ltda**, que me dispensou em vários dias de serviço para que eu pudesse realizar este projeto.

A todos que, direta e indiretamente, se envolveram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
SUMMARY	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Ciclo estral	2
2.2 Foliculogênese	3
2.3 Corpo Lúteo (CL)	4
2.3.1 Formação do CL	5
2.3.2 Função luteal	6
2.3.3 Regulação da função luteal	8
2.3.4 Luteólise	9
2.3.5 Regressão funcional e morfológica do CL	10
2.3.6 Refratariedade do CL inicial	12
2.4 Prostaglandina	13
2.5 Sincronização	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Local e animais	16
3.2 Tratamentos	16
3.3 Análise estatística	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Eficiência de diferentes doses de d-cloprostenol em fêmeas bovinas no período sensível do ciclo estral	18
Tabela 2: Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro para animais entre os dias 06 e 08 do ciclo estral	20
Tabela 3: Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro para animais entre os dias 09 e 11 do ciclo estral	21
Tabela 4: Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro para animais entre os dias 12 e 14 do ciclo estral	22
Tabela 5: Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro para animais entre os dias 15 e 17 do ciclo estral	22
Tabela 6: Intervalo aplicação do cloprostenol ao início do cio de acordo com o dia do ciclo estral	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das etapas da rota esteroidogênica aguda em uma célula luteal genérica.....	07
Figura 2 - Eficiência média de 75µg de d-cloprostenol para sincronização de estro em bovinos de acordo com o dia do ciclo estral	19
Figura 3 - Eficiência média de 150µg de d-cloprostenol para sincronização de estro em bovinos de acordo com o dia do ciclo estral	19
Figura 4 - Eficiência do d-cloprostenol para sincronização de estro em bovinos nos diferentes dias do ciclo estral	20

RESUMO

Cembranelli, Marcello de Aguiar Rodrigues. **Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro em bovinos nas diferentes fases do ciclo estral**. Orientador: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes. Alfenas: Unifenas, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal).

A sincronização do estro em bovinos através da aplicação de agentes luteolíticos, como prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) ou seus análogos, tem sido amplamente utilizadas em programas reprodutivos e de transferência de embriões (TE). Os agentes luteolíticos causam lise do corpo lúteo, resultando na manifestação de estro. Consiste de um método prático e de menor custo quando comparado a outros métodos de sincronização e apresenta índices de fertilidade comparados ao natural, desde que não haja interferências de fatores como condição corporal, nutrição, entre outros. O objetivo deste trabalho foi o de verificar a eficiência da aplicação de diferentes doses (normal e reduzida) de um agente luteolítico, via intramuscular, em diferentes fases do ciclo estral (diestro), bem como o tempo de responsividade (intervalo aplicação-estro). O experimento foi realizado na fazenda Água Limpa, no município de Fama-MG, no período de novembro de 2004 a janeiro de 2005. Foram realizadas 288 aplicações de D-Cloprostenol sódico, visando à sincronização de estro em novilhas mestiças, utilizadas como receptoras num programa de transferência de embriões. Os animais foram observados em estro natural, classificados e distribuídos para o experimento de acordo com o dia do ciclo. O grupo A correspondeu aos animais que estavam, no dia da aplicação, do 6° ao 8° dia do diestro, considerando dia 0 como o estro. O grupo B, do 9° ao 11° dia do diestro. O grupo C, do 12° ao 14° dia do diestro e o grupo D, as novilhas do 15° ao 17° dia do diestro. Todos os grupos foram subdivididos em dois, onde alguns animais receberam 75 μ g (1ML) de D-cloprostenol sódico, via intramuscular e o restante recebeu 150 μ g (2ML) de D-cloprostenol sódico também intramuscular. Para eficiência total, a dose de 2ML, apresentou melhor resposta ($p < 0,01$) de 77,15% contra 50,55% da dose de 1ML. Os grupos A (6 a 8) e B (9 a 11) apresentaram resultados próximos ($p < 0,05$) da eficiência total, sendo de 66,67% para 2ML e 36,36% para 1ML, no grupo A, e 78,43% e 56,67%, respectivamente, para o grupo B. Portanto com melhor eficiência para o grupo que recebeu 2ML. Os grupos C (12 a 14) e D (15 a 17) não mostraram diferença ($p < 0,05$) na eficiência entre os grupos ou entre as doses, com os seguintes resultados: 73,58% (2ML) e 52,00% (1ML) para o grupo C e 73,58% e 52,00%, respectivamente, para o grupo D. Para intervalo aplicação ao início do estro encontraram-se os seguintes resultados: o grupo A apresentou intervalo médio de 58 horas, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos demais grupos, que resultaram em 73,43 horas para o grupo B; 79,06 para o grupo C e 75,23 para o grupo D. O presente estudo mostrou que a utilização da dose de 1ML de D-cloprostenol sódico é semelhante à dose de 2ML a partir do 12° dia do ciclo. Portanto, a utilização da subdose pode ser mais uma alternativa para se reduzir custos em um programa de TE, desde que se conheça o momento da fase do ciclo estral das receptoras envolvidas no programa.

Palavras chaves: Bovino, Ciclo estral, D-Cloprostenol, Sincronização.

SUMMARY

Cembranelli, Marcello de Aguiar Rodrigues. **Efficiency of two doses of D-cloprostenol for synchronization of estrus in bovines in the different phases of the estrous cycle.** Orientation: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes. Alfenas: Unifenas, 2005. Dissertation (Master Science Animal).

The synchronization of estrus in bovines through the administration of luteolytic agents, as prostaglandin F₂α (PGF₂α) or its analogues, has been widely used in reproductive programs of embryos transfer (ET). The luteolytic agents cause lysis of the corpus luteum, resulting in the manifestation of estrus. It is a practical and less expensive method when compared to other synchronization techniques, and exhibits fertility indexes which are similar to the natural ones, since there is no interference of factors such as bodily condition and nutrition, among others. The purpose of this paper was to verify the efficiency of the intramuscular administration of different doses (normal and reduced) of a luteolytic agent in different phases of the estrous cycle (dioestrus), and the responsiveness time (interval administration-estrus). The experiment was carried out in Água Limpa farm, in the city of Fama, State of Minas Gerais, Brazil, in the period between November 2004 and January 2005. Two-hundred and eighty-eight applications of sodic D-cloprostenol were made with the aim of synchronizing the estrus in crossbred heifers used as receptors in an embryo-transfer program. The animals were observed in the natural estrus, classified and grouped in accordance with the day of the cycle. Group A corresponded to the animals injected on the 6th-8th day of dioestrus, day 0 being considered as estrus. Group B, on the 9th-11th day. Group C, on the 12th-14th day, and Group D, the heifers on the 15th-17th day of dioestrus. All the groups were subdivided into two: some animals received 75 µg (1ML) of sodic d-cloprostenol by intramuscular injection; others received 150 µg (2ML). As for total efficiency, the 2ML dose showed a better response ($p < 0,01$), 77,15%, than the 1ML dose, 50,55%. Groups A (6 to 8) and B (9 to 11) showed nearly equal values ($p < 0,05$) for total efficiency: 66,67% for 2ML and 36,36% for 1ML in Group A, and 78,43% and 56,67%, respectively, for Group B. Groups C (12 to 14) and D (15 to 17) showed no differences ($p < 0,05$) in efficiency between groups or doses: 73,58% (2ML) and 52,00% (1ML) for Group C, and 73,58% and 52,00%, respectively, for Group D. For interval application to the beginning of estrus, the following results were found: Group A presented an average interval of 58 hours, significantly differing ($p < 0,05$) from the other groups: 73,43 hours for Group B; 79,06 hours for Group C, and 75,23 hours for Group D. The present study demonstrated that the dose of 1ML of D-cloprostenol is similar to the dose of 2ML as of the 12th day of the cycle. Therefore, a subdose may be an alternative to reduce costs in an ET program, since one knows the stage of the estral cycle of the females.

Key words: bovine, estrous cycle, D-cloprostenol, estrus synchronization

1. INTRODUÇÃO

A sincronização do estro tem sido amplamente utilizada, tanto em casos de monta natural ou inseminação artificial, como na técnica de transferência de embriões (TE), para a qual é imprescindível (COSTA, HENRY, WHITHE, 2000). A técnica de TE teve um grande impulso quando foi descoberta a necessidade de sincronização de estro entre doadora e receptora. A prostaglandina F2 α ou seus análogos sintéticos têm sido amplamente utilizados em programas reprodutivos e de transferência de embriões. Trata-se de um método prático, de baixo custo e que resulta em um estro de fertilidade comparada ao natural. No ano de 2003 foram gastos R\$ 12 milhões com prostaglandinas, sendo que correspondera a 15% dos custos de um programa de TE. Na tentativa de redução de custos, têm-se buscado alternativas para que o procedimento de sincronização não represente uma parcela tão significativa dentro dos custos totais de um programa de TE. Uma das práticas, amplamente difundida mas que não apresentou embasamento científico, foi a aplicação de uma dose reduzida de luteolítico na fêmea que seria sincronizada (NOVAES, VALE FILHO, CARVALHO, 1991; BARSUTO-KUBA et al., 1992; FERNANDES, TORRES, COSTA, 1994). O uso de doses reduzidas parece ser uma alternativa para redução dos custos da TE, pois esta técnica utiliza grandes quantidades da droga para sincronização de receptoras. Existe um ponto de estrangulamento, principalmente na sincronização de estros entre doadoras e receptoras, onde estas últimas devem se situar num período do ciclo estral em que o corpo lúteo esteja sensível ao agente luteolítico. Esta situação induziu a grande variação na eficiência dos diferentes protocolos, além do tempo de resposta dos animais, fazendo com que parte das receptoras sincronizadas não entrasse em estro ou não se situasse dentro do período em que pudessem receber o embrião (FERNANDES, TORRES, COSTA, 1994). Diante disto, objetivou-se neste estudo avaliar os efeitos da aplicação de um agente luteolítico em diferentes fases do ciclo estral, bem como a utilização de subdose pela mesma via de aplicação e nas mesmas fases do ciclo estral, para avaliação de eficiência na sincronização de estro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ciclo Estral

MacMillan & Burke, (1996) relataram que o ciclo estral em bovinos apresenta a duração média de 21 dias e é regido pela interação e antagonismo endocrinológico de hormônios secretados pelo hipotálamo, hipófise, gônadas e útero. O ciclo estral pode ser dividido em duas fases distintas: a fase folicular ou estrogênica, que se estende do proestro ao estro, culminando na ovulação, e a fase luteínica ou progesterônica, que compreende o metaestro e o diestro terminando na luteólise. Segundo Madureira & Barufil., (2000), o período de formação inicial do corpo lúteo é denominado metaestro, e dura cerca de seis dias. O corpo lúteo secreta progesterona, que inibe a manifestação de cio e a ovulação. Esta fase, conhecida como diestro, dura aproximadamente 11 dias, e em caso da vaca não estar gestante, o corpo lúteo sofre luteólise. Segue-se a isso, em virtude da ausência de progesterona, um rápido desenvolvimento final do folículo pré-ovulatório e sua maturação, resultando em cio e ovulação. O intervalo entre dois estros é chamado ciclo estral. O desenvolvimento folicular durante o ciclo estral em vacas, ocorre em padrão de ondas, variando de uma a quatro ondas por ciclo, uma onda dura de 7 a 10 dias (MACMILLAN, SEGWAGWE, PINO, 2003). Elas surgem nos dias 0 a 1 e dias 9 a 11 nos casos de duas ondas por ciclo, e nos dias 0 a 1, 8 a 9 e 15 a 16 em animais com três ondas por ciclo, existindo porém, uma maior incidência de ciclos com duas ondas foliculares (SIROIS & FORTUNE, 1988; FORTUNE, 1993). Na primeira onda folicular, o folículo dominante ou ovulatório atinge seu desenvolvimento máximo, porém não terá condições de ovular, entrando em atresia em função de não ter suporte hormonal para o processo de ovulação, devido à alta concentração de progesterona produzida pelo corpo lúteo neste período do ciclo estral (HENRICKS, DICKEY, NISWENDER, 1970; HAFEZ & HAFEZ, 2004). Assim, uma nova onda folicular se inicia, e o folículo dominante da onda anterior permanece inativo no ovário por 4 a 5 dias, quando então gradativamente desaparece. Na segunda onda de crescimento folicular, que se inicia no meio do ciclo, o folículo dominante, que será selecionado em torno do dia 17 a 18, terá condições de ovular, visto que, a partir destes dias, os níveis de progesterona estarão reduzidos devido ao processo de luteólise. As interações hormonais têm papel fundamental na atresia ou

na ovulação do folículo dominante de uma onda de crescimento folicular (MIHM & AUSTIN., 2002). Cada onda folicular é dividida em quatro fases: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação (DISKIN, AUSTIN, ROCHE, 2002). A emergência de uma onda é estimulada por um aumento transitório nas concentrações plasmáticas de hormônio folículo estimulante (FSH) (ADAMS, MATTERI, GINTHER, 1992). Após o pico de FSH e o declínio dos níveis desse hormônio, ocorre atresia dos folículos subordinados recrutados no início da onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1997). A taxa de crescimento folicular é semelhante para todos os folículos recrutados até o momento da seleção. No entanto, na fase de seleção, um folículo passa a apresentar maior taxa de crescimento que os demais (DISKIN, AUSTIN, ROCHE, 2002). A partir do desvio, fica estabelecida a dominância folicular, na qual o folículo dominante permanece crescendo continuamente, enquanto os subordinados diminuem sua taxa de crescimento e entram em atresia (GINTHER et al., 2001). Concentrações crescentes de estradiol induzem o comportamento de estro e em combinação com o declínio na concentração de progesterona, desencadeiam o pico de hormônio luteinizante (LH). Durante a dominância ocorre a queda das concentrações de FSH e aumento da secreção de LH, quando, a partir deste momento, o folículo selecionado passa a ser LH- dependente, até que ocorra a ovulação ou atresia (GINTHER et al., 2001).

2.2. Foliculogênese

De acordo com Sirois & Fortune, (1988) um número significativo de folículos primordiais são formados nos ovários férteis entre 120 e 140 dias de gestação em bovinos e estes permanecem em "estádio de descanso" devido aos efeitos do fator inibidor de maturação do oócito, até o animal entrar em puberdade, quando voltam a processar gradualmente os folículos. O controle do restabelecimento do crescimento e do desenvolvimento (SWENSON & DUKES, 1988) do folículo primordial não é conhecido, exceto pelo fato que é independente de hormônios gonadotrópicos. De tempos em tempos, um grupo de folículos é selecionado e iniciam o desenvolvimento, tornando-se folículos antrais; no entanto, muitos se tornam atrésicos. Os folículos antrais que continuam o crescimento formam uma cavidade, o antro, que é preenchido pelo líquido

possui vários fatores que regulam o desenvolvimento do folículo, como a inibina, que atua diminuindo os níveis de FSH circulante e indiretamente suprime o crescimento folicular; a folistatina, que suprime o crescimento folicular, e a activina, que atua se contrapondo à ação da inibina, como citado por Woolums & Peter (1996a). Para Swenson & Dukes, (1988) a síntese de receptores para FSH e estrógeno na granulosa e para LH na teca é necessária para que os folículos entrem na fase dependente de hormônio. O FSH influencia a produção de estrógenos pelas células da granulosa, convertendo os androgênios produzidos na teca, sob influência do LH, em estrogênios. O FSH em associação com estrógeno induz o aumento de receptores para o LH na granulosa, enquanto o LH diminui o número de receptores de FSH na granulosa. Com isso, o folículo é preparado para responder à onda de LH. Quando a secreção estrogênica atinge certo limiar, é disparada indiretamente uma onda pré-ovulatória de LH, que influencia a produção intrafolicular de substâncias associadas à ruptura do folículo, como PGE, PGF, corpúsculos multivesiculares e relaxina. Na ovulação, o oócito é expelido em uma massa de células, chamadas *cumulus oophorus*, devido à contração do ovário e folículo estimulada pela PGF2 α ovariana (SWENSON & DUKES, 1988). Sirois & Fortune (1988) indicam correlação negativa entre o tamanho do folículo dominante, no início da regressão do corpo lúteo, e o tempo decorrido até o estro. O folículo destinado a ovular seria o maior folículo nos ovários, apenas um dia antes ou no dia do estro (MATTON et al., 1981; PIERSON & GINTHER, 1987a; PIERSON & GINTHER, 1987b). A seleção ocorre 3 a 4 dias antes da ovulação e, além do estímulo ao desenvolvimento no folículo ovulatório, parece existir também um bloqueio no desenvolvimento dos demais, pois a resposta destes às gonadotrofinas exógenas é menor após a seleção (PIERSON & GINTHER, 1987b). Após a ovulação forma-se o corpo hemorrágico e a PGE2 remodela as células, ocorrendo à hipertrofia e a luteinização das células da granulosa, que se tornam células luteínicas e produzem progesterona (WOOLUMS & PETER, 1996b).

2.3. Corpo Lúteo

O Corpo Lúteo (CL), participa da maioria dos processos reprodutivos. Ele é um órgão endócrino transitório formado a partir do folículo ovulatório rompido e sua função

primária é a produção de progesterona, a qual prepara o endométrio para implantação e manutenção da gestação inicial. Se a prenhez não ocorrer, o CL regride para permitir o início de um novo ciclo estral (WILTBANK, 1994; SAKAMOTO et al., 1995; MILVAE, HINCKLEY, CARLON, 1996; MILVAE, 2000; WEBB, WOAD, ARMSTRONG, 2002).

2.3.1. Formação do CL

O CL se desenvolve a partir das células residuais do folículo pré ovulatório. Antes da ovulação, o folículo é organizado em camadas distintas. As células da granulosa e o oócito são separados das outras camadas foliculares pela membrana basal, acima da qual encontram-se a teca interna e externa (MILVAE, HINCKLEY, CARLON, 1996). Os capilares de vascularização ao redor dos folículos estão presentes na teca interna e externa, mas estão ausentes na camada de células da granulosa, porque a membrana basal atua como uma barreira para a vascularização. O LH, por sua vez, causa a degradação da parede folicular e libera o oócito na ovulação (BAO & GARVERICK, 1998). Após a ovulação, há a diferenciação das células foliculares residuais. As células da teca interna, associadas a capilares atravessam a membrana basal que está degradada e invadem a camada da granulosa e do tecido folicular remanescente, levando ao desenvolvimento do CL, que inicia a produção de progesterona em altas concentrações (NISWENDER et al., 2000). Vários autores, citados por Niswender et al. (2000), mencionam que os fatores de crescimento de fibroblasto (FGF), hormônio do crescimento (GH), LH e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), são provavelmente os reguladores primários da proliferação de fibroblastos, pequenas células luteínicas e células endoteliais. O CL contém populações de células heterólogas que incluem as grandes células esteroideogênicas luteais (LLC) e as pequenas células esteroideogênicas (SLC), que são células luteinizadas da granulosa e teca folicular, respectivamente (FIELDS & FIELDS, 1996). Estes dois tipos celulares perfazem aproximadamente 70% do volume do CL (O'SHEA, RODGERS, D'OCCHIO, 1989). As SLC compreendem 26% (em número) das células luteais; perfazem aproximadamente 28% do volume do CL, e são conhecidas pela produção de progesterona quando estimuladas pelo LH. Já as LLCs compreendem apenas 3% (em número) das células luteais, mas perfazem aproximadamente 40% do volume (FIELDS & FIELDS, 1996) e não são dependentes do

LH para secretar progesterona, embora apresentem receptores para tal, segundo Chegini et al. (1991). Além do tecido folicular diferenciado, durante a reorganização celular para a formação do CL, há a migração de células endoteliais, fibroblastos (CHANNING, 1969) e constituintes do sistema imunológico, como os leucócitos (PATE, 1994). Estas células apresentam-se intermisturadas em uma extensão em que as grandes células luteínicas (LLC) e as pequenas células luteínicas (SLC), são unidas proximamente umas com as outras. Um aspecto importante do desenvolvimento do CL inicial é a taxa de crescimento tecidual e a proliferação celular. Este crescimento é o resultado de um aumento de tamanho de aproximadamente duas vezes das LLC (o número permanece constante), aumento do número de SLC, fibroblastos e células endoteliais (FARIN et al., 1986). Estudos mais recentes têm começado a esclarecer a complexidade da regulação da formação, função e regressão luteal, usando as ferramentas da biologia molecular (INSKEEP, 2000). Hormônios luteotrópicos não só regulam o crescimento luteal, mas também suportam a habilidade do CL em secretar progesterona. Estes hormônios incluem LH, hormônio de crescimento (GH), prolactina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), ocitocina, prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂ (PGI₂) (HANSEL & BLAIR, 1996a; NISWENDER et al., 2000). A prolactina não parece ser essencial para a função luteal durante o ciclo estral de vacas, segundo Hoffman et al. (1974), embora o CL apresente receptores para ela. No entanto, o LH é requerido para manter uma expressão normal de RNAm e presumivelmente proteínas, codificando proteína esteroideogênica regulatória aguda (StAR), complexo citocromo P450 scc (crivador da cadeia luteal) e 3β hidroxisteroide desidrogenase isomerase (3β-HSD). Já o GH está envolvido na codificação da StAR e P450 scc, mas não parece desempenhar função para a 3β - HSD (JUENGEL et al., 1995). Entretanto, ambos, LH e GH, são necessários para o desenvolvimento luteal normal e manutenção da função do CL maduro (MILVAE, HINCKLEY, CARLON, 1996; NISWENDER et al., 2000).

2.3.2. Função Luteal

A onda pré-ovulatória de LH resulta na luteinização das células da granulosa e tecais, altera a rota esteroideogênica, e então a progesterona é o primeiro hormônio esteróide produzido por cada um destes dois tipos celulares após a luteinização

(NISWENDER et al., 2000; NISWENDER, 2002). A diferenciação das células capazes de produzir progesterona em altas taxas é realizada por um aumento da expressão de enzimas necessárias para a conversão de colesterol em progesterona, isto é, o complexo citocromo P450_{ssc} e a 3 β -HSD, além da diminuição da expressão de enzimas que convertem progesterona a estrógenos, isto é, 17 α -hidroxilase citocromo P450 e citocromo P450 aromatase, (BAO & GARVERICK, 1998). Existem três principais rotas para que o colesterol esteja presente como substrato para a síntese de progesterona: as lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e os ésteres de colesterol. Uma vez dentro das células, as lipoproteínas são quebradas por enzimas para que o colesterol possa entrar na rota esteroidogênica (MILVAE, HINCKLEY, CARLON, 1996; NISWENDER, 2002). A entrada do LDL nas células luteais ocorre pela presença de receptores que estimulam a endocitose. Já a entrada do HDL se dá por intermédio de uma proteína de adesão disposta na membrana plasmática, por mecanismos ainda não definidos, mas parece não ser mediada por receptores. Krisans (1996) afirma que o substrato para a esteroidogênese é o colesterol. Sob condições normais, a maioria do colesterol é sintetizada pelo fígado e transportado para os tecidos esteroidogênicos, como a córtex adrenal, folículos, corpos lúteos e testículos, na forma de lipoproteínas. Uma vez o colesterol tenha sido transportado para a matriz mitocondrial, a enzima citocromo P450_{ssc} atua na conversão do colesterol a pregnenolona, que é transportada para o retículo endoplasmático liso (REL), onde a 3 β -HSD converte a pregnenolona em progesterona. Após a síntese, a progesterona deixa a célula aparentemente por difusão, não havendo evidências de que ela possa ser estocada em altas quantidades no interior do tecido luteal (FIELDS & FIELDS, 1996; NISWENDER et al., 2000; NISWENDER, 2002).

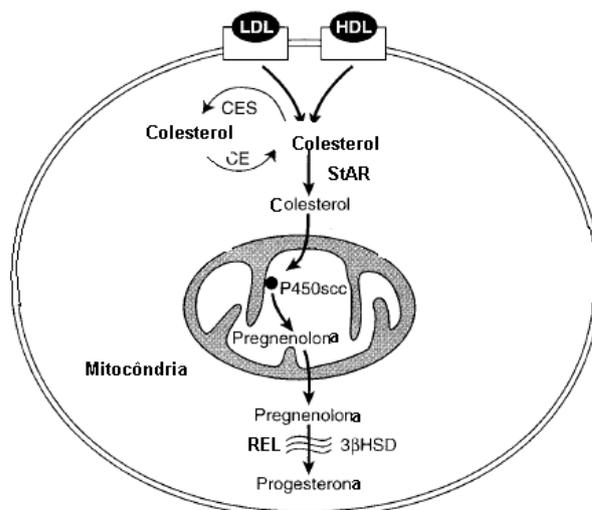


FIGURA 1 - Representação das etapas da rota estereoidogênica aguda em uma célula luteal genérica. Fonte: Adaptado de NISWENDER, 2002.

2.3.3. Regulação da função luteal

Vários autores comentam que concentrações fisiológicas de LH aumentam a secreção de progesterona das SLC, mas o LH não aumenta a secreção nas LLC, embora se saiba que os dois tipos celulares apresentam receptores para este hormônio (CHEGINI et al., 1991). Em células de tecidos luteais bovinos, a adesão do LH ao seu receptor das SLCs ativa a adenilato-ciclase, conduzindo ao aumento das concentrações de AMPc (HANSEL & BLAIR, 1996a) que finalmente ativa a PKA (proteína quinase A). Esta proteína, por sua vez, aumenta a quantidade de StAR fosforilada com um resultante aumento do transporte de colesterol para o interior da membrana mitocondrial para futura síntese de progesterona. Entretanto, a ativação da PKA nas SLCs aumenta a liberação do colesterol, mas não influencia nas concentrações de RNAm ou nas atividades da P450_{scc} ou 3β - HSD. Portanto, os efeitos estereoidogênicos agudos do LH não parecem modular as três principais enzimas envolvidas na síntese de progesterona, mas sugere-se que o LH aumenta a produção de P₄ (progesterona) pela facilitação do transporte do colesterol através da célula para o interior da membrana mitocondrial (WILT BANK, M.C. BELFIORE, NISWENDER, 1993). Este processo parece ser o passo chave na estimulação hormonal aguda da síntese de progesterona (MURPHY, 2000) pelas SLCs.

Outros hormônios luteotrópicos participam na regulação da secreção de progesterona. O GH, segundo Libermann & Schams (1994), e o IGF-I, de acordo com Sauerwien et al. (1992), aumentam a secreção de progesterona no tecido luteal. Ambos os receptores para IGF-I e GH estão localizados nas LLCs; portanto, podem ser importantes para a manutenção de altos níveis basais de progesterona secretados nessas células. Adicionalmente, o GH pode influenciar indiretamente a função luteal pelo aumento da expressão de IGF-I, que é produzido (sintetizado) pelo CL e estimula a secreção de progesterona, além de inibir a morte celular, permitindo a manutenção do peso luteal (LUCY et al., 1993). Um agente parácrino, cujos receptores estão presentes em ambas as células luteínicas, é a prostaciclina (PGI_2) (CHEGINI et al., 1991). Produzida pelo CL, ela estimula o aumento da secreção de progesterona, pela ativação do AMPc e por consequência a PKA, no CL bovino (MILVAE, HINCKLEY, CARLON, 1996). Além da PGI_2 , a prostaglandina E_2 (PGE_2) também apresenta receptores nas células luteínicas, onde são mais freqüentes nas LLCs. Presumivelmente, as PGE_2 também aumentam os níveis de AMPc, levando ao aumento da secreção de progesterona pelo CL (HANSEL & BLAIR, 1996a). Corroborando, Murphy (2000), também comenta que nas SLCs os hormônios luteotrópicos, como o LH e PGI_2 , PGE_2 aumentam a síntese de progesterona por aumentar em níveis de AMPc e ativação da PKA, estimulando a produção esteroidogênica pelo aumento do transporte de colesterol para a P-450 scc.

2.3.4. Luteólise

O CL de um ciclo estral nos bovinos é uma estrutura dinâmica com um período de vida de aproximadamente 17-18 dias (OHTANI et al., 1998). Evidências para a regressão morfológica do CL são observadas mais precocemente pelo dia 14 do ciclo estral e no dia 200 em vacas gestantes. Vacas leiteiras parecem apresentar o processo de regressão luteal (17º dia) mais tardio que vacas de corte (14º dia), podendo ser explicado por um maior e mais ativo CL, o que provoca um maior intervalo interovulatório (FIELDS & FIELDS, 1996). Na ausência da prenhez, o CL sofre a regressão morfológica e funcional (MILVAE, 2000). Este processo, denominado luteólise, é caracterizado pela cessação da produção de progesterona e perda dos componentes celulares, incluindo redução do

suprimento vascular, proliferação do tecido conjuntivo, aumento da desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (CARLSON et al., 1982; PATE, 1994; MIYAMOTO, 1996). Ao alcançar o CL, o efeito luteolítico da PGF2 α ocorrerá pela associação com os receptores presentes na membrana plasmática das LLCs, iniciando a cascata de rotas intracelulares que resultam na luteólise e conseqüentemente levando a inibição da síntese de progesterona (ANDERSON et al., 2001). O LH (não relacionado ao pico pré-ovulatório) alcança os receptores endometriais, induzindo um aumento da produção de AMPc e inositol fosfato (IP₃). Esta elevação da concentração de segundo mensageiro (AMPc) desencadeia o aumento das concentrações de cicloxigenase endometrial (COX-2) e seu metabólito. Tem sido proposto que o estradiol dos folículos pré-ovulatórios determinam a liberação de ocitocina na hipófise, que estimula uma pequena quantidade de PGF2 α uterina. Esta PGF2 α inicia uma onda de feedback positivo implicando na liberação adicional de ocitocina luteal e PGF2 α proveniente do CL e do útero. É proposto que a liberação de PGF2 α luteal amplifica o sinal luteolítico de uma maneira autócrina ou parácrina. Adicionalmente, a ocitocina liberada pela ação da PGF2 α adere aos receptores, causando um aumento da atividade da PKC (proteína quinase C) (NISWENDER et al., 2000). Assim, dois mecanismos podem existir para a amplificação dos pulsos de PGF2 α . Primeiro, a PGF2 α uterina pode estimular a liberação de ocitocina pelo CL, a qual estimula a produção de mais PGF2 α uterina dentro de minutos de iniciação do pulso (BAIRD, 1992). Em adição, a PGF2 α uterina pode estimular a produção de PGF2 α intraluteal (TSAI & WILTBANK, 1997).

O decréscimo da concentração de progesterona é mais comumente devido à diminuição da capacidade esteroideogênica das células luteais individuais e do fluxo sangüíneo luteal (MILVAE, R. A., HINCKLEY, S. T., CARLON, J. C., 1996). É conhecido que a PGF2 α liberada no útero é proveniente da ativação da ocitocina luteal via fosfolipase C (PLC) (BURNS et al., 1997). Porém, outra linha de pesquisadores informa que as gonadotropinas participam ativamente no desencadeamento da síntese de PGF2 α pelo útero. Isto porque receptores para gonadotropinas têm sido encontrados por toda a extensão do trato reprodutivo, como no endométrio, sendo que as maiores concentrações destes receptores foram mensuradas durante a fase luteal, (SHEMESH, 2001). Por fim, Hansel & Blair (1996b) comentam que a ocitocina desempenha um papel secundário na regressão dos CLs bovinos. Isto porque, com base na microdiálise in vivo, estes pesquisadores observaram que a regressão luteal parece ocorrer normalmente na ausência de concentrações mensuráveis de ocitocina. Entretanto, apesar da intensa

investigação sobre o real mecanismo pelo qual a $PGF2\alpha$ causa regressão luteal, este ainda permanece parcialmente indeterminado (MILVAE, 2000).

2.3.5. Regressão Funcional e Morfológica do CL

Embora a $PGF2\alpha$ possa iniciar a luteólise funcional, mecanismos adicionais parecem ser necessários para a luteólise completa. A luteólise é um evento contínuo, e a distinção entre mudanças funcionais e estruturais faz-se necessária para entender o processo como um todo. As grandes células luteínicas provavelmente respondem inicialmente ao sinal luteolítico, mas as comunicações entre grandes e pequenas células, bem como entre células luteais e não luteais, parecem ser requeridas para a regressão completa se proceder (PATE, 1994; SPINOSA, GÓRNIAK, BERNARDI, 1997). A $PGF2\alpha$ atua pela ligação a receptores específicos localizados nas LLCs (ANDERSON et al., 2001) onde se unem à proteína G estimulatória, induzindo a ativação da PLC que, por sua vez, cataliza a hidrólise do PIP (Fosfatidil Inositol Bifosfato) em IP_3 e do diacilglicerol (DAG). O aumento das concentrações citosólicas de IP_3 resultam na liberação de cálcio livre do retículo endoplasmático liso para o compartimento citoplasmático. Este aumento de cálcio e do DAG (localizado na membrana plasmática) estimula a atividade catalítica da enzima Ca^{++} -dependente proteína quinase C (PKC, também localizada na membrana plasmática). Acredita-se que a PKC media muitas ações anti-esteroidogênicas da $PGF2\alpha$ nas LLCs (NISWENDER et al., 2000). Recentes estudos têm demonstrado que as células endoteliais e seus produtos, como a endotelina-1 (ET-1), são requeridos para a manifestação dos efeitos luteolíticos da $PGF2\alpha$ (MILVAE, 2000; PATE & KEYES, 2001). Esta proteína atua como um potente vasoconstritor, inibe a atividade esteroidogênica, reduz o fluxo sanguíneo durante a luteólise inicial pela constrição arteriolar, leva à hipóxia, e por conseguinte à apoptose das células (MILVAE, HINCKLEY, CARLON, 1996; MILVAE, 2000; PATE & KEYES, 2001). A ET-1, que é produzida pelas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, apresenta receptores específicos nas LLCs e SLCs (MILVAE, 2000) e desempenha um papel crucial durante a luteólise induzida pela $PGF2\alpha$ (LEVY et al., 2000), agindo como um mediador/promotor luteolítico local na regressão do CL (OHTANI et al., 1998). Estas condições sugerem que a $PGF2\alpha$ e a ET-1 são

importantes na rápida cascata funcional da luteólise “in vivo”, com uma possível interação entre as células endoteliais e luteais durante a luteólise (OHTANI et al., 1998; MILVAE, 2000; MEIDAN & LEVY, 2002). A principal função das células imunes no CL, neste estágio, é a fagocitose levando à luteólise estrutural (MIYAMOTO, 1996). As células imunológicas produzem citocinas que podem modificar a síntese de progesterona e prostaglandinas pelas células luteais. Podem também apresentar efeitos citotóxicos diretos, e as células mortas são fagocitadas pelos macrófagos. Fatores secretados pelas células luteais podem servir como quimiostáticos para as células imunes, aumentando ou suprimindo suas funções (PATE, 1996). A função dos macrófagos durante a regressão, parece ser primariamente a fagocitose de células luteais degeneradas e a degradação da matriz extracelular. Porém, os macrófagos perfazem três funções durante os estágios iniciais da luteólise: além da fagocitose de células degenerativas luteais, também trabalham na inibição citocina-mediada da esteroidogênese e estimulação da $PGF2\alpha$ pelo CL. As células imunológicas e citocinas também parecem desempenhar um papel na luteólise, regulando a síntese de $PGF2\alpha$, esteroidogênese e fagocitose (NISWENDER et al., 2000). Além destas mudanças estruturais relatadas acima, no CL em regressão, há aumento dramático de metaloproteinases-1 e 2, que estão envolvidas no remodelamento dos tecidos e neste caso podem envolver a morte ordenada do CL, (FIELDS & FIELDS, 1996). Em resumo, a $PGF2\alpha$ causa diminuição do fluxo sanguíneo no ovário e também há queda na produção de progesterona. Parece que o processo de luteólise pode ser primeiramente iniciado pela interação da $PGF2\alpha$ com receptores específicos localizados na membrana plasmática das grandes células (via proteína quinase C/segundo mensageiro que diminuirá a esteroidogênese). Adicionalmente, as ações combinadas da $PGF2\alpha$, a liberação de ocitocina local, bem como a ET-1, podem levar à vasoconstrição, isquemia, hipóxia, quimiotaxia de células imunológicas e, a seguir, a redução dos níveis de progesterona. Esta hipóxia e isquemia levariam não somente à diminuição da secreção de progesterona, mas também à apoptose das células não luteais, primeiramente em células endoteliais, depois parenquimais e por último nos fibroblastos Pate, (1996).

2.3.6 Refratariedade do CL

Nas espécies domésticas e primatas, a regressão do CL possibilita (ativa) o desenvolvimento de um novo folículo pré-ovulatório. No entanto, durante os estágios iniciais do ciclo, que são caracterizados por uma massiva neovascularização, o CL é refratário a uma única aplicação de PGF2 α . Somente nos dias 5 ao 16 após o estro, a PGF2 α exógena pode causar regressão do CL bovino (TSAI & WILTBANK, 1997). Momont (1992) relata que o cloprostenol (análogo da PGF2 α) somente será efetivo a partir do dia sete do ciclo. A regressão luteal causada pela PGF2 α apresenta primariamente sua ação através dos receptores específicos presentes na membrana plasmática das grandes células luteínicas (SAKAMOTO et al., 1995), onde o RNAm destes receptores de PGF2 α é altamente expresso e acumulado nas grandes células em estádios não específicos do ciclo estral (SAKAMOTO et al., 1994; SAKAMOTO et al., 1995; WILTBANK, SHIAO, GINTHER, 1995 e TSAI & WILTBANK, 1998). Porém, a responsividade do CL à PGF2 α aumenta com o tempo, sendo que a afinidade de ligação da prostaglandina aos receptores aumentam 203 vezes dos dias 13 ao 20 do ciclo estral (RAO et al., 1979), apresentando sensibilidade máxima no final da fase luteal (BERARDINELLI & ADAIR, 1989; COLAZO et al., 2002). Portanto, a PGF2 α não irá induzir a luteólise nos primeiros cinco dias do ciclo estral, quando o CL está em fase inicial de desenvolvimento (THATCHER & CHENALT, 1976), embora apresentem RNAm dos receptores para tal. Em adição, a inabilidade de resposta nesta fase também parece ser devida a uma carência de expressão de outros mediadores que levam a esta luteólise (TSAI & WILTBANK, 1998; LEVY et al., 2000). Pate (1994) também comenta que esta refratariedade até o dia cinco do ciclo estral pode não ser atribuída a uma carência de receptores a PGF2 α , e sim pelo fato da PGF2 α não alcançar o CL inicial do ciclo estral, porque o fluxo sanguíneo, nesta fase, aumenta em direção ao útero e diminui para o ovário, em bovinos.

A carência de responsividade do CL inicial não é atribuída a uma deficiência de receptores de alta afinidade à PGF2 α (WILTBANK, SHIAO, GINTHER, 1995) e uma possível explicação para a ausência da regressão de CLs iniciais após a injeção de PGF2 α seria a incompleta vascularização do CL ou incompleta diferenciação dos mecanismos degenerativos nas células luteais. Pode-se sugerir que o tipo de célula que medeia as ações luteolíticas da PGF2 α , possivelmente o endotélio, pode ser não responsivo durante a fase luteal inicial Levy et al., (2000). Concordando com tais afirmações, Meidan & Levy (2002) comentam em sua revisão que a administração da PGF2 α no dia 4 do ciclo estral não é capaz de provocar a luteólise, pois o CL inicial

apresenta falha em aumentar a expressão do gene da ET-1 e seus receptores. Em contraste, ambos os genes são induzidos em CLs maduros, quando expostos à $PGF2\alpha$. Adicionalmente, a prostaglandina produzida pelas células luteais é de grande importância para a completa luteólise. Esta é uma das suposições sobre o CL inicial não ser capaz de sofrer luteólise: ele não é capaz de expressar a PGHS-2 (prostaglandina G/H Synthase-2) que sintetiza a prostaglandina nas grandes células luteínicas (TSAI & WILTBANK, 1997; 1998).

2.4. Prostaglandinas

As prostaglandinas são substâncias orgânicas extremamente potentes que aparecem naturalmente numa grande variedade de tecidos e situações biológicas. Seu nome surgiu quando Von Euler supôs que eram substâncias originadas na próstata, portanto prostaglandinas. Alguns anos mais tarde, Eliasson provou que quase todas as prostaglandinas seminais eram originadas nas vesículas seminais e não na próstata. Mas o nome prostaglandina permaneceu. PGFs são substâncias químicas derivadas do ácido prostanóico que é um ácido graxo hidroxilado, de 20 átomos de carbono com um núcleo ciclopentano, sendo divididas de acordo com sua estrutura e função e produzindo efeitos biológicos diferentes. Existem 4 grandes grupos: A, B, E, F. Segundo Hafez & Hafez, (2004), as mais bem descritas e provavelmente as mais extensas são as derivadas do ácido araquidônico, um ácido graxo essencial precursor das séries E, potentes bronco-dilatadores, e as séries F, potentes bronco-constritores. As prostaglandinas possuem um campo de atividade bastante grande, mas seu efeito fisiológico predominante é provocar contrações e relaxamento dos músculos lisos em diversos órgãos. Para a medicina veterinária, a propriedade mais importante é a capacidade de algumas prostaglandinas da série F provocarem a regressão morfológica do corpo lúteo. Sua função principal na reprodução é provocar a regressão do CL, através do processo de luteólise (TSAI & WILTBANK, 1997). Portanto, pode-se dizer que a $PGF2\alpha$ é responsável pelo tempo de vida do CL (SPINOSA, GÓRNIK, BERNARDI, 1997), causando sua regressão morfológica e funcional (KOTWICA, BOGACKI, REKAWIECKI, 2002), sendo que a regressão funcional precede a regressão morfológica (VIANA et al., 1999). Em

ruminantes domésticos, somente uma pequena quantidade da PGF2 α uterina alcança o ovário, por difusão da veia uterina para a artéria ovariana (mecanismo denominado de contra corrente), com mais de 95% da PGF2 α sendo metabolizada a componentes inativados como a 15-ceto-13, 14-diidroprostaglandina F2 α , por uma única passagem pelos pulmões (FERREIRA & VANE, 1967). Na década de setenta, vários compostos análogos à PGF2 α natural foram sintetizados, como o cloprostenol ou racemato – DL – cloprostenol (COOPER e FURR, 1974). Mais recentemente foi apresentado o D-cloprostenol, que é bastante ativo e potente em doses mais reduzidas, além de reduzir os efeitos secundários, quando administrados por via intramuscular. Um pulso inicial de prostaglandina, mesmo sendo de baixa magnitude, pode potencialmente iniciar os mecanismos para que as grandes células luteínicas produzam consideráveis concentrações locais de PGF2 α (TSAI & WILTBANK, 1997). Isto pode explicar porque uma pequena quantidade de PGF2 α uterina é capaz de iniciar a regressão luteal. O D-Cloprostenol é um líquido altamente viscoso de coloração marrom, parcialmente solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos. Possui vida média de 1 hora e 37 minutos.

2.5 Sincronização

A sincronização do estro em bovinos através da aplicação de agentes luteolíticos, como prostaglandina F2 α (PGF2 α) ou seus análogos, tem sido amplamente utilizada em programas reprodutivos e de transferência de embriões (COSTA, HENRY, WHITHE, 2000). Os agentes luteolíticos causam lise do corpo lúteo, levando à manifestação de estro. De acordo com (FERNANDES, TORRES, COSTA, 1994), é um método prático e de menor custo quando comparado a outros métodos de sincronização e que apresentam índices de fertilidade comparados ao natural, desde que não haja interferências de outros fatores, como condição corporal, nutrição, entre outros. Contudo, a eficiência da sincronização pode ser uma das limitações deste procedimento, principalmente em programas que utilizam a sincronização em larga escala, se não houver observação prévia dos cios. A aplicação de PGF2 α ou seus análogos, de acordo com Gregory & Rodrigues (1982), deve ser utilizada durante a fase luteal. (ELVING, BRAND, BOIS, 1975) dizem existir uma relação direta da intensidade de cio após o tratamento com

PGF2 α e dia do ciclo estral quando da medicação. Em bovinos de raças européias, a administração de PGF2 α tem induzido elevadas taxas de manifestação de estro, 70 a 90% segundo Tanabe & Hann, (1984); no entanto, em *Bos indicus* geralmente não são observadas essas taxas. Para melhorar a eficiência de sincronização do cio com PGF2 α , foram desenvolvidos protocolos com duas aplicações seqüenciais, intervaladas de 11 a 14 dias (JACKSON et al., 1979; MADUREIRA & BARUFI, 2000). Outro sistema proposto é a observação de estro por 5 dias, com aplicação de PGF2 α no dia 6, para evitar tratar animais com CL não responsivo ao tratamento (STEVENSON, KOBAYASHI, THOMPSON, 1999). Madureira & Barufi. (2000) propõem que se observem as fêmeas por 5 dias, aplicando então a PGF2 α . Deverá ocorrer uma concentração de estros nos 5 dias subseqüentes à aplicação do produto. Para o sucesso deste esquema, as fêmeas devem estar ciclando e deverá haver uma boa observação de cio. Outro esquema proposto por Madureira & Barufi. (2000) consiste em introduzir touros junto às fêmeas por um período de 5 dias e aplicar PGF2 α em todas as fêmeas no quinto dia, independente de terem sido cobertas ou não. Estas irão se encontrar no metaestro quando da aplicação da PGF2 α e não estarão sujeitas à luteólise, e poderão entrar normalmente em gestação. Então se retira o touro se for praticar a inseminação artificial, uma vez que deverá ocorrer uma concentração de estros após o tratamento. Outro esquema seria detectar, por palpação retal ou ultra-sonografia a presença de CL, aí então aplicar-se a PGF2 α ,somente nestas fêmeas. Entretanto, o CL pode ser erroneamente diagnosticado, por palpação retal, em cerca de 20% dos casos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do experimento e animais

O experimento foi realizado na fazenda Água Limpa, no município de Fama, no sul de Minas Gerais, no período de novembro de 2004 a janeiro de 2005. Foram utilizadas 288 novilhas mestiças, com peso corporal superior a 350 kg. Estes animais foram avaliados anteriormente, por palpação retal e vaginoscopia, visando-se à detecção de alguma anomalia que pudesse prejudicar a fertilidade. Os animais foram observados em estro natural e classificados para o experimento de acordo com o dia do cio. Foram realizadas 288 aplicações de D-cloprostenol sódico¹, visando à sincronização de estro em novilhas, utilizadas como receptoras num programa de transferência de embriões. Para tais aplicações, foram utilizadas agulhas e seringas descartáveis. O local de escolha para aplicação foi à região glútea, pela via intramuscular.

3.2. Tratamentos

Os animais foram selecionados de acordo com o dia do ciclo estral (entre 06º e 17º dia) e distribuídos em 4 grupos, devidamente identificados através de brinco numérico na orelha. O grupo A correspondeu aos animais que estavam no dia da aplicação do dia 6 ao 8 do diestro, considerando dia 0 como o estro. O grupo B correspondeu às novilhas que estavam do dia 9 ao 11 do diestro. O grupo C correspondeu a novilhas que estavam do dia 12 ao 14 do diestro e o grupo D as novilhas do dia 15 ao 17 do diestro. Todos os grupos foram subdivididos em dois: alguns animais receberam 75 µg (1ML) de D-cloprostenol sódico via intramuscular e o restante do grupo recebeu 150 µg (2ML) de D-cloprostenol sódico, também aplicado via intramuscular. Após tratamento, os animais foram mantidos em pasto de *Brachiaria decubens*, apenas com suplementação com sal e mineral comercial. Um rufião foi preparado pela técnica de aderência do pênis na

proporção 1:40. As novilhas foram submetidas a 3 observações diárias de estro durante 30 minutos na presença de rufiões. Considerou-se o reflexo de imobilidade como indicativo do estro. Somente foram considerados os animais que manifestaram estro até 96 horas após aplicação.

3.3. Análise estatística

Após toda a fase experimental, os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas e posteriormente dispostos para as análises estatísticas usando-se o programa SAEG - Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (EUCLIDES, 1982). A eficiência dos tratamentos foi avaliada pelo Teste Qui-Quadrado. O tempo de intervalo da aplicação do luteolítico ao estro foi comparado pelo teste de Tuckey (ZAR, 1984).

¹ Lab. Biogenesis

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que, considerando-se os animais nos diferentes dias do ciclo estral, a dose de 150 μ g (2ml) apresentou eficiência superior à de 75 μ g (1ml) ($P < 0,01$), conforme a Tabela 1. Tais resultados diferem dos encontrados por (ALVAREZ et al. (1991); NOVAES, VALE FILHO, CARVALHO, 1991), os quais não observaram diferenças estatisticamente significante entre doses. Tais resultados podem ter ocorrido porque estes autores não distinguiram os animais de acordo com o dia do ciclo estral.

TABELA 1: Eficiência de diferentes doses de D-cloprostenol em fêmeas bovinas no período sensível do ciclo estral.

Tratamento (D-cloprostenol)	Número de aplicações	Observadas em cio	Eficiência (%)
1ML (75 μ g)	91	46	50,55 ^a
2ML (150 μ g)	197	152	77,15 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem a 1% de probabilidade (χ^2)

A diferença observada pode estar relacionada à maior saturação e ativação dos receptores quando se usou dose superior. A PGF2 α atuou primeiramente através dos receptores específicos presentes na membrana plasmática das grandes células luteínicas, causando regressão luteal, onde o RNAm destes receptores foi altamente expressado e acumulado nas grandes células em estágios não específicos do ciclo estral (SAKAMOTO et al., 1995). Para a dose de 75 μ g (Figura1), não houve diferenças de eficiência nos diferentes grupos, ou seja, dias do ciclo estral. Embora os valores absolutos possam ser aparentemente diferentes, não foram notadas diferenças

significativas ($P < 0,05$), provavelmente pelo número reduzido de animais no grupo de $75\mu\text{g}$.

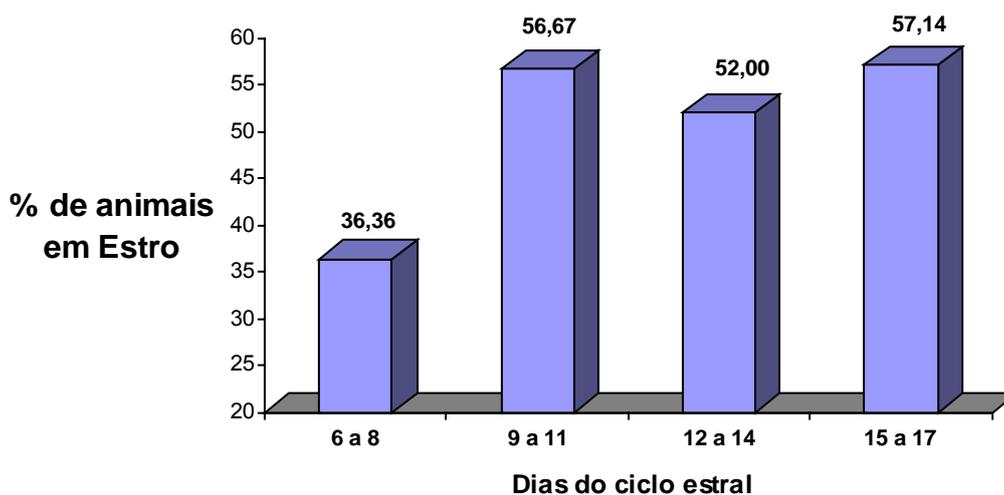


FIGURA 2 - Eficiência média de $75\mu\text{g}$ de D-cloprostenol para sincronização de estro em bovinos de acordo com o dia do ciclo estral ($P > 0,05$).

Para animais que receberam $150\mu\text{g}$ (2ML) (Figura 2), também não foram notadas diferenças nos grupos constituídos por animais nos diferentes dias do ciclo. Esta dose apresentou resultados mais constantes que a de $75\mu\text{g}$ (1ML).

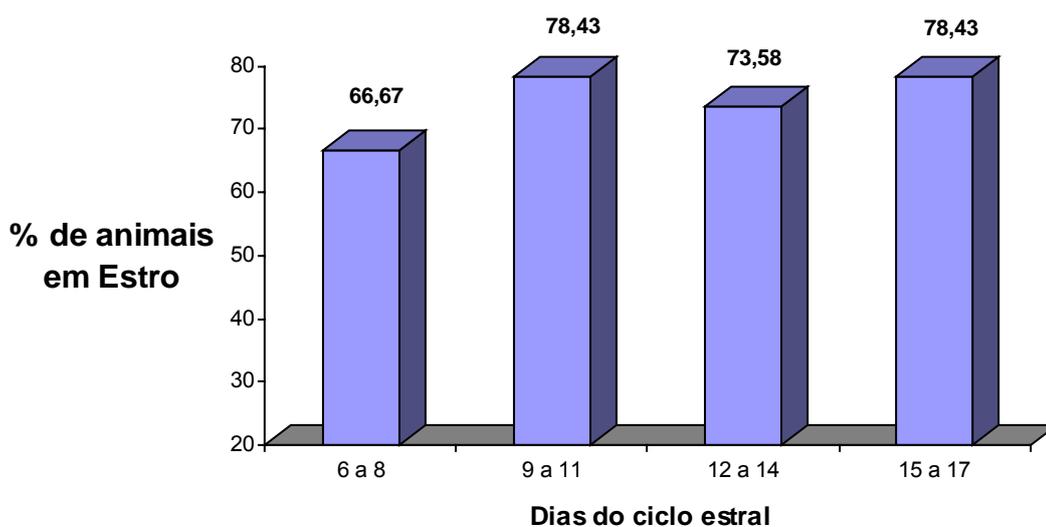


FIGURA 3 - Eficiência média de 150 μ g de D-cloprostenol para sincronização de estro em bovinos de acordo com o dia do ciclo estral ($P>0,05$).

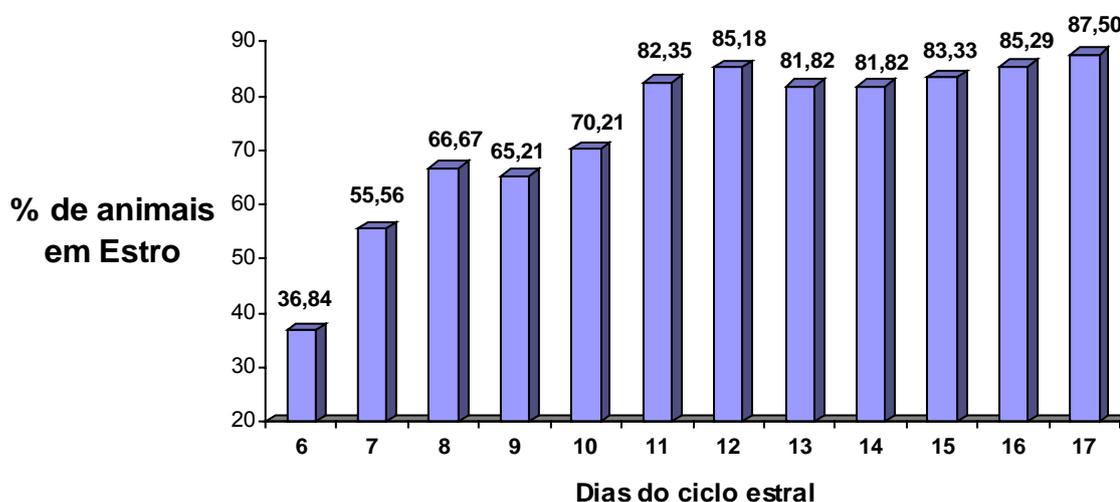


FIGURA 4 - Eficiência do D-cloprostenol para sincronização de estro em bovinos nos diferentes dias do ciclo estral.

A responsividade do corpo lúteo à $PGF_{2\alpha}$ aumentou com o tempo (RAO et al., 1979), apresentando sensibilidade máxima no final da fase luteal (BERARDINELLI & ADAIR, 1989; COLAZO et al., 2002). Situação semelhante foi observada no presente

estudo, onde a partir do 11° dia do ciclo a sensibilidade ao análogo da PGF2 α utilizado foi mais eficiente.

TABELA 2: Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro para animais entre os dias 06 e 08 do ciclo estral.

Tratamento (D-cloprostenol)	Número de aplicações	Observadas em cio	Eficiência (%)
1ML (75 μ g)	22	8	36,36 ^a
2ML (150 μ g)	42	28	66,67 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem a 5% de probabilidade (χ^2)

TABELA 3: Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro para animais entre os dias 09 e 11 do ciclo estral.

Tratamento (D-cloprostenol)	Número de aplicações	Observadas em cio	Eficiência (%)
1ML (75 μ g)	30	17	56,67 ^a
2ML (150 μ g)	51	40	78,43 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem a 5% de probabilidade (χ^2)

No início do ciclo estral, ou seja, animais entre o 6° ao 11° dia do ciclo, a dose de 2 ML foi mais eficiente (Tabela 2 e 3). Isto ocorreu porque o CL estava na fase inicial de desenvolvimento (THATCHER & CHENAULT, 1976), além da carência de receptores em

quantidades suficientes, sendo que estes iriam aumentando com o desenvolvimento do corpo lúteo (RAO et al., 1979), e da pouca expressão nesta fase de outros mediadores que levariam à luteólise (TSAI & WILTBANK, 1998; LEVY et al., 2000). Nas espécies domésticas e primatas, a regressão do CL atavaria o desenvolvimento de um novo folículo pré-ovulatório. Durante os estágios iniciais do ciclo, que são caracterizados por uma massiva neovascularização, o CL foi refratário a uma única aplicação de PGF2 α . Somente nos dias 5 ao 16 após o estro, a PGF2 α exógena pode causar regressão do CL bovino (TSAI & WILTBANK, 1997). Outros pesquisadores, como Momont (1992), relataram que a PGF2 α (cloprostenol) somente seria efetiva a partir do dia sete do ciclo. Pode também estar relacionado, segundo Levy et al. (2000), a uma incompleta vascularização do CL ou incompleta diferenciação dos mecanismos degenerativos nas células luteais. A regressão luteal causada pela PGF2 α apresentou primariamente sua ação através dos receptores específicos presentes na membrana plasmática das grandes células luteínicas (SAKAMOTO et al., 1995), onde o RNAm destes receptores de PGF2 α foi altamente expresso e acumulado nas grandes células em estágios não específicos do ciclo estral (SAKAMOTO et al., 1994; SAKAMOTO et al., 1995; WILTBANK, SHIAO, GINTHER, 1995 e TSAI & WILTBANK, 1998). Pate (1994) comentou que esta refratariedade pode ocorrer porque o fluxo sanguíneo, nesta fase, aumenta em direção ao útero e reduz para o sentido do ovário, em bovinos. Finalmente, existe a suposição de que o CL inicial não foi capaz de sintetizar a prostaglandina nas grandes células luteínicas, por não expressar a prostaglandina G/H synthase2 (PGHS2), conforme Tsai & Wiltbank (1997).

TABELA 4: Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro para animais entre os dias 12 e 14 do ciclo estral.

Tratamento (D-cloprostenol)	Número de aplicações	Observadas em cio	Eficiência (%)
75 μ g	25	13	52,00 ^a
150 μ g	53	39	73,58 ^a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem a 5% de probabilidade (χ^2)

Nas fases mais adiantadas do ciclo, onde a quantidade de receptores para PGF foi máxima, não foram observadas diferenças significativas entre as duas doses (Tabelas

4 e 5), concordando com Tanabe & Hann, (1984) e Etherington et al. (1986), que relataram que os CLs em fases medianas e tardias responderam melhor à sincronização do que animais em fase luteal inicial. O outro ponto importante foi à presença de receptores específicos na membrana plasmática das grandes células luteínicas (SAKAMOTO et al.1995). O que concorda com Rao et al. (1979) e Colazo et al. (2002), que relataram o aumento da responsividade do CL à PGF2 α com o tempo, dos dias 13 ao 20 do ciclo estral, apresentando sensibilidade máxima no final da fase luteal. O período de resposta à prostaglandina em diferentes dias do ciclo estral foi dependente do estágio no qual se encontrava o folículo dominante (KASTELIC, KNOPF, GINTHER, 1990). Os achados ou afirmações dos autores citados foram semelhantes aos encontradas em relação às doses neste experimento.

TABELA 5: Eficiência de duas doses de D-cloprostenol para sincronização de estro para animais entre os dias 15 e 17 do ciclo estral.

Tratamento (D-cloprostenol)	Número de aplicações	Observadas em cio	Eficiência (%)
75 μ g	14	08	52,00 ^a
150 μ g	51	45	73,58 ^a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem a 5% de probabilidade (χ^2)

TABELA 6: Intervalo aplicação do D-cloprostenol ao início do cio de acordo com o dia do ciclo estral.

Tratamento (D-cloprostenol)	Número de aplicações	Intervalo médio (horas)
6 a 8	64	58,00 \pm 17,57 ^a
9 a 11	81	73,43 \pm 18,33 ^b
12 a 14	78	79,06 \pm 18,15 ^b
15 a 17	65	75,23 \pm 17,15 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem a 5% de probabilidade (teste de Tuckey)

Com os resultados da tabela 06, pode-se demonstrar que os animais do grupo que estavam do dia 6 ao 8 do diestro, provavelmente estavam no final da primeira onda, com a luteólise induzida, o folículo dominante em melhor condição de desenvolvimento pode ovular rapidamente, daí o menor intervalo médio de resposta a aplicação do D-cloprostenol ($P < 0,05$). ADAMS (1994) relatou a existência de uma considerável variação do intervalo tratamento ao estro e ovulação, o que foi atribuído ao status da onda folicular no momento do tratamento, ou seja, à população folicular e estágio de desenvolvimento dos folículos (MACMILLAN & HANDERSON, 1983). O grupo do dia 9 a 11 do ciclo estaria no final da primeira onda ou início da segunda, com os folículos iniciando seu desenvolvimento, resultando em um maior intervalo médio aplicação resposta, em relação ao grupo anterior. Aqueles do dia 12 a 14 do ciclo poderiam estar na segunda onda, com os folículos ainda em desenvolvimento. O dia do ciclo estral em que o animal se encontrava ao receber a $PGF2\alpha$ incluiu-se entre os vários fatores capazes de influenciar o intervalo entre aplicação do luteolítico ao estro. O grupo de 15 a 17 provavelmente estaria no meio da segunda onda ou no início da terceira daí o maior intervalo aplicação ao estro.

5. CONCLUSÕES

- Os animais na fase final do diestro, entre os dias 12° e 17°, respondem de forma semelhante, independente das doses, podendo-se utilizar a menor dose.
- A fase em que se encontra a onda de desenvolvimento folicular no momento da aplicação pode afetar o intervalo aplicação- estro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, Woburn, v.41, n.1, p.19-24, 1994.

ADAMS, G.D.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle stimulating hormone in heifers. **Journal Reproduction Fertility**, v.95, p. 627-640, 1992.

ALVAREZ, R.H. et al. The use of lower doses of prostaglandin analogue, cloprostenol, for oestrus synchronization in heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.25, p. 93-96, 1991.

ANDERSON, L.E. et al. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor in the Corpus Luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1041-1047, 2001.

BAIRD, D.T. Luteotropic control of the corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v.28, p. 95-102, 1992.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal Animal Science**, v.76, p.1903-1921, 1998.

BARSUTO-KUBA, V.M. et al. Effect of different routes and doses of PGF₂-alpha in the fertility of F-1 zebu cattle. Proc. Int. Cong. Anim. Reprod. **Anim. Reprod. Sci.**, v.28, n.3, p.305, 1992.

BURNS, P.D. et al. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF_{2 α} synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A₂. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 181-191, 1997.

CARLSON, J.A. et al. Evidence of membrane changes during regression in the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v.110, p.1472-1476, 1982.

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

CHEGINI, N. et al. Cellular distribution and cycle phase dependence of gonadotropin and eicosanoid binding sites in bovine corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 506-513, 1991.

COLAZO, M.G. et al. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.2295, p. 1-16, 2002.

COOPER, M.J.; FURR, B.J. Control of oestrus cycle of heifers with synthetic prostaglandin analogue. **Vet. Rec.**, v.8, n.94, p.61, 1974.

COSTA, D.S.; HENRY, M.; WHITHE, C. Sincronização de cio em vacas zebu com etiproston. **Hora Veterinária**, n.117, p.23-25,2000.

DISKIN, M.G.; AUSTIN, E.J.; ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.72, p. 211-218, 2002.

ELVING, L.A. et al. Oestrus synchronization and fertility in heifers treated with Prostaglandin F2 α . **Tijdschr. Diergeneeskd.** v.100, p.758-762, 1975.

ETHERINGTON, W.G. et al. Pregnancy rates related to stage of estrous cycle at prostaglandin treatment in an embryo transfer recipient herd. **Theriogenology**, v.25, n.6, p.845-853, 1986.

EUCLIDES, R.F. **Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1982. 68p.

FARIN, C.E. et al. Morphometric analysis of cell types in the bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.35, p.1299-1308, 1986.

FERNANDES, C.A.C.; TORRES, C.A.A.; COSTA, E.P. Comparação entre doses e vias de aplicação de cloprostenol para sincronização de estro em bovinos. **Rev. Bras. de Reprod. Animal**, Belo Horizonte, v.18, n.34, p.105-109, 1994.

FERREIRA S.A.; VANE, J.R. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. **Nature**, v.216, p.868-873, 1967.

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

FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.33, p.11-125, 1993.

GINTHER, O.J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.48, p.75-87, 1997.

GINTHER, O.J. et al. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.64, p.197-205, 2001.

GREGORY, R.M.; RODRIGUES, J.L. Efeitos da prostaglandina na sincronização de cios de doadoras e receptoras de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, Belo Horizonte, v.6, n.34, p.9-11, 1982.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed., São Paulo: Manole, 2004. p.102-103- 649.

HANSEL, W.; BLAIR, R.M. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. **Theriogenology**, v.45, p.1267-1294, 1996a.

HANSEL, W.; BLAIR, R.M. The role of lipoxgenase products of arachidonic acid metabolism in bovine corpus luteum function. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 427-429, 1996b.

HENRICKS, D.M.; DICKEY, J.F.; NISWENDER, G.D. Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.2, p.346-351, 1970.

HOFFMAN, B.D. et al. Luteotropic factors in the cow: evidence for LH rather than prolactin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.40, p.77-85, 1974.

INSKEEP, E.K. Cellular and molecular regulation of luteal formation, function, and regression: an introduction (preface). **Biology of Reproduction**, v.63, p.1, 2000.

JACKSON, P.S. et al. Influence of stage of oestrus cycle on the time to oestrus following cloprostenol treatment in bovine. **Theriogenology**, v.12, p.153-167, 1979.

JUENGEL, J.L. et al. Effect of luteinizing hormone and growth hormone on luteal development in hypophysectomised ewes. **Endocrine**, v.3, p.323-326, 1995.

KASTELIC, J.P.; KNOFF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin-F_{2α} treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.23, p.169-180, 1990.

KOTWICA, J.; BOGACKI, M.; REKAWIECKI, R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. **Domestic animal Endocrinology**, v.5341, p;1-10, 2002.

KRISANS, S.K. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. **Annual NY Academic Science**. v.804, p.142-164, 1996.

LEVY, N. et al. Administration of prostaglandinF_{2α} during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. **Biology of Reproduction**, v.63, p.377-382, 2000.

LIEBERMANN, J.; SCHAMS, D. Actions of somatotrophin on oxytocin and progesterone release from the microdialysed bovine corpus luteum in vitro. **Journal of Endocrinology**, v.143, p.243-250, 1994.

LUCY, M.C. et al. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1219-1227, 1993.

MACMILLAN, K.L.; HENDERSON, H.V. Analyses of the variation in the interval of the injection of prostaglandin F_{2α} to estrus as a method of studying patterns of follicular development during diestrus in dairy cows. **Anim. Reprod. Sci**, Amsterdam, v.6, p.245-254, 1983.

MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R. Effects of estrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.307-320, 1996.

MACMILLAN, K.L.; SEGWAGWE, B.V.E.; PINO, C.S. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.327-344, 2003.

MADUREIRA, E.H.; BARUFI, F.B. Sincronização do cio com prostaglandina. Beef point, 2000. Acesso em: <<http://www.beefpoint.com.br>

MATTON, P. et al. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. **J. Anim. Sci.**, Albany, NY, v.52, p.813-820, 1981.

MEIDAN, R.; LEVY, N. Endothelin-1 receptors and biosynthesis in the corpus luteum: molecular and physiological implications. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.287-298, 2002.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.155-166. 2002.

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

MILVAE, R.A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandinF_{2α} in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.1-5, 2000.

MIYAMOTO, A. Intraluteal mechanisms involved in prostaglandinF_{2α}-induced luteolysis in Ewes. **Journal of Reproduction and Development**, v.42, suppl, p.61-63, 1996.

MOMONT, H.W. Influence of day of estrous cycle on response to PGF₂α products: implications for AI programs for dairy cattle. Proc. Int. Cong. Anim. Reprod. **Animal Reproduction Science**, v.28, n.3, p.327, 1992.

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

NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n.1, p.1-29, 2000.

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

NOVAES, A.S.; VALE FILHO, V.R.; CARVALHO, J.C.C. Sincronização de cio em novilhas e vacas holandesas-PB pelo uso de Cloprostenol em dose reduzida via submucosa vulvar. In: CONGRESSO BRAS. REPROD. ANIMAL, 9, 1991, Belo Horizonte. **Anais...Belo Horizonte- MG.**, 1991. p.347.

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

OHTANI, M. et al. Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandinF₂α- induced luteolysis in the cow. **Biology of Reproduction**, v.58, p.103-108, 1998.

PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal Animal Science**, v.72, p.1884-1890, 1994.

PATE, J.L. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1381-1397, 1996.

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

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Follicular population during the estrus cycle in heifers. II. Influence of right and left sides and intraovarian effect of the corpus luteum. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.14, p.177-186, 1987a.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Follicular population during the estrus cycle in heifers. III. Time of selection of the ovulatory follicle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.14, p.177-186, 1987b.

RAO, C.V. et al. Receptors for Gonadotrophin and Prostaglandin F₂α In Bovine Corpora Lutea Of Early, Mid And Late Luteal Phase. **Acta Endocrinologica**, v.91, p.529, 1979.

SAKAMOTO, K. et al. Molecular cloning and expression of a DNAC of the bovine Prostaglandin F₂α receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.3881-3886, 1994.

SAKAMOTO, K. et al. Expression of mRNA encoding the prostaglandinF₂α receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p.99-105, 1995.

SAUERWIEN H. et al. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, p.103-115, 1992.

SHEMESH, M. Actions of gonadotropins on the uterus. **Reproduction**, v.121, p.835-842, 2001.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.39, p.308-317, 1988.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 545p.

STEVENSON, J.S.; KOBAYASHI, Y.; THOMPSON, K.E. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including ovsynch and combinations gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2. **Journal Dairy Science**, v.82, p.506, 1999.

SWENSON, M.J.D. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 10.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.690-694.

TANABE, T.Y.; HANN, R.C. Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandin F2. Influence of stage of cycle at treatment. **Journal Dairy Science**, v.58, p.805-811, 1984.

THATCHER, W.W.; CHENAULT, J.R. Reproductive physiological responses of cattle to exogenous prostaglandin F2 α . **Journal of Dairy Science**, v.59, n.7. p.1366-1375, 1976.

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

TSAI, S.; WILTBANK, M.C. Prostaglandin F2 α regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v.58, p.346-352, 1998.

VIANA, J.H.M. et al. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, p.257-262, 1999.

WEBB, R.; WOAD, D.G.; ARMSTRONG, D.G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. **Domestic animal endocrinology**, v.5339, p.1-9, 2002.

WILTBANK, M.C.; BELFIORE, C.J.; NISWENDER, G.D. Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.97, p.1-7, 1993.

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

WILTBANK, M.C.; SHIAO, D.R.; GINTHER, O. J. ProstaglandinF2 α Receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.52, p.74-78, 1995.

WOOLUMS, A.R.; PETER, A.T. Cistos ovarianos em bovinos. **Reprodução em dia**. Belo Horizonte, v.8, p.3-6, 1996a.

WOOLUMS, A.R.; PETER, A.T. Cistos ovarianos em bovinos II. **Reprodução em dia**. Belo Horizonte, v.9, p.2-4, 1996b.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. Englewood Cliffs: Pratices hall, 1994. 718 p.