

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PROGESTERONA E
EXPRESSÃO DE COX-2, APÓS TRATAMENTO COM
BENZOATO DE ESTRADIOL, ASSOCIADO OU NÃO À
OCITOCINA, NO COMEÇO DA CASCATA LUTEOLÍTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mônica Rodrigues Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2005

NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PROGESTERONA E
EXPRESSÃO DE COX-2, APÓS TRATAMENTO COM
BENZOATO DE ESTRADIOL, ASSOCIADO OU NÃO À
OCITOCINA, NO COMEÇO DA CASCATA LUTEOLÍTICA

por

Mônica Rodrigues Ferreira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em
Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. João Francisco Coelho de Oliveira

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PROGESTERONA E
EXPRESSÃO DE COX-2, APÓS TRATAMENTO COM
BENZOATO DE ESTRADIOL, ASSOCIADO OU NÃO À
OCITOCINA, NO COMEÇO DA CASCATA LUTEOLÍTICA**

elaborada por
Mônica Rodrigues Ferreira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

João Francisco Coelho de Oliveira, Dr.
(Presidente/Orientador)

Kátia Padilha Barreto, Dra. (UFSM)

Paulo Bayard Dias Gonçalves, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 19 de agosto de 2005.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo de bom que me proporcionou durante este tempo que passei em Santa Maria.

Ao Prof. João Francisco Coelho de Oliveira, meu orientador, por todo o conhecimento passado e pela amizade.

Ao Prof. Paulo Bayard, pela ajuda prestada desde o começo.

Ao Prof. Marcelo Cecim que me ensinou os primeiros passos para que o experimento fosse realizado.

Aos colegas de mestrado, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do BioRep, Valério Valdetar Marques Portella Jr., Rosane da Silveira Loguercio e Márcia Machado que me auxiliaram durante esta jornada.

Aos estagiários do BioRep, mas em especial a Gustavo, Janandra, Fernanda, Rafael e Rodrigo, por me auxiliarem durante o experimento e estarem sempre do meu lado.

Aos professores e funcionários envolvidos com o Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela colaboração durante o curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o mestrado.

Ao meu pai e minha mãe pelo auxílio durante os momentos difíceis e por abrirem mão de uma convivência para que o mestrado fosse realizado.

Ao meu avô, que foi para mim um inspiração, no sentido de não desistir nunca de algo que se quer.

À minhas irmãs e familiares que sempre me incentivaram.

À todos os meus amigos, que embora estivessem longe ou perto, me deram força e incentivaram para que este mestrado se realizasse.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram.

1. SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Ciclooxigenase	10
2.2 Ocitocina	12
2.3 Estrógenos	14
2.4 Progesterona	15
3. CAPÍTULO 1: Níveis plasmáticos de progesterona e expressão de COX-2, após tratamento com benzoato de estradiol, associado ou não à ocitocina, no começo da cascata	18
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	33

1. INTRODUÇÃO

A luteólise é uma cadeia de eventos, que culminam com uma diminuição da produção de progesterona pelo corpo lúteo e posterior regressão deste. Com a diminuição da produção de progesterona pelo corpo lúteo (McCRAKEN et al., 1999), ocorre um aumento nas concentrações de benzoato de estradiol, liberado pelos folículos pré-ovulatórios, que estimula a expressão de receptores de ocitocina no endométrio. A liberação desta pela neurohipófise no momento da luteólise, é ocasionada pela diminuição das concentrações plasmáticas de progesterona e o aumento do benzoato de estradiol. Ocorre então um estímulo da produção de prostaglandina pelo útero, acarretando em uma liberação de ocitocina adicional pelo corpo lúteo, e a formação de um “feed-back” positivo que causa um aumento adicional da liberação de prostaglandina (ASSELIN et al., 1997), que é o hormônio responsável pela morte do corpo lúteo.

Os esteróides ovarianos são classificados quimicamente ou com base nas suas principais funções biológicas dentro de três classes: progestágenos, andrógenos e estrógenos (estrone e estradiol-17 β). Os receptores esteróides têm um domínio DNA ligante, seguido de um domínio ligante C-terminal. A ação dos esteróides no ovário ocorre através de seus receptores, por ativação gênica ou por ação não genômica (SCHAMS & BERISHA, 2002). Durante o ciclo estral, a expressão dos receptores esteróides no corpo lúteo (CL) apresenta mudanças regulatórias, sugerindo participação em várias funções biológicas. O CL em fase média (dia 8 ao 12) e tardia (dia 13 ao 16) do ciclo estral e ainda na regressão luteal, apresenta uma “downregulation” do receptor de estradiol α (Re α), possivelmente causada pelos altos níveis de P₄. Em contraste, o receptor de estradiol β (Re β), nas fases tardia e de regressão do CL tem um aumento significativo na sua expressão (BERISHA et al., 2002).

A liberação de prostaglandina ocasionada pela liberação de ocitocina tanto da neurohipófise, quanto do corpo lúteo só é possível, pois o benzoato de estradiol estimula a expressão de receptores de ocitocina no endométrio, em bovinos, por volta do 17^o-18^o dia do ciclo estral (LEUNG & WATHES, 2000). Em ratas pseudogestantes, é observado que receptores de ocitocina estão presentes a partir do 4^o dia de pseudogestação, sendo que atingem seu nível máximo de expressão no 14^o dia (LEFEBVRE et al., 1994), o qual também ocorre a luteólise dos corpos lúteos formados. Em ratas ciclando a expressão dos receptores de ocitocina ocorre durante o proestro, no qual também ocorre o pico do estradiol produzido pelos folículos pré-ovulatórios (LARCHER et al., 1995).

LEUNG & WATHES (2000) cultivando tecido epitelial endometrial de bovinos, coletados entre os dias 15-16 do ciclo estral verificaram que, quando tratado com benzoato de estradiol, este vai ter um aumento da expressão de receptores de ocitocina. Porém após feita a cultura de tecido, ocorre um aumento no epitélio luminal, da expressão dos receptores mesmo sem adição do benzoato de estradiol. Podendo concluir que um aumento da expressão destes, ocorreu espontaneamente, e o benzoato de estradiol apenas aumenta a velocidade desta “up-regulation”, mas não é essencial para este processo.

Tecido epitelial endometrial bovino cultivado “in vitro”, quando tratados com níveis crescentes de ocitocina produziram uma maior quantidade de prostaglandina de uma maneira dose-dependente. A ocitocina aumentou os níveis de ciclooxigenase 2 (COX-2), um precursor da prostaglandina em 70% em relação ao controle (BURNS et al., 2001). Foi constatado que ela ativa os receptores da proteína G, ativando os segundos mensageiros DAG e IP3, aumentando os níveis de cálcio intracelular e estimulando a liberação de prostaglandina endometrial (ASSELIN et al., 1997; BURNS et al., 1998).

Protocolos hormonais objetivando uma sincronização rápida, retorno da atividade cíclica normal e obtenção de índices maiores de fertilidade, apresentam queda das concentrações da progesterona circulante e sincronização do crescimento e ovulação de folículos viáveis (MAPLETOFT et al., 2003). A utilização de esteróides é baseada nas suas funções específicas conhecidas da reprodução. As principais ações da P₄ no útero, como fator de diferenciação do estroma e de estímulo a secreção glandular, determinam um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento precoce embrionário. Ainda, o estado de quiescência no miométrio produzido por esse hormônio, garante a manutenção da gestação. A esperada função da P₄ no trato reprodutivo é alcançada pela prévia exposição aos estrógenos, induzindo receptores de P₄ (RP; NISWENDER et al., 2000). A utilização do benzoato de estradiol nos protocolos de sincronização de cio agregados com a utilização de pessários intravaginais impregnados com progesterona têm sido utilizados para sincronizar o crescimento da onda folicular emergente (WILTBANK et al., 1965) e causar luteólise.

O objetivo do experimento foi avaliar se apenas o benzoato de estradiol pode causar regressão luteal ou se é necessária sua associação à ocitocina e se este mecanismo de regressão ocorre por aumento de expressão de COX-2, utilizando como modelo experimental ratas Wistar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A utilização de espécies variadas de animais como modelo experimental, que apresentam um ciclo biológico menor, para estudo da fisiologia reprodutiva vem sendo testada e aceita à vários anos. A unidade experimental animal melhor é aquela que disponibiliza um menor custo com rações e acomodações, facilidade de manejo e rapidez na visualização das respostas científicas feitas. A utilização de ratos, hoje é bastante aceita e utilizada, pois além de terem um ciclo de vida curto, existem vários tipos de espécies de ratos, inclusive geneticamente modificados, e que proporcionam uma excelente unidade experimental para o estudo do sistema reprodutivo.

A puberdade nas fêmeas começa entre 70-90 dias após o nascimento, sendo que a fertilidade máxima é alcançada entre 100-300 dias. As ratas não têm ovulação induzida, não ocorrendo também a formação de corpos lúteos funcionais, sendo possível um ciclo estral que dura entre 4-5 dias (McCRAKEN et al., 1999). Ele é dividido em proestro, estro, metaestro e diestro. Durante o período pré-ovulatório ocorre o crescimento de folículos e conseqüente aumento na secreção de estradiol, atingindo seus níveis máximos no proestro.

Os níveis plasmáticos de prolactina e LH atingem também o seu mais alto nível durante o proestro, porém à tarde. O corpo lúteo não funcional das ratas tem uma vida de 1-2 dias, isto porque não ocorre um suporte luteotrófico, sendo que as quantidades de progesterona produzidas são baixas, possibilitando assim uma nova ovulação. Havendo um estímulo cervical (coito) a fêmea pode tanto ficar prenha, ou se o macho utilizado for estéril ela entra em pseudogestação, fenômeno no qual a glândula pituitária secreta grande quantidade de prolactina, que mantém o corpo lúteo por 12-14 dias e estimula a produção de progesterona (FREEMAN, 1994).

Após a ovulação os corpos lúteos formados começam uma produção de $20\ \alpha$ hidroxiprogesteronona e de progesterona sendo que são observados dois picos de produção. O primeiro ocorre durante o metaestro e o segundo durante à tarde do diestro. Durante o período de diestro o corpo lúteo formado no ciclo anterior atinge seu tamanho máximo, sendo mantido até o metaestro do ciclo seguinte. Neste período ocorre um segundo pico de produção de progesterona e $20\ \alpha$ hidroxiprogesteronona, a qual é secretada pelas células da granulosa dos folículos pré-ovulatórios e a $20\ \alpha$ hidroxiprogesteronona dos corpos lúteos não funcionais. Após ocorre uma regressão abrupta, coincidindo com a regressão de vasos sanguíneos, aparecimento de áreas de degeneração, infiltrado leucocitário e aumento do estoque de colesterol (FREEMAN, 1994).

O crescimento folicular, em vacas, é caracterizado pelo crescimento de ondas foliculares bem definidas culminando com a ovulação. Durante as ondas foliculares ocorre a seleção, divergência e dominância de folículos. Estes iniciam seu desenvolvimento a partir de 4 mm, sendo recrutados devido a níveis crescentes de hormônio folículo estimulante (FSH). Após o recrutamento começa a seleção desses, sendo que a maioria entra em atresia, destacando-se apenas um folículo, geralmente o de maior diâmetro. O folículo dominante continua seu crescimento, chegando a 12-20 mm, podendo ou não chegar à ovulação. Se houver o desenvolvimento de um corpo lúteo, haverá secreção de progesterona, ocasionando uma regulação negativa do LH (hormônio luteinizante), responsável pela ovulação, levando, portanto, a uma atresia deste folículo. Porém, ocorrendo luteólise durante o período de dominância, este folículo irá ovular (MIHM et al., 2002).

Quando ocorre a ovulação, as paredes do folículo ovulatório se colabam e sobre a influência de LH, fatores angiogênicos e mitogênicos como fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento de fibroblastos e fator de crescimento vascular endotelial, promovem o crescimento do corpo lúteo (McCRAKEN et al., 1999). Este nada mais é que uma glândula transitória que produz progesterona.(QUINTAL-FRANCO et al., 1999).

O corpo lúteo (CL) é formado por dois tipos de células, as grandes, que são derivadas das células da granulosa que circundam o folículo, e as pequenas que são derivadas das células da teca interna (ALILA et al., 1988; CHANNING, 1969). Algumas células pequenas são transformadas em células grandes, quando o corpo lúteo está maduro (ALILA et al., 1984; FARIN et al., 1986). Além das células esteroideogênicas grandes e das pequenas, o CL é composto por células endoteliais, fibroblastos e outras células que migram da circulação sanguínea.

As células do CL são responsáveis pela produção da progesterona, um hormônio esteróide, que estabelece um ambiente uterino favorável para a nidação do embrião, controla as fases progressivas das relações entre embrião-útero e induz a diferenciação endometrial para que o ambiente uterino se mantenha favorável para a nidação e desenvolvimento do embrião (WEITLAUF, 1994). A onda pré-ovulatória ocasionada pela ação das gonadotrofinas (hormônio luteinizante), induz a ovulação e a diferenciação das células foliculares, células da granulosa e da teca, em células luteinizadas, capazes de produzirem altos níveis de progesterona. A diferenciação das células capazes de produzir progesterona em altas taxas é acompanhada pelo aumento da expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em progesterona, e diminuição da expressão da enzima que converte progesterona em esteróides (BAO & GARVERICK, 1998).

A regressão luteal ocorre em dois estágios, primeiramente ocorre um decréscimo na produção de progesterona (McGUIRE et al., 1994), sendo esta considerada luteólise funcional, após ocorrendo uma involução da glândula em si, com morte celular e perda da estrutura, chamada luteólise estrutural (PATE, 1994; AROSH et al., 2004). O corpo lúteo é uma glândula que aumenta sua habilidade de produção de progesterona e seu tamanho durante seu crescimento. Uma vez atingido o máximo potencial ele mantém sua função durante um determinado tempo, que vai de acordo com a espécie estudada, e regride caso não ocorra uma gestação (NISWENDER et al., 2000). A redução de progesterona no fim da fase luteal, promove uma diminuição do bloqueio dos pulsos de GNRH/LH, ocorrendo assim um recrutamento de folículos e conseqüente aumento de estrógeno, marcando o início de um novo ciclo estral (McCRAKEN, et al., 1999).

A prostaglandina parece ser o principal agente luteolítico, agindo na corrente sanguínea do corpo lúteo através da endotelina 1, causando uma vasoconstrição das arteríolas que fazem a irrigação do corpo lúteo. Parece que a hipóxia das células luteais causa uma liberação ainda maior desta proteína, aumentando ainda mais a vasoconstrição e conseqüentemente diminuindo a produção de progesterona. É sabido que tanto “in vivo” quanto “in vitro” a prostaglandina estimula a liberação pelas células luteais de endotelina 1 (NISWENDER et al., 2000). Ela também aumenta a disponibilidade de citocinas, como o FasL, um receptor de morte, que aumenta diretamente a quantidade de caspase 8, após se ligar com o receptor de membrana, levando à ocorrência de apoptose celular do corpo lúteo (CARAMBULA et al, 2002).

2.1. CICLOOXIGENASE

A prostaglandina endoperoxidase sintetase H (PGHS) ou ciclooxigenase (COX) é uma enzima essencial que transforma o ácido aracdônico e o oxigênio em PGH₂, um precursor da prostaglandina. Existem duas isoenzimas a ciclooxigenase 1 e a 2 (COX-1 e -2). Em sua estrutura elas são homodiméricas, contendo uma cadeia heme, proteínas glicosiladas e dois sítios catalíticos. A COX-1 pode ser encontrada em todos os tecidos, sendo uma enzima constitutiva, em contraste a COX-2 é considerada uma enzima indutiva, sendo que pode ser facilmente induzida em fibroblastos, monócitos e células do ovário. O gene da COX-1 tem um tamanho de 22 kilobases e 11 éxons, enquanto o da COX-2 apresenta 8 kilobases e 10 éxons, sendo situados em cromossomos diferentes (SMITH et al., 1996).

A COX-1 geralmente está ligada a funções homeostáticas, enquanto a COX-2 está relacionada ao desenvolvimento e progressão de várias condições patológicas. Ratos com nocaute para o gene da COX-1 apresentam um prolongamento do tempo de gestação, sendo que ratas submetidas à cesariana, depois do tempo normal de gestação tiveram seus filhotes normalmente. Ratas nocautes para o gene da COX-2 apresentam deficiência na ovulação e na implantação de embriões (LOFTIN et al., 2002, DAVIS et al., 1999; SMITH et al. 1996).

Ratas homozigotas nocautes para o gene da COX-2 apresentaram ciclo estral irregular e quando colocadas com machos férteis não emprenharam, mesmo quando tratadas com hCG e PMSG. Estas ratas também apresentam níveis sanguíneos de hormônio folículo estimulante (FSH) significativamente maiores que os animais normais, além de que após tratamento das ratas com hCG e PMSG não houve alteração das concentrações de prostaglandina E2 (PGE2) nos animais homozigotos deficientes do gene da COX-2. Estas ratas quando tratadas com prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) ou PGE2, tiveram ovulação e formação de corpo lúteo normais (DAVIS et al., 1999; SMITH et al., 1996).

O ácido aracdônico (AA), que é um ácido graxo essencial, é o precursor das prostaglandinas associadas com os processos reprodutivos, como a $PGF_2\alpha$ e a PGE2. A fosfolipase A2 (PLA2) retira o ácido aracdônico das membranas dos fosfolídeos. Existem três formas da PLA2, a iPLA2, que independe de Ca^{2+} , retirando somente o essencial para manter a integridades das membranas. A PLA2 dependente de cálcio estimula a produção ciclooxigenase, pois a quantidade de ácido aracdônico retirada das membranas dos fosfolípidios é maior que a utilizada para o remodelamento das membranas celulares, porém para que haja produção de COX é necessário que além de um acúmulo de AA e tenha isomerases PGH/PGE. A PLA2 secretada e induzida ocasiona um aumento no estímulo de liberação de AA, para a formação de COX-2 induzida, amplificando a expressão para as células vizinhas (FITZPATRICK & SOBERMAN, 2001; SMITH et al., 1996).

As prostaglandinas exercem seu papel através de receptores de membranas, da superfamília de receptores com sete domínios transmembrânicos, (ANDERSON et al, 2001) acoplados à proteína G, designados EP para as PGE e FP para a PGF. Os receptores FP agem através da fosfolipase C, através do segundo mensageiro inositol tri fosfato envolvido na liberação de Ca^{2+} intracelular e do diacilglicerol, que é um ativador da proteína quinase C. A fosfolipase A e C hidrolisam as membranas dos fosfolípidios, liberando ácido aracdônico, que será utilizado como substrato para a produção de prostaglandinas. Em vacas os receptores FP têm uma maior afinidade com seu ligante entre os dias 14 e 21 do ciclo estral, coincidindo com o período de luteólise, enquanto em ratas a afinidade e capacidade destes receptores não

mudam do dia 4 até o dia 10 de pseudogestação (WRIGHT et al., 1980). Em bovinos e camundongos foi observado a presença de receptores FP no corpo lúteo (ANDERSON et al., 2001).

Em ovinos a expressão de COX-2 ocorre nas células epiteliais e miometriais do tecido glandular endometrial (WU et al. a, 1997), localização similar aos receptores de estrógenos (WU et al. b, 1996). Foi verificado também um controle direto da expressão desta pelo benzoato de estradiol ($p < 0,01$). Quando avaliado a proteína, os tratamentos estradiol e progesterona+estradiol ocasionaram um aumento na quantidade de proteína COX-2, no endométrio (WU et al., 1997). Demonstrando que pode haver um efeito direto do benzoato de estradiol sobre a liberação de prostaglandina, pelo aumento da expressão e proteína de COX-2.

A prostaglandina em ratos diminuiu a síntese de progesterona, a atividade de PLA2 e a expressão de proteína aguda reguladora de esteroidogênese (STAR). Ela causa uma diminuição de progesterona plasmática quando administrada em animais com altos níveis de prolactina endógena (OLSON et al., 2001).

Utilizando tecido luteal de ovinos tratados com prostaglandina foi observado que quando o corpo lúteo produz $PGF_2\alpha$ adicional, para que ocorra luteólise, ela aumenta as quantidades de RNAm entre 4-6 horas após o tratamento e entre 12-24 horas ocorre um máximo acúmulo da proteína COX-2. “In vitro” estes tecidos luteais, quando tratados com ionóforos de cálcio ou com ativador de proteína quinase C (PKC), este resultado é idêntico aos dos tecidos tratados com $PGF_2\alpha$, sendo que as células luteais grandes são as que expressam mais a COX-2 (TSAI & WILTBANK, 1997).

A $PGF_2\alpha$ exógena induz a expressão de COX-2 nas células luteais grandes, redução na liberação intra-luteal de P_4 e um agudo incremento na liberação luteal de ocitocina no CL de bovinos. Possivelmente, aumenta também a liberação de PGE2 regulada pela COX-2, que catalisa o primeiro passo na síntese de prostaglandinas (HAYASHI et al., 2003). Em porcas a $PGF_2\alpha$ também regula a expressão de $ER\alpha$, $ER\beta$, RP, além de regular a esteroidogênese através da P450 scc e de aromatase, aumentando os níveis de estradiol intraluteal (DIAZ & WILTBANK, 2004).

2.2. OCITOCINA

A ocitocina é um nonapeptídeo sintetizado a partir de um precursor de alto peso molecular, nos neurônios magnocelulares do hipotálamo e células luteais, onde é

“empacotado” em grânulos secretórios, sendo posteriormente clivado em ocitocina e neurofisina. A ocitocina se ligam aos seus receptores endometriais, que em ovinos são expressos a partir do dia 14 e em vacas têm sua expressão aumentada entre os dias 15-17 do ciclo estral (JENNER et al., 1991), fazendo com que ocorra uma liberação pulsátil de $\text{PGF}_2\alpha$ e conseqüente regressão luteal (ROBINSON et al., 1999).

Em ratos e humanos foi verificado que os principais promotores para a síntese e liberação de ocitocina são os receptores de estrógenos α e β , além do ácido retinóico. Porém o lugar onde o estradiol mais induz a expressão do gene da ocitocina é no epitélio endometrial. Além disso a expressão de receptores de alta e baixa afinidade existente nas células do endométrio podem ocorrer por baixos níveis de colesterol, que estabilizariam os receptores, como um modulador alostérico (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001).

“In vitro” a ocitocina aumentou os níveis de COX-2 em 70% em relação ao controle além de IP3 e de cálcio intracelular, porém um aumento significativo não foi observado em relação à expressão de fosfolipase A2 (BURNS et al., 2001). Foi constatado que ela ativa os receptores da proteína G, ativando os segundos mensageiros DAG e IP3, aumentando os níveis de cálcio intracelular e estimulando a liberação de prostaglandina endometrial (ASSELIN et al., 1997; BURNS et al., 1998).

Em vacas a aplicação de ocitocina exógena causa regressão do corpo lúteo prematura. Porém o fato de que ocitocina exógena só estimula liberação de $\text{PGF}_2\alpha$, ao redor do dia 14 do ciclo estral, época esperada que ocorra regressão do corpo lúteo, se dá devido à expressão cíclica dos receptores de ocitocina endometriais. O corpo lúteo dos bovinos possui receptores para $\text{PGF}_2\alpha$, contudo a afinidade desses receptores está relacionada ao período do ciclo, entre o 13° ao 20° dia do ciclo estral, quando há um aumento da afinidade entre a $\text{PGF}_2\alpha$ e os seus receptores (RAO et al., 1979).

Tecidos uterinos de vacas ciclando foram cultivados na presença de benzoato de estradiol, sendo observado uma “up regulation” de receptores de ocitocina (LEUNG & WATHES, 2000). Em novilhas pré-púberes, utilizando tecidos cultivados de endométrio e cérvix foi verificada a presença de receptores de ocitocina. Eles já estão expressos a partir de 3 meses de idade, porém quando desafiados, antes da puberdade, com ocitocina, não ocorre uma liberação de prostaglandina, nem quando as células estão na presença de ácido aracdônico, provavelmente devido à não pré exposição a progesterona (FUCHS et al., 1998).

Em ratos ocorre um aumento na expressão dos receptores de ocitocina durante o metaestro e o proestro, assim como um aumento na afinidade destes receptores para com seu

ligante. O aumento da expressão destes ocorre pelo aumento do estradiol, produzido por folículos pré-ovulatórios, pelo menos durante o proestro. Em ratas ovariectomizadas e tratadas com E2, fazendo-se um cootratamento com progesterona ocorre uma redução na afinidade da ocitocina com seu receptor (LARCHER et al, 1995).

A partir de um modelo proposto de controle neuroendócrino da luteólise, é visto que quando ocorre uma diminuição da produção de progesterona pelo corpo lúteo, vai haver uma “up regulation” de receptores de ocitocina endometriais ocasionada pelo estradiol, que também iria estimular pulsos geradores de ocitocina pelo hipotálamo. Porém o mecanismo pelo qual o estradiol retorna a ter ação nos tecidos endometriais e hipotalâmicos, estimulando o pulso gerador de ocitocina não é conhecido. Alguns estudos indicam o envolvimento do óxido nítrico como mediador da ação de neurotransmissão central nos neurônios contendo ocitocina (JAROSZEWSKY & HANSEL, 2000).

2.3. ESTRÓGENOS

Os estrógenos são hormônios esteróides originariamente isolados das gônadas e placenta, exercendo efeito negativo e positivo no eixo hipotalâmico-hipofisiário (DICZFALUSY & FRASER, 1998). O principal hormônio produzido por folículos é o estradiol 17β (E2). Em bovinos o estradiol parece ter um papel sistêmico, pois animais que receberam uma subdose deste hormônio, no ovário, não apresentaram diferença significativa do grupo controle. Enquanto animais que receberam o tratamento intramuscular apresentaram uma regressão do folículo dominante (BÓ et al, 2000).

Na vaca, junto com a inibina, ele é responsável pelo controle da secreção de FSH. O E2 bem como em humanos, ratos e suínos, também é secretado no corpo lúteo (CL). Ele aumenta a atividade da prostaglandina sintetase, aumenta a expressão de fosfolipase A2, a liberação de ácido aracdônico, principal precursor das prostaglandinas e controla a ação da proteína StAR, que carrega o colesterol para dentro da mitocôndria (DIAZ et al., 2002).

Existem dois tipos de receptores de estrógeno, o receptor α e o β . A expressão destes receptores em diferentes partes do ovário está relacionada com os níveis circulantes de P_4 . No corpo lúteo, a maior expressão de $ER\alpha$ é encontrada em animais com altos níveis plasmáticos de P_4 , o que também está associado com a prenhez. A presença do $RE\alpha$ no ovário indica uma função local para produção ou ação do estradiol. Entretanto a exata função do $ER\alpha$ no ovário bovino não é exata e parece ser dependente das variações do ciclo estral (VAN DEN BROECK et al., 2002b). Em vacas no primeiro ciclo pós-parto, com a presença do corpo lúteo

de vida curta, este corpo lúteo apresenta uma maior expressão de RE β , indicando regressão luteal. Quando tratados com progesterona estes animais apresentam uma maior expressão de RP endometriais e de um bloqueio de RE β (LOGUERCIO, 2005).

Inicialmente em ovelhas a progesterona e o estradiol controlam a liberação de prostaglandina pelo endométrio. Em ratas o estradiol aumenta a capacidade de ligação da ocitocina ao seu receptor (McCRAKEN et al., 1999). Em um sistema de microdialise de corpos lúteos de bovinos, LIEBERMANN & SCHAMS (1994) verificaram que o estradiol na liberação de progesterona causa um efeito inibitório entre os dias 15 e 18 do ciclo estral. Já em relação à ocitocina ela aumenta a liberação desta durante a fase luteal inicial.

O estradiol também causa um aumento na expressão de receptores de progesterona, estradiol e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Sendo que esta cai durante a fase luteal (MEIKLE et al., 2001). Animais no primeiro ciclo estral pós-parto, tendem a ter um ciclo estral curto, sendo caracterizado pela luteólise precoce do corpo lúteo. MANN & LAMMING (2000), observaram que estes animais apresentam níveis baixos de estradiol pré-ovulatório, apresentando um aumento na afinidade dos receptores de ocitocina com seu ligante. Quando estes animais foram submetidos a um aumento de progesterona e desafiados com ocitocina, foi observado um aumento na liberação de prostaglandina. Sendo existente uma correlação entre níveis de estradiol e secreção de prostaglandina.

Existe uma relação entre o estradiol e ocitocina presente em folículos antes e depois da ovulação. Antes do pico de LH, quando os níveis de estradiol são altos no líquido folicular, ocorre uma inibição da secreção de ocitocina pelas células da granulosa. Enquanto após o pico de gonadotrofinas, os níveis de estradiol diminuem e os de ocitocina aumentam (VOSS & FORTUNE, 1993). Sendo que os receptores de RE α estão presentes nos folículos terciários, porém em menor concentração, além de células da teca, do estroma superficial e profundo, túnica albugínea e superfície do epitélio. (VAN DEN BROECK et al., 2002b). A mais alta expressão de ER α nas células da teca e do estroma em comparação com as células foliculares, indica efeito indireto do estrógeno no desenvolvimento e função folicular por interações estroma/epitélio.

2.4. PROGESTERONA

A progesterona é um hormônio esteróide, produzido pelo corpo lúteo de animais ciclando e placenta de animais em gestação. Durante a fase luteal ocorre um aumento dos estoques de lipídios endometriais, uma inibição direta não genômica nos receptores de

ocitocina uterinos em ratos (GRAZZINI et al., 1998), uma “up-regulation” dos receptores de ocitocina pelo estradiol e diminuição da expressão de mucinas (MUC-1) (CHEON et al., 2002).

Os receptores de progesterona (RP) em bovinos, estão distribuídos amplamente no ovário, localizados no CL e células foliculares, indicando função intra-folicular desse hormônio; superfície do epitélio e células do estroma superficial e profundo (VAN DEN BROECK et al., 2002a), e no endométrio, epitélio luminal e carúncula (KIMMINS & MACLAREN, 2001). A menor expressão de RP nas células luteais em relação as foliculares, indica um efeito de “down regulation” local da P₄. Durante a prenhez, a redução da expressão destes receptores está relacionada ao longo período de exposição a P₄ luteal. Animais que apresentam uma maior quantidade de progesterona plasmática, apresentam uma menor expressão de RP no corpo lúteo (VAN DEN BROECK et al., 2002a), mostrando que a progesterona é capaz de regular seu próprio receptor (BOOS et al, 1996).

A expressão de receptores de progesterona (PR) em camundongos foi observada por GAVA et al (2004), na tarde do proestro, tanto nas células da teca quanto da granulosa, que apresentam as duas isoformas de receptores de progesterona, sendo que estes estão presentes também em folículos antrais e pré-antrais. A expressão de receptores da isoforme A, esta relacionada com a regulação dos receptores de progesterona pelo estradiol no endométrio (KURITA et al., 2000). Somente a isoforme B do receptor está presente no corpo lúteo. A luteólise em ratos ciclando, parece ocorrer através de uma regulação dos receptores de progesterona, nas células endoteliais, pelo estradiol. Sendo que a progesterona liberada pelos folículos pré-ovulatórios parece aumentar a ação luteolítica da prolactina (GAYTAN et al., 2000).

Experimentos têm evidenciado que a P₄ produzida no CL atua também de forma autócrina, na regulação da produção de ocitocina, prostaglandinas e estrógenos no corpo lúteo (SHARZYNSHI et al., 1999, 2001). Culturas “in vitro” de tecido luteal, demonstram que o controle de produção de progesterona nas células do corpo lúteo se deve ao estímulo da ocitocina e do hormônio luteinizante (LH). (SAKUMOTO et al., 1996). Ela é produzida pelo corpo lúteo, nas células grandes e nas pequenas. O precursor deste hormônio é o colesterol, presente na corrente sanguínea e corpo lúteo. Este colesterol é transportado para dentro da célula através de receptores para colesterol de alta e baixa densidade. Dentro das células luteais grandes o colesterol é transportado para dentro da mitocôndria, pela StAR, onde será convertido em pregnolona pela P450_{scc}. Posteriormente ela será transportada para fora da mitocôndria e convertida em progesterona pela 3 β hidrox esteróide dehidrogenase, presente

no retículo endoplasmático liso (AROSH et al., 2004a; DIAZ et al.; 2002; NISWENDER et al., 2000).

Em ovelhas que receberam como tratamento prostaglandina, houve uma diminuição na expressão de StAR, provavelmente pela ativação de proteína quinase C, sendo que as concentrações de progesterona também caíram a partir de quatro horas após a aplicação (JUENGEL et al., 1995). Em bovinos tratamentos utilizando pessários intravaginais associados com aplicação intramuscular de benzoato de estradiol, atrasam o crescimento da onda folicular e dominância, diminuindo a frequência dos pulsos de hormônio luteinizante (LH) e a concentração de estradiol intrafolicular (AUSTIN et al., 2002).

Quando ocorre uma diminuição na produção de progesterona pelo corpo lúteo, vai haver um aumento na expressão de receptores de ocitocina, que são regulados pelo aumento de estradiol na corrente sangüínea provindo de folículos e ocasionando um aumento da ligação entre a ocitocina e seus receptores (McCRAKEN et al., 1999). De acordo com esta linha de pensamento foram utilizados três tratamentos, o BE sozinho ou associado com a OC, além de somente OC. Isto para analisar se era necessária a associação ou não do BE mais OC para que houvesse luteólise.

O objetivo do experimento foi avaliar se o benzoato de estradiol sozinho consegue desencadear uma diminuição da secreção de progesterona, sendo considerado este evento a indução da luteólise funcional. Considerando que o mecanismo pelo qual ele causa este evento é o aumento da expressão de COX-2. Sabe-se que a progesterona faz uma ligação de alta afinidade com os receptores de ocitocina endometriais, além de diminuir as concentrações de colesterol das membranas plasmáticas, diminuindo assim a estabilidade dos receptores de ocitocina (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001).

É sabido que a progesterona faz uma “down-regulation” dos receptores de ocitocina no endométrio, prevenindo assim indiretamente um aumento na expressão da COX-2 e conseqüente produção de prostaglandina (ZINGG, 1995). Por esse motivo a análise da luteólise no presente trabalho foi feita através da avaliação da queda dos níveis de progesterona (P4) plasmáticos relacionados com o aumento de expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2), uma enzima essencial para a formação das prostaglandinas.

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PROGESTERONA E EXPRESSÃO DE COX-2, APÓS TRATAMENTO COM BENZOATO DE ESTRADIOL, ASSOCIADO OU NÃO À OCITOCINA, NO COMEÇO DA CASCATA LUTEOLÍTICA

**Mônica Rodrigues Ferreira, Valério Valdetar Marques Portella
Jr, Rafael Fernandes, Janandra Cortese da Silva, Kátia Padilha Barreto, Paulo
Bayard Dias Gonçalves, João Francisco Coelho de Oliveira**

Trabalho a ser enviado para Ciência Rural, 2005

NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PROGESTERONA E EXPRESSÃO DE COX-2, APÓS TRATAMENTO COM BENZOATO DE ESTRADIOL, ASSOCIADO OU NÃO À OCITOCINA, NO COMEÇO DA CASCATA LUTEOLÍTICA

Mônica Rodrigues Ferreira¹ Valério Valdetar Marques Portella Jr², Rafael Fernandes³, Janandra Cortese da Silva³, Kátia Padilha Barreto⁴, Paulo Bayard Dias Gonçalves⁵, João Francisco Coelho de Oliveira⁶

RESUMO

O objetivo do experimento foi verificar a função do benzoato de estradiol associado ou não à ocitocina, na regressão luteal, utilizando como parâmetros a diminuição das concentrações plasmáticas de progesterona e a expressão da prostaglandina sintetase ou ciclooxigenase 2 (COX-2). Foram utilizadas 60 ratas no oitavo dia de pseudogestação, divididas em quatro tratamentos, aplicados via intramuscular. O grupo benzoato de estradiol (BE - 0,5 mg/rata), ocitocina (OC - 1,25 UI/rata), benzoato de estradiol mais ocitocina (BE+OC) e grupo controle (GC), no qual foi aplicado 0,2 ml de solução cloreto de sódio 0,9%. Os animais foram sacrificados posteriormente ao tratamento, em diferentes horas 6, 12, 18, 24 e 30 sendo coletados plasma para dosagem hormonal de progesterona e amostras do terço médio do endométrio para expressão gênica de COX-2. Vinte e quatro horas após aplicação de BE observou-se diminuição nas concentrações de progesterona ($p < 0,005$); o mesmo foi observado no grupo BE+OC. Porém no grupo benzoato de estradiol a velocidade com que ocorreu a diminuição nos níveis plasmáticos de progesterona foi maior, sendo verificada uma diferença estatística já entre as horas 6 e 12 após a aplicação do tratamento ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os outros grupos, em relação à dosagem de progesterona. Quando avaliada a expressão de COX-2, foi observada uma diferença estatística entre o GC e o grupo BE, 18 horas após o tratamento ($p < 0,10$). Conclui-se que o benzoato de estradiol, na rata, não depende de associação com a ocitocina para induzir luteólise.

Palavras-chave: luteólise, ratas, benzoato de estradiol, ocitocina

ABSTRACT

¹ Médica Veterinária, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep), Departamento de Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

² Acadêmico de Graduação em Medicina Veterinária, BioRep, UFSM

³ Acadêmico de Graduação em Medicina Veterinária, BioRep, UFSM

⁴ Bióloga, professora substituta, doutor, Departamento de Fisiologia, UFSM, Santa Maria, RS.

⁵ Médico Veterinário, professor, PhD, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Santa Maria, RS.

⁶ Médico Veterinário, professor, doutor, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS.

The aim of the present study was determine the function of the oestradiol benzoate alone or associated with oxytocin, on the luteal regression, using as parameters the decreasing of plasmatic concentrations of progesterone and the ciclooxigenase 2 (COX-2) expression, in rats (*Ratus norvergicus*). In the eighth day of pseudopregnancy, 60 rats were used, divided in four treatments. The groups were oestradiol benzoate (0,5 mg/rat), oxytocin (1,25 UI/rat), oestradiol benzoate plus oxytocin and control group, on which was given 0,2 ml of sodium chloride 0,9%. The animals were killed after the treatment, in different hours, six, 12, 18, 24 and 30. It was collected blood, for progesterone assay and endometrial tissues to analyse COX-2 gene expression. After twenty four hours, it was observed that de estradiol benzoate caused a decrease in the progesterone ($p<0,05$); wich was observed in the estradiol+ ocytocine group. However in the BE group, the speed tha happends the decreased of the progesterone was higher, with a estatistical difference between hours 6 and 12, after the treatment ($p<0,05$). There was no difference between the other groups, when was observed the progesterone assay. About the avaliation of the COX-2 gene expression, there was a estatistica difference between tha CG and EB, after 18 hours of the treatment ($p<0,10$). So we can conclude that de estradiol benzoate, in the rat, doesn't depend of the association of ocytocin to induce luteolisis.

Key-words: luteolisis, rats, oestradiol benzoate, oxytocin

INTRODUÇÃO

A utilização do benzoato de estradiol (E2) nos protocolos de sincronização de cio agregados com a utilização de pessários intravaginais impregnados com progesterona têm sido utilizados para sincronizar o crescimento da onda folicular emergente (WILT BANK et al., 1965) e causar luteólise. O E2 bem como em humanos, ratos e suínos, também é secretado no corpo lúteo (CL). Ele aumenta a atividade da prostaglandina sintetase, aumenta a expressão de fosfolipase A2, a liberação de ácido aracdônico, principal precursor das prostaglandinas e controla a ação da proteína StAR, que carrega o colesterol para dentro da mitocôndria (DIAZ et al., 2002).

Protocolos hormonais objetivando uma sincronização rápida, retorno da atividade cíclica normal e obtenção de índices maiores de fertilidade, apresentam queda das concentrações da progesterona circulante e sincronização do crescimento e ovulação de folículos viáveis (MAPLETOFT et al., 2003). A utilização de esteróides é baseada nas suas funções específicas conhecidas da reprodução. Os pessários intravaginais impregnados com progesterona estão associados com as ações da P₄ no útero, como fator de diferenciação do

estroma e de estímulo a secreção glandular, determinam um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento precoce embrionário e manutenção da gestação, além disso ela se liga aos receptores de ocitocina fazendo uma inibição não genômica (GRAZZINI et al., 1998) e diminui sua estabilidade, diminuindo o colesterol das membranas celulares (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001). A esperada função da P₄ no trato reprodutivo é alcançada pela prévia exposição aos estrógenos, induzindo receptores de P₄ (RP; NISWENDER et al., 2000).

Existem dois tipos de receptores de estrógeno, o receptor α e o β (ER α e ER β). A expressão destes receptores em diferentes partes do ovário está relacionada com os níveis circulantes de P₄. No corpo lúteo, a maior expressão de ER α é encontrada em animais com altos níveis plasmáticos de P₄, o que também está associado com a prenhez. A presença do RE α no ovário indica uma função local para produção ou ação do estradiol. Entretanto a exata função do ER α no ovário bovino não é exata e parece ser dependente das variações do ciclo estral (VAN DEN BROECK et al., 2002b). Receptores de ocitocina (RO) também estão presentes no corpo lúteo, endométrio e miométrio (FENGL et al., 2000). Embora haja uma relação entre o aumento de E2 e a expressão de RO, quando ocorre uma diminuição nos níveis plasmáticos de progesterona, a “up regulation” dos RO no epitélio luminal não está associada diretamente a alterações na expressão dos ER α (ROBINSON et al., 2001).

Em ratos e humanos foi verificado que os principais promotores para a síntese e liberação de ocitocina são os receptores de estrógenos α e β , além do ácido retinóico (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001). Tecidos uterinos de vacas ciclando foram cultivados na presença de benzoato de estradiol, sendo observado uma “up regulation” de receptores de ocitocina (LEUNG & WATHES, 2000). Em ratas ocorre um aumento na expressão dos receptores de ocitocina durante o metaestro e o proestro, assim como um aumento na afinidade destes receptores para com seu ligante. O aumento da expressão destes ocorre pelo aumento do estradiol, produzido por folículos pré-ovulatórios, pelo menos durante o proestro (LARCHER et al., 1995). “In vitro” a ocitocina aumentou os níveis de ciclooxygenase 2 (COX-2) em 70% em relação ao controle além de IP3 e de cálcio intracelular (BURNS et al., 2001). A COX-2 é um precursor da prostaglandina que transforma o ácido aracônico e o oxigênio em PGH2 (SMITH et al., 1996).

A luteólise é uma cadeia de eventos, que culminam com uma diminuição da produção de progesterona pelo corpo lúteo e posterior regressão deste. Com a diminuição da produção de progesterona pelo corpo lúteo (McCRAKEN et al., 1999), ocorre um aumento nas concentrações de benzoato de estradiol, liberado pelos folículos pré-ovulatórios, que estimula

a expressão de receptores de ocitocina no endométrio. A liberação desta pela neurohipófise no momento da luteólise, é ocasionada pela diminuição das concentrações plasmáticas de progesterona e o aumento do benzoato de estradiol. Ocorre então um estímulo da produção de prostaglandina pelo útero, acarretando em uma liberação de ocitocina adicional pelo corpo lúteo, e a formação de um “feedback” positivo que causa um aumento adicional da liberação de prostaglandina (ASSELIN et al., 1997), que é o hormônio responsável pela morte do corpo lúteo.

O fato de o benzoato de estradiol estimular a neurohipófise a liberar ocitocina, além de fazer uma “up regulation” de receptores de ocitocina no endométrio, e a ocitocina aumentar os níveis de COX-2, um precursor da prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$), sugere que o benzoato de estradiol causa regressão luteal através de um mecanismo de aumento de liberação de prostaglandina endometrial, aumentando a expressão de COX-2. Esta associação entre a ocitocina e o benzoato de estradiol na cascata luteolítica, só ocorre se houver uma diminuição nas concentrações plasmáticas de progesterona. Em vacas tratadas com BE associado ou não à OC, pré-tratadas com medroxi-acetato de progesterona (MAP), o primeiro não foi capaz de aumentar a expressão de COX-2, mesmo em diferentes fases do ciclo estral (JÚNIOR, 2004).

O objetivo do experimento foi avaliar se apenas o benzoato de estradiol pode causar regressão luteal ou se é necessária sua associação à ocitocina e se este mecanismo de regressão ocorre por aumento de expressão de COX-2, utilizando como modelo experimental ratas Wistar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 60 ratas Wistar, em ambiente com temperatura e luz controladas. As fêmeas foram submetidas a lavagem vaginal e análise de período do ciclo estral durante quatro semanas, para verificação de sincronização do ciclo. Após foram introduzidos machos vasectomizados, sendo induzido o estado de pseudogestação. Durante o período de oito dias foi feita a análise do lavado vaginal, para verificação da manutenção do estado de pseudogestação. Caso algum animal não apresentasse quadro compatível com pseudogestação era recolocado novamente com o macho, assim que voltasse ao período de receptividade.

Tratamentos

No oitavo dia (dia 0 = primeiro dia de lavado compatível com pseudogestação - presença somente de leucócitos) os animais foram submetidos a quatro tipos de tratamentos:

benzoato de estradiol (BE-0,5 mg/rata; n=12), ocitocina (OC-1,25 UI/rata; n=12), benzoato mais ocitocina (BE+OC; n=12) e grupo controle (solução de cloreto de sódio 0,9%-0,2 ml; n=12) (C). As ratas foram alocadas em cinco grupos, nos quais variou o tempo de exposição aos tratamentos, sendo estes seis, 12, 18, 24 ou 30 horas. Após esse período, os animais foram decapitados.

Extração do RNA total

A extração do RNA foi realizada com a utilização de Trizol¹. Para quantificar o RNA total extraído, a densidade ótica foi determinada com espectrofotômetro². A integridade do RNA foi verificada eletroforeticamente por coloração com brometo de etídio e a pureza através da taxa de absorção da relação OD260/OD280

Transcrição Reversa e reação de polimerase em cadeia (PCR)

Iniciadores específicos foram utilizados para avaliar a expressão da ciclooxigenase (COX-2; 413 pb; ENGSTROM et al., 2000), e Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; U85042; U94889 - 847 pb). Para obtenção do cDNA, foi utilizado 1 µg de RNA, oligo-dt³ e inibidor da RNase³ em uma reação de 20 µl através do kit Omniscript™ Reverse Transcriptase®⁴. As condições de amplificação do cDNA para cada iniciador foram as seguintes: 16,5 µl de água, 2,5 µl de buffer (x mM), 0,75 µl de MgCl₂, 0,6 µl de cada primer (x mM), 0,8 µl dNTP e 0,25 µl de TAQ DNA polimerase⁵ para 3 µl de cDNA (volume final de 25 µl). A amplificação da COX-2 foi realizada com uma primeira etapa de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de ciclos com desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto e 30 segundos, anelamento por 45 segundos a uma temperatura de 56,2°C e alongação por 2 minutos a 70°C e passo final de 72°C por 10 minutos. As condições de amplificação diferiram para cada iniciador na temperatura de anelamento e no número de ciclos. A COX-2 foi amplificada em 35 ciclos. O GAPDH foi amplificado em 31 ciclos sob 55°C de temperatura de anelamento. A expressão relativa foi avaliada após determinação da fase exponencial para cada sistema, através da medida da densidade ótica, utilizando o software Alfa DigDoc 1000.

Alíquotas de 5 µl foram adicionadas a 1 µl de azul de bromofenol para eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio. Para determinar o tamanho dos produtos, foi utilizado um marcador de DNA⁶, de peso molecular conhecido. As imagens foram capturadas e a expressão relativa foi avaliada através da medida da densidade ótica com o Programa para processamento de imagens para análise densitométrica Alpha DigiDoc 1000⁷.

Dosagem hormonal

Para dosagem de progesterona foi coletado uma média de 6 ml de sangue para cada 200 μ l de EDTA a 10%. Após a coleta o sangue foi centrifugado por 5 minutos, e posteriormente era extraído soro. Para o radioimunoensaio foram utilizados 300 μ l de soro, extraídos com a éter de petróleo e ressuspensos em 250 μ l de tampão fosfato salino com gelatina (PBS-gel); 100 μ l foram utilizados em duplicata para análise de P4 (BARR et al, 1993).

Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA utilizando um delineamento fatorial de 4 tratamentos x cinco horas (4x5). As diferenças entre tratamentos e entre horas no mesmo tratamento foram analisadas através de contrastes entre médias, utilizando o pacote estatístico SAS (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos grupos que receberam o tratamento benzoato de estradiol (BE), houve uma queda significativa da P4 ($p=0,0155$), entre os horários seis e 12 horas. No tratamento benzoato de estradiol mais ocitocina (BE+OC), também houve uma diferença significativa entre os horários seis e 12 horas ($p=0,006$) e 18 e 24 horas ($p=0,0225$), considerando $p<0,05$, como observado na figura 1. Sendo que os níveis plasmáticos de P4 se mantiveram constantes nos grupos GC e OC.

Quando os resultados das dosagens de progesterona foram contrastados, dentro das horas de tratamento, com o GC, houve uma diferença na hora 24 ($p=0,0207$) do grupo BE. O grupo BE+OC apresentou diferença em relação ao grupo controle nas horas 12 ($p_{12hs}=0,0021$) e 24 ($p_{24h}=0,0077$), considerando $p<0,05$ (figura 3).

A expressão de COX-2 apresentou diferenças significativas entre os grupos BE e GC, na hora 18 ($p=0,0597$) e OC e GC também hora 18 ($p=0,0967$). Além disso, entre as horas 18 e 24 dos tratamentos BEOC ($p=0,0894$) e BE ($p=0,0559$), houve diferença estatística, considerando $p<0,10$, como observado na tabela 1 (HAVILAND et al., 1997).

Considerando os resultados em relação às dosagens de progesterona, podemos verificar que tanto o grupo BE quanto o BEOC obtiveram uma diminuição máxima de P4 alcançado na hora 24 após o tratamento, sendo considerado que estes animais entraram em luteólise, já que seus níveis de P4 foram abaixo de 6 μ g/ml (MURAKAMI et al.,1979). Demonstrando que o benzoato de estradiol sozinho conseguiu causar uma regressão luteal

(figura 1). Em um experimento realizado com ovelhas, ZHANG et al (1991) demonstrou que a aplicação de BE exógena também causou uma diminuição nas concentrações plasmáticas de P4.

ASSELIN et al. (1997) utilizando tecido endometrial, de vacas ciclando, demonstra que a ocitocina aumenta, de uma maneira dose-dependente, a expressão de COX-2 em mais de 70%, após 24 horas de exposição ao tratamento. Mostrando que o mecanismo pelo qual a ocitocina estimula a liberação de prostaglandina é através do aumento da expressão de COX-2. Porém o grupo OC, em nosso experimento não causou nenhum aumento na expressão da COX-2.

O fato de que tanto o grupo BE quanto o grupo BE+OC, tenham sofrido luteólise somente na hora 24, pode estar relacionado o aumento da afinidade da ocitocina aos seus receptores, quer irá aumentar somente 24 horas após a aplicação de BE (LEUNG & WATHES, 2000). Além disso, existem evidências de que o benzoato de estradiol não é necessário para que ocorra uma “up regulation” nos receptores de ocitocina. Primeiro porque os receptores de ocitocina são expressos em epitélio luminal de ovelhas esterectomizadas (WATHES et al., 1996); segundo, eles aumentam sua expressão em epitélio endometrial cultivado, independente da presença de esteróides, sendo que estes aumentam a velocidade do processo de expressão de receptores de ocitocina (LEUNG & WATHES, 2000).

A utilização do BE sozinho causou uma alteração nos níveis plasmáticos de progesterona sem que houvesse alteração nos níveis de expressão de COX-2 indicando que este possa estar atuando de outra forma no processo fisiológico da luteólise. O controle da 20α hidrox esteróide progesterona, uma enzima que transforma a progesterona em 20α hidrox-progesterona, produzida pelo corpo lúteo de roedores, é uma maneira de determinar uma baixa nas concentrações de progesterona sem que haja uma regressão estrutural completa do corpo lúteo (ALBARRACIN et al., 1994).

Outra hipótese é que os níveis de progesterona plasmático das ratas tenham interferido no resultado já que esta é capaz de suprimir a resposta de liberação de prostaglandina pela ocitocina, interferindo na ligação desta com seu receptor e diminuindo a expressão genética deste (BOGACKI et al., 2002; HARZZAD et al., 1998). A expressão de receptores de progesterona no corpo lúteo bovino (VAN DEN BROECK et al., 2002a; RUEDA, et al., 2000), mostram que esta tem ação intraluteal, principalmente antiapoptótica. Além disso o estradiol aumenta de uma maneira dose-dependente a expressão de RE α e RP (XIAU & GOFF, 1998), podendo influenciar no mecanismo luteolítico.

Estudos *in vitro* mostram que a P₄ inibe receptores de ocitocina, enquanto o estradiol estimula a liberação de PGF₂ α (MANN, 2001). Além da PGF₂ α , mediadores da função luteal, como a prolactina (KANUKA et al., 1997; GAYTAN et al., 2001), níveis de oxigênio reativo (SUGINO et al., 1998), fator de necrose tumoral α (FRIEDMAN et al., 2000), interferon gama (SUTER et al., 2001), óxido nítrico (JAROSZEWSKY & HANSEL, 2000), endotelina I (GIRSH et al., 1996) e fluxo vascular estão envolvidos no processo de regressão do CL. Múltiplos fatores endócrinos podem estar envolvidos no processo de apoptose durante a regressão do tecido luteal.

Concluindo, este trabalho demonstra que a utilização de BE associado ou não à OC, causa uma diminuição nos níveis plasmáticos de progesterona, independente da expressão de COX-2, indicando o começo da cascata luteolítica.

FONTES DE AQUISIÇÃO

1. Gibco BRL, Gaithersburg, MD
2. Biotech Photometer UV 1101
3. Invitrogen
4. QIAGEN Inc. - <<http://www.qiagen.com>>
5. Boehringer, Mannheim, Germany
6. DNA Mass Ladder; Gibco BRL
7. Alpha Ease FC, Alpha Innotech Corporation, 2002

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARRACIN, C.T. et al. Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. **Endocrinology**, v.134, p.2453 – 2460, 1994.

ASSELIN, E. et al. Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F₂ α production in endometrial epithelial cells *in vitro*: role of cyclooxygenase-2. **Endocrinology**, v. 138, n 11, p. 4798-4805, 1997.

BARR, J.M.; WANG, S.C.; HUANG, W.Y. et al. Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. **Biology of Reproduction**. v.29, p. 326-334, 1983.

BOGACKI, M. et al. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F₂ α from bovine endometrial tissue. **Biology of Reproduction**, v.67, p.184–188, 2002.

BURNS, P.D. et al. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates ovine endometrial prostaglandin F₂ α synthesis: role of g proteins and mitogen-activated protein kinases. **Biology of Reproduction**, v.65, n.4, p. 1150-1155, 2001.

DIAZ, F.J. et al. Regulation of progesterone and prostaglandin F₂ α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.191, p.65-80, 2002.

ENGSTROM, T et al. Effect of oxytocin receptor blockade on rat myometrial responsiveness to prostaglandin F₂ α . **Biology of Reproduction**, v.63, p.1443–1449, 2000.

FENGL, H.C.; BHAVE, M.; FAIRCLOUGH, R..J. Regulation of oxytocin receptor gene expression in sheep: tissue specificity, multiple transcripts and mRNA editing. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.120, p. 187–200, 2000.

FRIEDMAN, A. et al. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1905-1912, 2000.

GAYTAN, F. et al. Luteolytic effect of prolactin is dependent on the degree of differentiation of luteal cells in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 433-441, 2001.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiological Reviews**. v. 81, n. 2, p.629-683, 2001.

GIRSH, E. et al. Effect of endothelin-I on bovine luteal cell function: role in prostaglandin F₂ alpha-induced antisteroidogenic action. **Endocrinology**, v. 137, p. 1306-1312, 1996.

GRAZZINI, E. et al. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. **Nature**, v.392, p.509–512, 1998.

HAVILAND, M.B.; FERREL, R.E.; SING, C.F. Association between common alleles of the low-density lipoprotein receptor gene region and interindividual variation in plasma lipid and apolipoprotein levels in a population-based sample from Rochester, Minnesota. **Human Genetics**, v.99, n.1, p.108-114, 1997.

HAZZARD, T.M. et al. Impact of chronic treatment of ewes with estradiol-17 β or progesterone on oxytocin receptor gene transcription and ovarian oxytocin secretion. **Biology of Reproduction**, v.59, n.1, p.105-110, 1998.

JAROSZEWSKY, J. J.; HANSEL, W. Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum. **Proc. Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 224, p. 50-55, 2000.

Tese de mestrado. JÚNIOR, V.V.M.P. **Controle do crescimento folicular, expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e receptores de progesterona em bovinos durante o ciclo estral**. 2004. 44f. Tese de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

KANUKA, H. et al. Prolactin expresses differential effects on apoptotic cell death of luteal cells in vivo and in vitro. **Endocrine Journal**, v. 44, p. 11-22, 1997.

LARCHER, A. et al. Oxytocin receptor gene expression in the rat uterus during pregnancy and the estrous cycle and in response to gonadal steroid treatment. **Endocrinology**, v.136, n.12, 1995.

LEUNGH, S.T.; WATHES, D.C. Oestradiol regulation of oxytocin receptor expression in cyclic bovine endometrium. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.119, p. 287–292, 2000.

MANN, G. E. Hormone control of prostaglandin F2a production and oxytocin receptor concentrations in bovine endometrium in explant culture. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 20, p. 217-226, 2001.

MAPLETOFT, R. J. et al. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. **Journal of Animal Science**. v.81,E. Suppl. 2, p.E28–E36, 2003.

MURAKAMI, N.; TAKAHASHI, M. and SUZUKI, Y. Indispensable role of peripheral progesterone level for the occurrence of prolactin surges in pseudopregnant rats. **Biology of Reproduction**. v.21, p.263-268, 1979.

McCRACKEN, J.A. et al. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 263-324, 1999.

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

ROBINSON, R.S.; MANN, G.E. et al. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**. n.122, p.965–979, 2001.

RUEDA, B.O; HENDRY, I.R.; HENDRY III, W.J. ET AL. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**. n.62, p.269–276, 2000.

SAS System for Mixed Models, 1996.

SUGINO, N.; TELLERIA, C. M.; GIBORI, G. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase Messenger ribonucleic acid by inflammatory cytokines. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 208-215, 1998.

SUTER, J. et al. Mediators of interferon gamma-initiated signaling in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1481-1486, 2001.

SMITH, W.L. et al. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.52, p.33157-33160, 1996.

VAN DEN BROECK, W. et al. Cell-specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary. **Reproduction Domestic Animal**, v. 37, p. 314-320, 2002.a

VAN DEN BROECK, W; CORYN, M.; SIMOENS, P.; et al. Cell-specific distribution of oestrogen receptor-alfa in the bovine ovary. **Reproduction Domestic Animal**, v. 37, p. 291-293, 2002.b

WATHES, D.C. et al. Regulation of oxytocin, oestradiol and progesterone receptor concentrations in different uterine regions by oestradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes **Journal of Endocrinology**. n.151, p.375–393, 1996.

WILTBANK, J. N. et al. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. **Journal of Animal Science**, v. 24, p.990–994, 1965.

XIAO, C.W.; GOFF, A.K. Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.115, p.101–109, 1998.

ZHANG et al. Influence of estradiol on the secretion of oxytocin and prostaglandin F2 α during luteolysis in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.45, n.3, p.395-403, 1991.

Tabela 1: médias da expressão em unidades arbitrárias de COX-2, obtidas por RT-PCR e analisadas pelo programa Alpha Digi-doc, demonstrando as diferenças estatísticas ($p < 0,10$), entre os tratamentos (letras maiúsculas) BexGC e OCxGC; e entre as horas dentro de um mesmo tratamento (letras minúsculas) BE18x24 e BEOC 18x24. A unidade de medida é U.A.

HORAS	BE	BEOC	OC	GC
6	0,33	0,58	0,62	0,46
12	0,31	0,67	0,31	0,39
18	0,92 A c	0,66 a	0,31 A	0,55 B
24	0,43 d	0,70 b	0,24	0,58
30	0,54	0,30	0,54	0,54

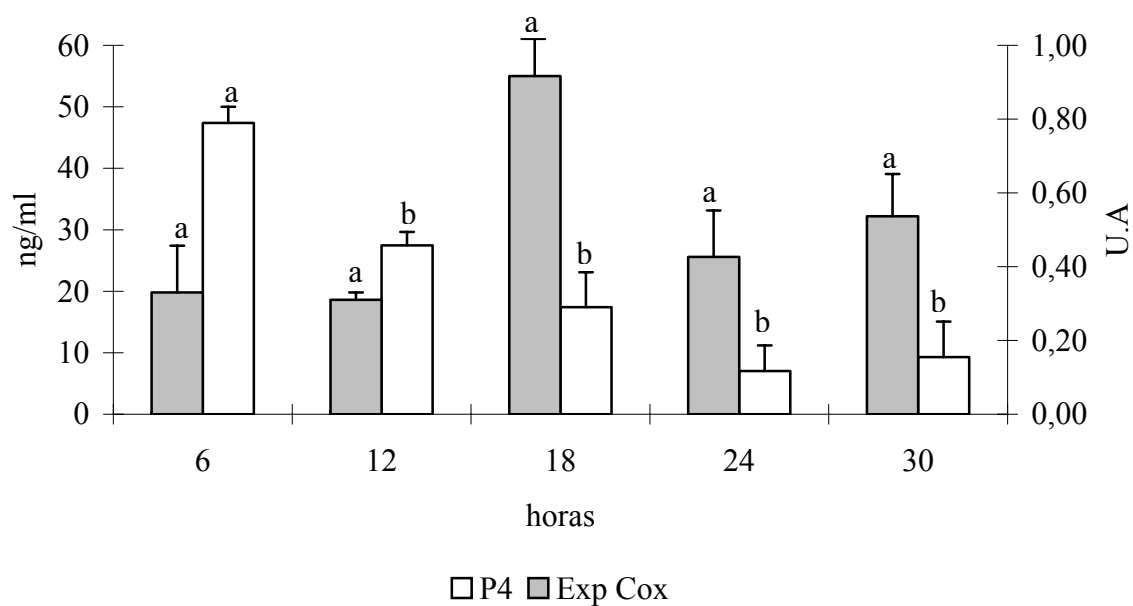


Figura 1: Níveis plasmáticos de progesterona (ng/ml) e expressão de ciclooxygenase 2 (U.A), em ratas pseudogestantes, após aplicação benzoato de estradiol (BE). Letras diferentes entre barras indicam diferença estatística significativa (P4 - $p < 0,05$ e COX - $p < 0,10$).

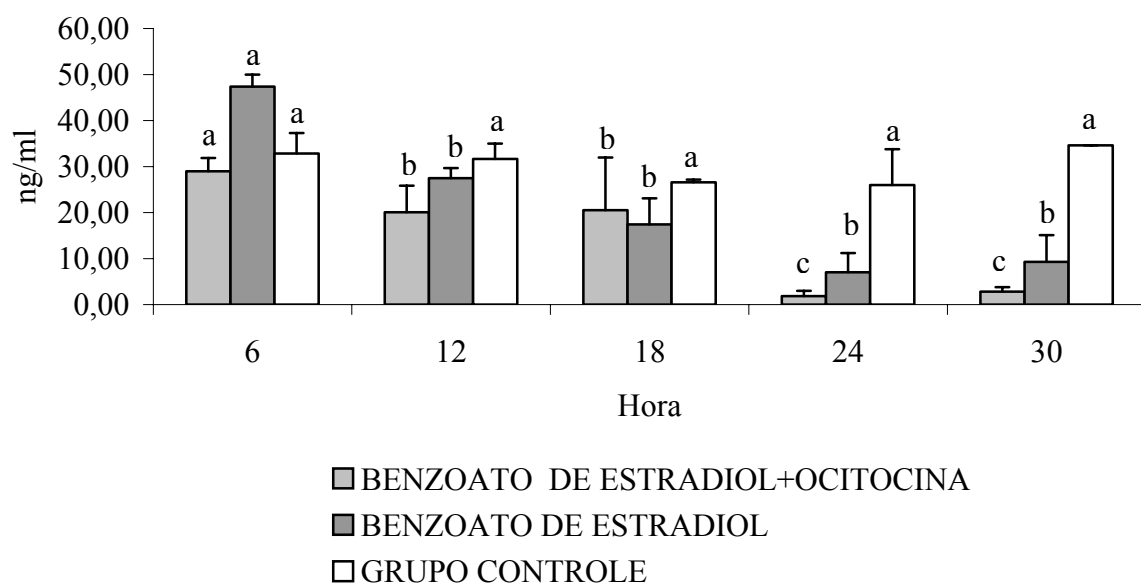


Figura 2: Níveis plasmáticos de progesterona (ng/ml) em ratas pseudogestantes, após aplicação benzoato de estradiol (BE), BE e ocitocina (OC) e solução salina. Letras difentes entre barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ANDERSON, L. E. et al. Prostaglandin F_{2α} receptor in the corpus luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. **Biology of Reproduction**, v. 64, n.4, p.1041-1047, 2001

ALBARRACIN, C.T. et al. Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. **Endocrinology**, v.134, p.2453 – 2460, 1994.

ALILA, H. W. et al. Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 645-655, 1988.

ASSELIN, E. et al. Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F_{2α} production in endometrial epithelial cells *in vitro*: role of cyclooxygenase-2. **Endocrinology**, v. 138, n 11, p. 4798-4805, 1997.

AROSH, J. A. et al. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: A basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v.145, n.5, p. 2551-2560, 2004.

AUSTIN, E. J. et al. Effects of oestradiol and progesterone on secretion of gonadotrophins and health of first wave follicles during the oestrous cycle of beef heifers. **Reproduction**, v.124, n.4, p. 531-541, 2002.

BARR, J.M.; WANG, S.C.; HUANG, W.Y. et al. Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. **Biology of Reproduction**. v.29, p. 326-334, 1983.

BAO, B.; GARVERICK, H. Expression of esteroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicle during ovarian follicular waves: a review. **J. Anim. Scien.**, v.36, p. 1903-1921, 1998.

BERISHA, B.; PFAFFL, M.; SCHAMS, D. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. **Endocrine**, v. 17, p. 207-214, 2002.

BO, G. A. et al. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 141-157, 2000.

BOGACKI, M. et al. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F_{2α} from bovine endometrial tissue. **Biology of Reproduction**, v.67, p.184–188, 2002.

BOOS, A. et al. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**. v.44, p.11–21, 1996.

BURNS, P.D. et al. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates uterine prostaglandin F2 α synthesis in bovine endometrium: role of calcium. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 15, n.6, p. 477–487, 1998.b

BURNS, P.D. et al. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates ovine endometrial prostaglandin F2 α synthesis: role of g proteins and mitogen-activated protein kinases. **Biology of Reproduction**, v.65, n.4, p. 1150-1155, 2001.a

CARAMBULA, S.F. et al. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. **Endocrinology**, v. 143, p. 1495-1501, 2002.

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

CHEON, Y. et al. A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. **Molecular Endocrinology**. v.16, n.12. p.2853-2871, 2002.

DAVIS, B.J. et al. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E₂ and interleukin-1 β . **Endocrinology**, v.140, n.6, p. 2685-2695, 1999.

DIAZ, F.J et al. Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, n.1, p.65-80, 2002.

DIAZ, F.J.; WILTBANK, M.C. Acquisition of luteolytic capacity: changes in prostaglandin F2 α regulation of steroid hormone receptors and estradiol biosynthesis in pig corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1333–1339, 2004.

DICZFALUSY, E. & FRASER, I.S. The discovery of reproductive steroid hormones and recognition of their physiological roles. In: FRASER, I.S. et al. Estrogens and Progesterones in Clinical Practice, pp 3–18. Eds IS Fraser, RPS Jansen, RA Lobo & MI Whitehead. London: Churchill Livingstone, 1998. p. 3–18.

ENGSTROM, T et al. Effect of oxytocin receptor blockade on rat myometrial responsiveness to prostaglandin F2 α . **Biology of Reproduction**, v.63, p.1443–1449, 2000.

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

FENGL, H.C.; BHAVE, M.; FAIRCLOUGH, R.J. Regulation of oxytocin receptor gene expression in sheep: tissue specificity, multiple transcripts and mRNA editing. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.120, p. 187–200, 2000.

FITZPATRICK, F. A.; SOBERMAN, R.. Regulated formation of eicosanoids. **Journal of Clinical Investigation**. v.107,n.11, p.1347-1351, 2001.

FREEMAN, M. E. The neuroendocrine control of the estrous cycle in the rat. In: KNOBIL, E. & NEILL, J.D. Physiology of Reproduction (2nd ed.). New York: Raven, 1994. Chap. 46. p. 613–658.

FRIEDMAN, A. et al. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1905-1912, 2000.

FUCHS, A.R. et al. Ontogeny of oxytocin receptors and oxytocin-induced stimulation of prostaglandin synthesis in prepubertal heifers. **Endocrinology**, v. 139, n.6, 1998.

GAVA, N. et al.. Expression of progesterone receptors a and b in the mouse ovary during the estrous cycle. **Endocrinology**, v.145, v.7, p.3487–3494, 2004.

GAYTAN, F. et al. Progesterone on an oestrogen background enhances prolactin-induced apoptosis in regressing corpora lutea in the cyclic rat: possible involvement of luteal endothelial cell progesterone receptors. **Journal of Endocrinology**, v.165, n.3, p. 715-24, 2000.

GAYTAN, F. et al. Luteolytic effect of prolactin is dependent on the degree of differentiation of luteal cells in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 433-441, 2001.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiological Reviews**. v. 81, n. 2, p.629-683, 2001.

GIRSH, E. et al. Effect of endothelin-I on bovine luteal cell function: role in prostaglandin F2 alpha-induced antisteroidogenic action. **Endocrinology**, v. 137, p. 1306-1312, 1996.

GRAZZINI, E. et al. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. **Nature**, v.392, p.509–512, 1998.

HAZZARD, T.M. et al. Impact of chronic treatment of ewes with estradiol-17 β or progesterone on oxytocin receptor gene transcription and ovarian oxytocin secretion. **Biology of Reproduction**, v.59, n.1, p.105-110, 1998.

HAYASHI, K. et al. Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 70, p. 339-349, 2003.

JAROSZEWSKY, J. J.; HANSEL, W. Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum. **Proc. Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 224, p. 50-55, 2000.

JENNER, L.J. et al. Uterine oxytocin receptor in cyclic and pregnant cows. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 91, p. 49-58, 1991.

JUENGEL, J.L. et al. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. **Endocrinology**, v.136, n.12, 1995.

KANUKA, H. et al. Prolactin expresses differential effects on apoptotic cell death of luteal cells in vivo and in vitro. **Endocrine Journal**, v. 44, p. 11-22, 1997.

KIMMINS, S.; MACLAREN, L. A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. **Placenta**, v. 22, p. 742-748, 2001.

KURITA, T. et al. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v.62, n.4, p.821-30, 2000.

LARCHER, A. et al. Oxytocin receptor gene expression in the rat uterus during pregnancy and the estrous cycle and in response to gonadal steroid treatment. **Endocrinology**, v.136, n.12, 1995.

LEFEBVRET, D.L.; FAROOKHI, R.; LARCHERS, A. et al. Uterine Oxytocin Gene Expression. I. Induction during Pseudopregnancy and the Estrous Cycle. **Endocrinology**. v.134, n. 6, p. 2556-2561, 1994.

LEUNGH, S.T.; WATHES, D.C. Oestradiol regulation of oxytocin receptor expression in cyclic bovine endometrium. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.119, p. 287-292, 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.

LOFTIN, C.D. et al. Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. v.68, n 69, p.177-185. 2002.

Tese de doutorado: LOGUERCIO, R.S. **Regulação de receptores esteróides, dinâmica folicular e incremento na eficácia reprodutiva pós-parto de vacas de corte**. 2005. 80f. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

MANN, G. E. Hormone control of prostaglandin F2a production and oxytocin receptor concentrations in bovine endometrium in explant culture. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 20, p. 217-226, 2001.

MAPLETOFT, R. J. et al. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. **Journal of Animal Science**. v.81,E. Suppl. 2, p.E28-E36, 2003.

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

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 171-180, 2000.

McGUIRE, W et al. Protein kinase C second message system mediates the antiestrogenic effects of prostaglandin F2 α in the ovine corpus luteum in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 800-806, 1994.

McCRACKEN, J.A. et al. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 263-324, 1999.

MEIKLE, A. et al. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor, progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, n.68, p.45-56, 2001.

MIHM, M. et al. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction Domestic Animal**, v.37, p.191-200, 2002.

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

OLSON, K.K. et al. Actions of prostaglandin F₂ α and prolactin on intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte/macrophage accumulation in the rat corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.64, n.3, p.890-897, 2001.

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

QUINTAL-FRANCO, J.A. et al. Corpus luteum development and function in cattle with episodic release of luteinizing hormone pulses inhibited in the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. **Biology of reproduction**. n. 61, p.921–926, 1999.

RAO, C. et al. Receptors for gonadotrophin and prostaglandin F₂ α in bovine corporea lutea of early, mid and late luteal phase. **Acta Endocrinol.**, v.91, p. 529-534, 1979.

ROBINSON, R.S et al. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. **Journal of Endocrinology**. v. 160, p. 21-33, 1999.

ROBINSON, R.S. et al. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**. n.122, p.965–979, 2001.

RUEDA, B.O. et al. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**. n.62, p.269–276, 2000.

SAS System for Mixed Models, 1996.

SAKUMOTO, R. et al. Progesterone release of bovine corpus luteum in response to oxytocin in different culture systems. **Journal of Reproduction and Development**, v.42, n.3, 1996.

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

SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Sensitivity of bovine corpora lutea to Prostaglandin F₂ α is dependent on progesterone, oxytocin, and prostaglandins. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1292-1298, 1999.

SHARZYNSKI, D.J. et al. Luteotropic mechanisms in the bovine corpus, progesterone and noradrenaline luteum: role of oxytocin, prostaglandin F₂ α . **Journal of Reproduction Development**, v.60, p.37-125, 2001.

SMITH, W.L. et al. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.52, p.33157-33160, 1996.

SUGINO, N.; TELLERIA, C. M.; GIBORI, G. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase Messenger ribonucleic acid by inflammatory cytokines. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 208-215, 1998.

SUTER, J. et al. Mediators of interferon gamma-initiated signaling in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1481-1486, 2001.

TSAI, S.J, WILTBANK, M.C. Prostaglandin F₂ 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.

VAN DEN BROECK, W. et al. Cell-specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary. **Reproduction Domestic Animal**, v. 37, p. 314-320, 2002.a

VAN DEN BROECK, W; CORYN, M.; SIMOENS, P.; et al. Cell-specific distribution of oestrogen receptor- α in the bovine ovary. **Reproduction Domestic Animal**, v. 37, p. 291-293, 2002.b

VOSS, A.K.; FORTUNE, J.E. Estradiol-17 β has a biphasic effect on oxytocin secretion by bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.48, p.404-1409, 1993

WATHES, D.C. et al. Regulation of oxytocin, oestradiol and progesterone receptor concentrations in different uterine regions by oestradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes **Journal of Endocrinology**. n.151, p.375-393, 1996.

WEITLAUF, H.M. Biology of implantation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1994. Chap. 7. p.391-440

WILTBANK, J. N. et al. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. **Journal of Animal Science**, v. 24, p.990-994, 1965.

WRIGHT, K. et al. Luteal membrane binding of prostaglandin F₂ α and sensitivity of corpora lutea to prostaglandin F₂ α -induced luteolysis in pseudopregnant rats. **Endocrinology**, v. 106, p.1333-falta pag final, 1980.

WU, W.X; MA, X.H.; ZHANG, Q.E et al. Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 and 2 by estradiol and progesterone in nonpregnant ovine myometrium and endometrium *in vivo*. **Endocrinology**. v. 138, n. 9, p.4005-4012. 1997. a

WU, W.X.; DERKS, J.B.; NATHANIELSZ, P.W. The effect of glucocorticoids on estrogen receptor messenger ribonucleic acid in the pregnant ovine myometrium *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v.54, p.230–241, 1996. b

XIAO, C.W.; GOFF, A.K. Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.115, p.101–109, 1998.

ZHANG et al. Influence of estradiol on the secretion of oxytocin and prostaglandin F2 α during luteolysis in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.45, n.3, p.395-403, 1991.

ZINGG, H.H., et al. Gonadal steroid regulation of oxytocin and oxytocin receptor gene expression. **Adv Exp Med Biol**, n.395, p.395–404, 1995.