

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

**REGULAÇÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES E
DINÂMICA FOLICULAR EM UM SISTEMA DE
INDUÇÃO HORMONAL PÓS-PARTO EM VACAS DE
CORTE**

TESE DE DOUTORADO

Rosane da Silveira Loguercio

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**REGULAÇÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES E DINÂMICA
FOLICULAR EM UM SISTEMA DE INDUÇÃO HORMONAL
PÓS-PARTO EM VACAS DE CORTE**

por

Rosane da Silveira Loguercio

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves

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 Tese de Doutorado

**REGULAÇÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES E DINÂMICA
FOLICULAR EM UM SISTEMA DE INDUÇÃO HORMONAL
PÓS-PARTO EM VACAS DE CORTE**

elaborada por

Rosane da Silveira Loguercio

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves, Dr.
(Presidente/Orientador)

João Carlos Deschamps, Dr. (UFPel)

João Francisco Coelho de Oliveira, Dr. (UFSM)

Jairo Pereira Neves, Dr. (UNB)

José Carlos Ferrugem Moraes, Dr. (EMBRAPA/CPPSul)

Santa Maria, 18 de julho de 2005.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência.

Ao Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves, pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao Prof. João Francisco Coelho de Oliveira pelo apoio técnico durante a realização dos experimentos, convivência e auxílio nos momentos de dificuldade.

Ao Prof. Cláudio Alves Pimentel, pela a orientação desde a iniciação científica e mestrado. Pelo apoio constante na realização dos trabalhos científicos. Obrigada principalmente pela amizade.

Aos estagiários do BioRep, que proporcionaram um agradável convívio durante o período do curso, e auxiliaram na realização dos experimentos, em especial a Janandra, Fernanda, Henrique, João Néelson e Rafael.

Aos colegas de Pós-graduação, pelos conselhos, auxílios e principalmente pela amizade, que será preservada ao longo de minha vida.

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

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica - CNPq, pela concessão da bolsa de estudo durante período de realização do curso de doutorado.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Patologia Animal, da Universidade Federal de Pelotas, em especial a Profa. Cristina e Sr. João.

As colegas Roberta e Lessana pela colaboração.

A todos os meus familiares pelo incentivo e torcida.

Ao meu irmão Daniel pelo companheirismo, amizade e amor que sempre nos uniu.

Ao meu sobrinho Pedro pelo amor e pelos agradáveis momentos de descontração.

Aos meus pais, Ivan e Ládís, pelo incentivo e apoio fundamentais para realização deste projeto. Obrigada pela vida dedicada aos filhos e pelos valores ensinados.

Aos meus filhos, Arthur e Antonia, por terem dado um novo significado em minha vida, também pelo amor e carinho. Obrigada principalmente pelo companheirismo e paciência.

Ao meu marido Luciano Loguercio, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

A todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

REGULAÇÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES E DINÂMICA FOLICULAR EM UM SISTEMA DE INDUÇÃO HORMONAL PÓS-PARTO EM VACAS DE CORTE

AUTORA: ROSANE DA SILVEIRA LOGUERCIO
ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de julho de 2005

O objetivo do presente estudo foi de elucidar a ação dos gestágenos e benzoato de estradiol (BE) no mecanismo de regressão prematura do primeiro corpo lúteo (CL) pós-parto, e desenvolver um sistema eficaz de inseminação artificial para vacas de corte amamentando. O efeito da pré-exposição a gestágenos e BE na expressão de receptor de estrógeno alfa ($RE\alpha$), beta ($RE\beta$) e receptor de progesterona (RP) no endométrio e CL foi avaliado após a primeira ovulação pós-parto. Dez vacas em anestro, 30 dias após o parto, foram divididas em grupo controle (AN) e tratamento (AN+MAP). No dia 0, os animais do grupo tratamento receberam 250 mg de medroxiprogesterona (MAP) em pessário vaginal por 7 dias e 5 mg de BE. Em ambos os grupos, a onda folicular foi acompanhada e a ovulação induzida para formação de um CL. Após 7 dias, foram obtidos tecidos luteal e endometrial. As amostras foram destinadas a expressão gênica (RT-PCR) e avaliação histológica endometrial e luteínica. A pré-exposição ao gestágeno no primeiro ciclo estral pós-parto resultou em uma maior expressão endometrial do RP (grupo AN+MAP; $P < 0,05$) e um bloqueio da expressão dos $RE\beta$ no tecido endometrial ($P < 0,05$). No grupo AN+MAP, a altura do epitélio glandular endometrial e número total de células luteais grandes foram maiores do que no grupo AN. Visando promover o crescimento folicular compatível com resposta ovulatória, em vacas pós-parto, foi avaliada a dinâmica folicular, para determinar o melhor momento de aplicação do eCG e BE em associação ao MAP. As vacas receberam MAP por 7 dias e BE no Dia 0 ou 1, seguido de eCG no Dia 6 (B0E6 ou B1E6) ou 7 (B0E7 ou B1E7). Em dois grupos, os animais não foram injetados com eCG, mas com BE no Dia 0 (B0) ou no Dia 1 (B1). Todas as fêmeas receberam agonista de GnRH 45 h após remoção do implante vaginal. Os animais do grupo B0E6 mantiveram um diâmetro folicular médio de 8 mm até a aplicação do eCG e atingiram a média de 13 mm no momento do GnRH, com taxa de ovulação de 80%. Por análise de covariância, essa curva diferiu ($P = 0.0001$) das demais, as quais atingiram média folicular final entre 8 e 12 mm e taxa de ovulação de 40%. A partir desses resultados, foi investigado um sistema de reindução de ovulação e estro e inseminação artificial em um processo misto de observação de estro e tempo fixo (IAETF) para vacas amamentando no período pós-parto. Um total de 553 animais foi dividido em indução hormonal (IH; Dia 0= BE e MAP por 7 dias, Dia 6= eCG, $PGF_2\alpha$ e desmame temporário), desmame precoce aos 60 dias e monta natural. Não foi observada diferença nos índices de prenhez (85,0%) entre os grupos. No entanto, os terneiros do grupo IH, aos sete meses de idade, atingiram a média de 38 kg a mais do que os desmamados aos 60 dias. Com o objetivo de adequar a dose da gonadotrofina no sistema de IH, foram utilizadas 300, 400 ou 500 UI de eCG, não havendo diferença nos índices de prenhez (78,7%). Em conclusão, o MAP e BE regulam os receptores esteróides no endométrio e CL, evidenciando uma importante participação no mecanismo de luteólise prematura pós-parto. Além disso, esses esteróides participam da reestruturação pós-parto do endométrio e CL e, aplicados aos 60 dias pós-parto, associados ao eCG um dia antes da retirada do implante vaginal, resultam em maior eficácia reprodutiva em vacas de corte.

Palavras-chave: pós-parto, gestágenos, CL de vida curta, receptores esteróides, indução hormonal, IATF

ABSTRACT

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

REGULATION OF STEROID RECEPTORS AND FOLLICULAR DYNAMICS IN HORMONAL INDUCTION SYSTEM POSTPARTUM BEEF COWS

AUTORA: ROSANE DA SILVEIRA LOGUERCIO

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de julho de 2005

The objective of the present study was to determine the action of gestagens and estradiol benzoate (EB) on the mechanism of premature regression of the first corpus luteum (CL) after parturition, and to develop an efficient artificial insemination system for suckling beef cows. The effect of pre-exposure to gestagens and EB on the expression of the alpha ($ER\alpha$) and beta ($ER\beta$) estrogen receptors and progesterone receptor (PR) in the endometrium and CL was evaluated after the first postpartum ovulation. Thirty days after calving, ten anestrus cows were divided into a control group (AN) and a treatment group (AN+MAP). On day 0, animals of the treatment group received 250 mg medroxyprogesterone (MAP) in a vaginal device for 7 days and 5 mg EB. In both groups, the follicular wave was monitored and ovulation was induced for the formation of a CL. Luteal and endometrial tissues were collected after 7 days. The samples were submitted to the analysis of gene expression by RT-PCR and endometrial and luteal histological evaluation. Pre-exposure to gestagen during the first postpartum estrous cycle resulted in a higher endometrial expression of the PR (AN+MAP group; $P < 0.05$) and inhibition of $ER\beta$ expression in endometrial tissue ($P < 0.05$). The height of the endometrial glandular epithelium and the total number of large luteal cells were higher in the AN+MAP group than in the AN group. In order to promote follicular growth compatible with the ovulatory response in postpartum cows, we analyzed the follicular dynamics to determine the best time for the application of eCG and EB in combination with MAP. The cows received MAP for 7 days and EB on day 0 or 1, followed by eCG on day 6 (B0E6 or B1E6) or 7 (B0E7 or B1E7). In two groups, the animals were not injected with eCG but received EB on day 0 (B0) or 1 (B1). All cows received a GnRH agonist 45 h after removal of the vaginal device. Animals of the B0E6 group maintained a mean follicular diameter of 8 mm until eCG application and reached a mean diameter of 13 mm at the time of GnRH agonist injection (45 h after MAP removal), showing an ovulation rate of 80%. Covariance analysis showed a difference in this curve ($P = 0.0001$) compared to the other groups, which reached a mean final follicular diameter of 7 to 12 mm and ovulation rate of 40%. Based on these results, we investigated an ovulation and estrus reinduction for a mixed system of estrus detection and fixed-time artificial insemination (ETAI) in postpartum suckling cows. A total of 553 animals was divided into the following groups: hormonal induction (HI; day 0 = EB and MAP for 7 days, day 6 = eCG, $PGF_2\alpha$ and temporary weaning), early weaning at 60 days, and natural breeding. No difference in pregnancy rates (85%) was observed among groups. However, at 7 months of age, calves of the HI group had reached a 38 kg higher mean weight than those weaned at 60 days. In order to adjust the eCG dose to the HI system, doses of 300, 400 or 500 IU eCG were tested. No difference in the pregnancy rates (78.7%) was observed. In conclusion, MAP and EB regulate steroid receptors in the endometrium and CL, indicating an important role for these hormones in the mechanism of premature postpartum luteolysis. In addition, steroids participate in the postpartum restructuring of the endometrium and CL and, when applied 60 days after calving together with eCG administered one day before removal of the vaginal implant, increase the reproductive efficacy of beef cows.

Key words: postpartum, gestagens, short-life CL, steroid receptors, hormonal induction, TAI

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Período pós-parto	11
2.2 Corpo lúteo	15
2.3 Receptores esteróides	19
3. CAPÍTULO 1: Efeito da pré-exposição de gestágenos na expressão de receptores esteróides pelo corpo lúteo de vida curta e endométrio de vacas em anestro pós-parto	21
4. CAPÍTULO 2: Effect of equine chorionic gonadotrophin on follicular dynamics and ovulatory capacity for fixed-time insemination and estrus resynchronization in postpartum beef cows	41
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
7. APÊNDICE	80

1. INTRODUÇÃO

Em bovinos de corte, o período pós-parto é considerado crítico para eficiência do setor pecuário. As baixas taxas de repetição anual de cria em vacas de corte no Rio Grande do Sul, são indicativas da reduzida atividade ovariana após o parto (MORAES & EGGLETON, 1995), caracterizando o anestro pós-parto, sendo este o maior entrave na produção de gado de corte. Dentre as diferentes causas de anestro, a subnutrição e o anestro lactacional têm sido considerados os principais fatores responsáveis pela baixa eficiência reprodutiva neste período (SHORT, et al., 1990). Esses fatores agem controlando o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, resultando em bloqueio das funções reprodutivas e aumento do período improdutivo (para revisão: YAVAS & WALTON 2000; WILTBANK et al., 2002). Vários sistemas de indução e/ou sincronização de estro e ovulação têm sido desenvolvidos com o objetivo de reduzir o intervalo parto concepção e incrementar as taxas de prenhez (TERRA et al., 2000; MACIEL et al., 2001; JORDAN et al., 2002; CAVESTANY et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; BASTOS et al., 2004).

A primeira ovulação pós-parto resulta no desenvolvimento de um corpo lúteo (CL) de vida curta e, conseqüentemente, em um ciclo estral de menor duração e reduzida fertilidade (RAMIREZ-GODINEZ et al., 1981; SCHRICK et al., 1993; BREUEL et al., 1993). Estruturas luteais similares a este CL são formadas em decorrência de tratamentos com o uso de GnRH ou hCG (GARCIA-WINDER et al., 1986) e em resposta aos sistemas de desmame precoce e interrompido (RAMIREZ-GODINEZ et al., 1982). A progesterona (P_4) originada desta estrutura, e provavelmente, o estrógeno originado pelo folículo, parecem ter uma extrema importância na prevenção do CL de vida curta e no retorno precoce da ciclicidade após o parto (CORAH et al., 1974; RAMIREZ-GODINEZ et al., 1981; BREUEL et al., 1993).

De posse desse conhecimento, protocolos alicerçados no uso de gestágenos para indução de estro e ovulação foram desenvolvidos com o objetivo de possibilitar o retorno à atividade cíclica e obter maiores índices de prenhez em vacas de corte. A utilização de protocolos hormonais é baseada nas funções específicas conhecidas dos esteróides na reprodução. As principais ações da P_4 no útero, como fator de diferenciação do estroma e de estímulo a secreção glandular, determinam um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento precoce embrinário. Ainda, o estado de quiescência no miométrio produzido

por esse hormônio, garante a manutenção da gestação. A esperada função da P_4 no trato reprodutivo é alcançada pela prévia exposição aos estrógenos, induzindo receptores de P_4 (RP; NISWENDER et al., 2000).

Os protocolos criados incluem gestágenos de liberação lenta em forma de implantes subcutâneos ou intra-vaginais usados por 7 a 9 dias (MARTINEZ et al., 2002; RHODES et al., 2003; UTT et al., 2003; DAY, 2004;), associados ou não ao BE. Os sistemas desenvolvidos para o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) apresentam taxas de prenhez que variam de 20-55% (MARTINEZ et al., 2002; HIERS et al., 2003; BARUSELI et al., 2004; BARTOLOME et al., 2005a,b). Uma das possíveis barreiras destes sistemas é a incapacidade do folículo dominante de responder ao LH liberado pela aplicação exógena de GnRH. A utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) para promover o crescimento do folículo dominante e uma resposta mais efetiva aos hormônios indutores da ovulação é uma alternativa que deve ser melhor estudada. Nesse sentido, o acompanhamento da dinâmica folicular possibilita identificar o momento e as associações hormonais que permitam a otimização dos protocolos de IATF.

No entanto, estes protocolos apresentam uma grande variabilidade nos resultados de prenhez, principalmente em decorrência de fatores externos como as condições climáticas, interferindo de forma direta na Condição Corporal (CC) dos animais, os quais estão sob os efeitos inibitórios da amamentação. A dificuldade de contornar estes fatores e desenvolver sistemas efetivos de indução de estro/ovulação para IATF, está ligada aos limites fisiológicos de nutrição, necessários para a função reprodutiva e a falta de conhecimento da regulação endócrina, mecanismo de ação dos gestágenos e desencadeamento da luteólise precoce pós-parto.

Para alcançar a função desejada, os principais hormônios utilizados em protocolos para incremento da fertilidade, estrógeno e P_4 , agem via receptores esteróides específicos, o receptor de progesterona (RP), o receptor de estrógeno alfa ($RE\alpha$) e o receptor de estrógeno beta ($RE\beta$). A ligação esteróide-receptor induz mudanças estruturais e funcionais, em associação do complexo ligante-receptor com genes que regulam sua transcrição. Os receptores esteróides estão distribuídos amplamente no útero (KIMMINS & MACLAREN, 2001) e ovário bovinos, localizados no CL, folículos, superfície do epitélio e células do estroma superficial e profundo (VAN DEN BROECK et al., 2002 a,b), indicando funções regulatórias ovarianas dos hormônios esteróides. Durante o ciclo estral, a expressão ovariana destes receptores apresenta mudanças, provavelmente relacionadas as concentrações

hormonais circulantes, sugerindo participação em várias funções biológicas (BERISHA et al., 2002).

Tais receptores parecem estar envolvidos com a cascata luteolítica, estando o começo do processo de luteólise sob o controle primário da P_4 e do estradiol. Em ovinos, o desencadeamento do mecanismo é dependente de uma *downregulation* dos receptores uterinos de P_4 , que possibilita a ação do estradiol, estimula o pulso gerador de ocitocina e, conseqüentemente, desencadeia o processo de lise do CL (McCRAKEN, et al., 1999). O pré-tratamento com gestágenos induz modificações na sensibilidade ao mecanismo luteolítico, aumentando a proporção de fêmeas com formação de CL de duração fisiológica no anestro pós-parto (MANN & LAMMING, 2000). Porém, os fatores envolvidos na luteólise prematura não estão totalmente esclarecidos, sabe-se que a liberação de $PGF_2\alpha$ do útero é determinante para ocorrer este processo. Entretanto limitada informação existe sobre o mecanismo responsável pelo desencadeamento dos eventos luteolíticos, mas provavelmente envolva modificações hormonais e na expressão de receptores esteróides nos tecidos luteais e endometriais.

De posse dessa realidade, foram delineados experimentos para testar a hipótese de que a aplicação de MAP e BE regula os receptores de esteróides no CL e endométrio durante o primeiro ciclo estral pós-parto. Além disso, foi avaliada se a injeção de eCG um dia antes da remoção do implante vaginal de MAP provoca um crescimento do folículo dominante compatível com a resposta ovulatória ao GnRH, resultando em um maior índice de fertilidade, em processos mistos de observação de estro e IA em tempo fixo (IAETF) em bovinos. O objetivo deste estudo foi de conhecer o efeito da associação gestágenos-BE na expressão de receptores esteróides ($RE\alpha$, $RE\beta$ e RP) no endométrio e CL de vacas no primeiro ciclo estral pós-parto, e desenvolver um sistema de indução de estro que resulte em índices de prenhez similar aos sistemas de IA convencional em vacas desmamadas, através da determinação do melhor momento para aplicação do BE e eCG em protocolo de gestágeno por sete dias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Período pós-parto

O prolongado período de anestro pós-parto é o mais importante fator de baixos índices reprodutivos, constituindo a principal fonte de perdas econômicas na produção de gado de corte. Dentre as diferentes causas desse problema, a subnutrição e o anestro lactacional têm sido considerados os principais responsáveis pela duração da aciclia e da baixa eficiência reprodutiva pós-parto (SHORT, et al., 1990).

A interação desses e de outros fatores, como a presença do terneiro, ocasionam um *feedback* negativo na liberação de GnRH e conseqüentemente diminuição na freqüência de pulsos de LH, resultando em deficiente maturação terminal e falha na ovulação dos folículos dominantes. A causa primária da freqüência inadequada de pulsos de LH é a diminuição dos estoques desse hormônio na hipófise anterior, que se restabelecem entre 15 e 30 dias pós-parto. Porém, a aumentada sensibilidade do pulso gerador de GnRH hipotalâmico ao efeito de *feedback* negativo do estradiol 17 β ovariano do pós-parto, resulta em ausência de pulsos de GnRH e, conseqüentemente, de LH (Para revisão YAVAS & WALTON, 2000; WILTBANK et al., 2002). Durante o período pós-parto, ocorre crescimento de folículos, caracterizando ondas foliculares sem que ocorra o pico ovulatório de LH e a ovulação (ROCHE e et al., 1992).

O retorno a ciclicidade após o parto tem como principais envolvidos a CC no momento do parto, o ganho de peso, o balanço energético e a redução do estímulo da amamentação. A CC momento da parição, a perda de peso e conseqüentemente balanço energético negativo nas primeiras semanas após o parto, determinam o período de anestro pós-parto (FERREIRA, 1995). O escore de CC na parição é correlacionado positivamente com o desenvolvimento folicular precoce no período pós-parto (RYAN et al., 1994), conteúdo pituitário de LH aos 30 dias pós-parto (CONNOR, et al., 1990), concentrações de fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) circulantes e ainda na freqüência dos pulsos de LH (BISHOP et al., 1994). A CC influencia no desenvolvimento de folículos estrogênio-ativos (PINTO ANDRADE et al., 1995) e no número de ondas foliculares até que ocorra a primeira ovulação pós-parto (WILTBANK et al., 2002).

Independente da amamentação, no período de pós-parto precoce, a ausência de pulsos de LH deve-se a falta deste hormônio no estoque da hipófise anterior. Após o

restabelecimento dos estoques de LH, a ausência de seus pulsos torna-se dependente dos efeitos da amamentação.

A amamentação suprime o retorno dos pulsos de LH pela estimulação tátil do úbere ou tetos pelo terneiro (WILLIAMS et al., 1987), entretanto outros fatores como a visão e o olfato também têm ação inibitória na liberação do LH (GRIFFITH & WILLIAMS, 1996). A presença física do terneiro modula o efeito supressivo da amamentação na ovulação pós-parto, por afetar sinais somatossensoriais (WILLIAMS & GRIFFITH, 1995). Esse efeito é significativamente maior quando as vacas amamentam seu próprio terneiro (LAMB et al., 1997). As práticas de desmame constituem uma alternativa para o desbloqueio dos efeitos da amamentação sobre o eixo hipotálamo-hipofise-ovariano.

Vários neurotransmissores são indicados como mediadores dos efeitos da amamentação, no hipotálamo, entre eles, os opióides endógenos. As concentrações de opióides endógenos estão relacionadas com a síntese e liberação de GnRH. A utilização de antagonista opióide, provoca aumento na secreção de LH (para revisão: WILLIAMS, 1990). Porém, parece que o envolvimento, no controle da liberação de LH é parcial, pois prolongados tratamentos com seu antagonista resultam em liberação temporária desse hormônio, sem ovulação (para revisão: SHORT et al., 1990).

A leptina tem sido apontada como responsável pela ligação entre o estado metabólico e a capacidade reprodutiva. Essa proteína é secretada pelos adipócitos e a sua função é contribuir na regulação do metabolismo energético, comportamento alimentar e na reprodução de várias espécies, incluindo os bovinos (Para revisão SMITH et al., 2002). A leptina age na liberação de LH, por ação direta na secreção basal (AMSTALDEN, et al., 2003) e indiretamente, influenciando a liberação do GnRH. O neuropeptídeo Y (NPY) é o mediador primário da ação da leptina no hipotálamo (HOUSEKNECHT & PORTOCARRERO, 1998), regulando o LH e a somatotrofina, com uma modulação positiva ou negativa conforme o estado fisiológico do animal (McDONALD et al., 1989; McSHANE et al., 1992). A atividade e as concentrações circulantes de leptina, em bovinos, mudam em associação ou em resposta a estímulos nutricionais, ambientais e de maturidade sexual (WILLIAMS et al., 2002). Os níveis plasmáticos de leptina são proporcionais a massa de tecido adiposo e diminuem após a perda de peso corporal (MAFFEI et al., 1995).

Os níveis plasmáticos de glicose, insulina e IGF-I, frequência de pulsos de LH, concentrações séricas de P_4 apresentam-se reduzidas e a atividade ovariana alterada em animais com balanço energético negativo. Essa condição nutricional afetada também a

viabilidade oocitária, o crescimento folicular, a função luteal e conseqüentemente a fertilidade (SANTOS & AMSTALDEN, 1998).

Com o aumento do período após o parto, ocorre uma redução na sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, desencadeando a primeira ovulação pós-parto. Esta ovulação resulta em ciclo estral de menor duração, reduzida manifestação de sinais de estro (SHORT et al., 1990; MURPHY et al., 1990; PERRY et al., 1991) e baixa fertilidade (RAMIREZ-GODINEZ et al., 1981, SCHRICK et al., 1993, BREUEL et al., 1993). Esses fatos são decorrentes da formação de um CL que permanece em atividade biológica por um período de 7 a 10 dias, sofrendo luteólise precoce (RAMIREZ-GODINEZ et al., 1981; PERRY et al., 1991; ZOLLERS et al., 1993) que antecede o retorno dos ciclos estrais normais.

O conjunto de fatores que influencia no período de anestro pós-parto afeta diretamente a produtividade do rebanho por afetar de maneira direta no número de crias ao ano. O intervalo parto-concepção é considerado o indicador da produção por vaca/ano, sendo esse aspecto determinante para verificação do retorno econômico do setor pecuário. Para atenuar os prejuízos causados neste período, várias alternativas de manejo têm sido desenvolvidas, como é o caso de melhorias no manejo nutricional, que visam reduzir o balanço energético negativo após o parto; práticas de desmame com o objetivo de minimizar os efeitos inibitórios causados pela amamentação; e os tratamentos hormonais, que simulam a fisiologia da fêmea e buscam a antecipação da ciclicidade pós-parto.

A adequação do manejo nutricional, evidentemente é a maneira mais fisiológica de ajustar as necessidades da fêmea às exigências do período, porém, freqüentemente a adoção de medidas de melhorias nutricionais torna-se inviável pela relação custo/benefício. As práticas de desmame têm sido muito utilizadas e podem ser realizadas de várias maneiras, por períodos e momentos diferentes (ROSA & REAL, 1978; PIMENTEL, et al., 1979; CANTO, et al. 1998). O desmame precoce aos 60 dias baseia-se no afastamento total e definitivo dos terneiros. Esse tipo de desmame tem mostrado resultados satisfatórios, porém dependentes das variações climáticas de cada ano e com custos de implantação bastante elevados. O desmame temporário por separação total do terneiro por quatro dias influencia no retorno aos ciclos estrais, porém com resultados condicionados a uma CC adequada. O potencial efeito da interrupção na mamada ocorre se a prática estiver acompanhada de hormônios exógenos, por maximização das respostas neuroendócrinas e ovarianas (TROXEL et al., 1993). Os tratamentos hormonais são utilizados há bastante tempo, auxiliando ao retorno a ciclicidade pós-parto, porém com taxas de prenhez variáveis, interagindo em grande parte com o meio ambiente e CC dos animais.

Para o controle racional da reprodução através do uso adequado de procedimentos como a manipulação do ciclo estral, com o objetivo de indução ou sincronização do estro/ovulação, é necessário o conhecimento da dinâmica folicular (NEVES et al., 1999). O ciclo estral em bovinos é dinâmico, caracterizado pelo crescimento em ondas foliculares, que são definidas por uma seqüência de eventos que incluem o recrutamento e desenvolvimento sincronizado de vários folículos, seleção e dominância seguida de uma supressão temporária do crescimento folicular. Durante o ciclo estral duas ou três ondas de desenvolvimento folicular ocorrem, cada uma produzindo um folículo dominante capaz de ovular se a regressão luteal ocorrer (GINTHER et al., 1989; SANTOS & NEVES, 1994).

O mecanismo que determina a dominância não é totalmente conhecido. Durante e após o estabelecimento da dominância ocorrem importantes modificações intra-foliculares do IGF-I e suas proteínas de ligação (IGFBP), inibina, ativina no folículo dominante, demonstrando o envolvimento desses fatores. O folículo dominante possui maiores concentrações de ativina e a inibina, com efeito negativo na secreção de FSH, e mais receptores de gonadotrofinas e enzimas esteroidogênicas (FORTUNE et al., 2001). Além disso, o folículo dominante alcança um diâmetro superior, e secreta estradiol, entre outros componentes que controlam a secreção de FSH, impedindo o crescimento dos folículos subordinados. Esse processo ocorre de forma cíclica e as ondas de crescimento folicular são precedidas por um aumento transitório de FSH. O período de dominância chega ao seu final culminando com ovulação ou atresia do folículo dominante, o que é dependente do padrão de pulsos do LH, regulado pelos níveis de P_4 do CL. Então ocorre novamente o recrutamento, caracterizando o recomeço de uma nova onda folicular, tornando os acontecimentos ovarianos cíclicos (DRIANCOURT, 2001).

A exposição prolongada a P_4 aumenta a dominância do folículo, tornando-o persistente, com maior número de células das camadas da granulosa e teca, e secreção de altos níveis de estradiol. O aumento na frequência de pulso de LH está relacionado com as baixas concentrações de P_4 plasmática e os aumentados níveis de estradiol circulantes. Com a dominância contínua, o programa de desenvolvimento folicular torna-se desorganizado e apesar da capacidade ovulatória dos folículos em resposta a uma redução na P_4 , seus oócitos são freqüentemente inférteis (FORTUNE & RIVERA, 1999).

Em programas de indução/sincronização de estro, a associação do estradiol ao gestágeno tem como principal objetivo a regressão do folículo dominante, seguido de recrutamento, seleção e dominância folicular, caracterizando o início de uma nova onda folicular, com potencial poder fertilizante (RIVERA et al., 1998; BO et al., 2000). O momento da aplicação do estradiol, pode ser o ponto chave para o sucesso destes programas,

particularmente em vacas em anestro pós-parto, com concentrações séricas de P_4 menores que 1 ng/ml de sangue. O sucesso para obtenção de eficientes taxas reprodutivas com a utilização de protocolos hormonais, está relacionado não somente com uso de hormônios que possam garantir a ovulação do folículo dominante, mas também com as condições em que se encontra esse folículo, o que é totalmente dependente de uma eficaz sincronização da nova onda folicular e aplicação dos protocolos hormonais em momentos específicos a partir desse recrutamento

Os protocolos de indução/sincronização do estro são muito estudados e amplamente utilizados. Os produtos usados variam em concentração, via e momento de aplicação, buscando os melhores resultados reprodutivos. Os programas variam desde as combinações de gestágeno e estradiol, com observação de estro por período definido (VOGG et al. 2004) sistemas que incluem gonadotrofinas e indutores da ovulação com observação de estro ou IATF (MACIEL et al., 2001; PORTELLA et al., 2002; BRAGANÇA et al., 2004; BASTOS et al., 2004; BARUSELLI et al., 2004).

O desenvolvimento de protocolos de IATF visa principalmente, reduzir a mão-de-obra, viabilizando a inseminação de vacas amamentando, porém apresentam taxas de prenhez que variam de 20 a 50% (JORDAN et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002; CAVESTANY, et al., 2003; HIERS et al., 2003; BARUSELI et al., 2004; BARTOLOME et al., 2005a,b). No período pós-parto, estes resultados podem ser atribuídos ao modelo de ondas foliculares, com folículos dominantes que não atingem diâmetros necessários para ovular, entrando em atresia, e, provavelmente sem a capacidade de responder aos indutores da ovulação (WILTBANK et al., 2002).

2.2 Corpo lúteo

Em 1628, Marcello Malpighi denominou a estrutura luteinizada pós-ovulação de corpora (corpo) lutea (amarelo), e Regnier De Graaf denominou de estruturas globulares em ovários de coelhas, relatando que essas estruturas permaneciam até o momento da parição (Para revisão NISWENDER et al., 2000). Desde então, houve uma sucessão de descobertas relacionadas a essa glândula e sua regulação, porém muitos dos mecanismos regulatórios envolvidos não são completamente compreendidos. O CL é a única glândula reprodutiva transitória regulada por hormônio, que produz P_4 , o produto requerido para o estabelecimento e manutenção da prenhez.

O CL desenvolve-se a partir do folículo ovulatório, em resposta a luteotrofinas, transformando camadas celulares da granulosa e da teca, responsáveis pela produção de

estrógenos em células produtoras de P_4 . Seguindo a sua diferenciação, o CL é composto por células luteais grandes (CLG) e pequenas (CLP), em função do seu tamanho, que produzem esteróides, e são reguladas por diferentes mecanismos (FITZ et al., 1982; ALILA et al., 1988; HANSEL et al., 1991). Os hormônios luteotróficos dão suporte ao crescimento e função luteal, aumentando em tamanho e na habilidade de produzir P_4 .

As concentrações de P_4 são dependentes da capacidade de síntese do tecido esteroideogênico e do fluxo sanguíneo. A mais alta produção desse hormônio ocorre no dia 12 do ciclo estral. Simultaneamente, são alcançados o máximo peso luteal, fluxo sanguíneo, número e volume de CLP e CLG, e expressão de receptores de LH (NISWENDER et al., 2000). Também, os substratos para essa produção, o citocromo P450 cadeia de clivagem lateral (P450_{scc}) e o 3 beta hidroxisteroide dehidrogenase isomerase (3 β HDS), atingem níveis máximos a partir do dia nove do ciclo e se mantém constantes até o dia 12.

Para o estabelecimento do novo suprimento sanguíneo, vários tipos celulares estão envolvidos. Os fatores de crescimento, especialmente fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF A) e fator de crescimento básico de fibroblasto (FGF-2) são importantes para o desenvolvimento e total formação dos capilares. Evidências indicam que os principais hormônios endócrinos são LH e hormônio do crescimento (GH). Ainda, fatores do crescimento, peptídeos, esteróides e prostaglandinas são importantes moduladores da função luteal. Durante o desenvolvimento precoce do CL até a fase luteal média (d8-d12) a proliferação celular é estimulada pela ocitocina, prostaglandinas e P_4 e a função suportada pela ação luteotrófica de fatores de crescimento (VEGF, FGF-1, FGF-2, IGFs; SCHAMS & BERISHA, 2004).

As CLP expressam receptores de LH, o principal hormônio que estimula a produção P_4 neste tipo celular. O mecanismo pelo qual LH estimula a secreção desse hormônio envolve a formação de cAMP, ativação de PKA. Os receptores de GH estão localizados principalmente nas CLG (LUCY et al., 1993; KIRBY et al., 1996; KOELLE et al., 1998). Essas células são responsáveis por 80% da produção de P_4 pelo CL (NISWENDER et al., 1985). O GH é indicado como estimulador da secreção de P_4 e ocitocina *in vitro* (LIEBERMANN & SCHAMS, 1994) e suporta o desenvolvimento do CL *in vivo* (LUCY et al., 1994; JUENGEL et al., 1997).

Na ausência da prenhez, o CL cessa a produção de P_4 , começa a regressão em tamanho da massa tecidual e perde a integridade celular. O processo de regressão luteal tem sido estudado por várias décadas, porém muitos dos mecanismos regulatórios envolvidos na perda de função e na involução do CL ainda permanecem desconhecidos. A complexidade dos

mecanismos que regulam a vida do CL é composta pela presença de uma população heterogênea de células que respondem diferentemente aos mesmos agentes ligantes ou estímulos.

A P_4 regula a duração do ciclo estral, por influenciar no sinal luteolítico de $PGF_{2\alpha}$ no endométrio. A cascata de mediadores é bastante complexa e envolve fluxo sanguíneo, citocinas inflamatórias, peptídeos vasoativos (angiotensina II e endotelina I), oxigênio reativo, fatores de crescimento angiogênicos (VEGFs, FGFs, IGFs) e redução dos componentes luteotróficos clássicos (receptor de LH e GH, P450_{scc}, 3 β -HSD; SCHAMS & BERISHA, 2004)

O controle neuroendócrino da luteólise proposto é devido ao retorno da ação do estrógeno, pela *downregulation* dos RP no hipotálamo e endométrio. Esses eventos servem de estímulo para o pulso gerador de ocitocina hipotalâmico, resultando na secreção de baixos e intermitentes níveis de ocitocina e *up regulation* dos seus receptores endometriais. Essa interação promove a liberação de níveis subluteolíticos de $PGF_{2\alpha}$, suficiente para começar a secreção de ocitocina luteal, via receptor de alta sensibilidade no CL (HFPR). A partir dessa ativação, começa a secreção suplementar de ocitocina luteal, provocando uma liberação adicional de $PGF_{2\alpha}$ capaz de ativar os receptores de baixa sensibilidade (LFPR) e inibir a secreção de P_4 . Essas regulações cíclicas parecem continuar até que os receptores de $PGF_{2\alpha}$ tornem-se desensibilizados, cessando a liberação de ocitocina luteal (para revisão McCracken et al., 1999).

O envolvimento da P_4 e do estradiol no processo luteolítico não está ainda compreendido, podendo atuar na regulação de enzimas necessárias para biossíntese de $PGF_{2\alpha}$ ou controlar receptores endometriais de ocitocina. A P_4 , a ocitocina e as prostaglandinas luteais são componentes de uma cascata de *feedback* positivo no CL precoce ou médio do ciclo estral e podem ser responsáveis pela resistência do CL precoce a ação da $PGF_{2\alpha}$ exógena (SKARZYNSKI & OKUDA, 1999). O mecanismo pelo qual o estrogênio 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).

A luteólise pode ser definida como perda da função esteroidogênica e involução estrutural do CL. A perda da capacidade de produzir P_4 ocorre por mecanismo independente e anterior aqueles responsáveis pela apoptose, durante a involução tecidual (CARAMBULA et al., 2002).

Em condições *in vitro* até o dia 12 do ciclo estral, a P₄ mostra um evidente efeito de inibição da secreção de PGF₂α. Após esse momento, o tecido torna-se desensibilizado e PGF₂α passa a não ser mais inibida. A sensibilidade do tecido endometrial a P₄ está correlacionada com a expressão endometrial dos receptores de estrógeno, ocitocina e P₄ (MEYER et al., 1988).

Além da PGF₂α, 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. A PGF₂α exógena induz a expressão de cyclooxygenase (COX-2) nas CLG, redução na liberação intra-luteal de P₄ 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).

O mecanismo de luteólise no primeiro ciclo estral após o período de transição de anestro ao retorno da ciclicidade pós-parto ocorre precocemente e tem como resultado, uma primeira ovulação com formação de um CL de vida curta (RAMIREZ-GODINEZ et al., 1981; SCHRICK et al., 1993; BREUEL et al., 1993). Estudos sugerem uma redução no número de receptores de LH e FSH nos folículos ovulatórios que darão origem a primeira ovulação e formação luteal pós-parto, resultando em CL de vida curta (BRADEN et al., 1989). A estrutura lútea possivelmente sofre um processo de lise precoce devido a liberação prematura de PGF₂α pelo endométrio uterino causando a luteólise (COPELIN et al., 1989; BUFORD et al., 1994), porém o mecanismo que desencadeia esse processo não é totalmente conhecido.

A P₄ produzida durante os ciclos estrais de fase curta é requerida para que ocorra uma fase luteal regular antes da primeira ovulação, concepção e manutenção da gestação (CORAH et al., 1974; RAMIREZ-GODINEZ et al., 1981). Dessa maneira, o pré-tratamento com P₄ sintética é capaz de aumentar a proporção de vacas que formam CL com período de vida normal no anestro pós-parto (GARCIA-WINDER, et al., 1987; TROXEL et al., 1993) e incrementar a fertilidade. Esse efeito pode ser devido a uma redução nos receptores uterinos de ocitocina (MANN & LAMMING, 2000). Estudos *in vitro* mostram que a P₄ inibe receptores de ocitocina, enquanto o estradiol estimula a liberação de PGF₂α (MANN, 2001).

2.3 Receptores esteróides

Os ovários das espécies mamíferas são compostos por tecidos muito dinâmicos, com mudanças cíclicas de maturação folicular, ovulação, formação do CL e luteólise. Esses processos estão sob controle endócrino, em particular de gonadotrofinas hipofisárias, FSH e LH, que induzem numerosas interações moleculares intra e extracelulares. Os esteróides ovarianos são classificados quimicamente ou com base nas suas principais funções biológicas dentro de três classes: progestágenos, andrógenos e estrógenos (estrona e estradiol-17 β). Os receptores esteróides têm um domínio DNA ligante, seguido de um domínio ligante C-terminal. Todos os receptores esteróides possuem um domínio DNA ligante composto de duas partes de zinco, seguido de domínio ligante C-terminal. Para os estrógenos exercerem sua ação nas células ovarianas específicas, os seus receptores estão presentes e geralmente ocorre uma ativação gênica induzida pelo estrógeno (ação genômica). Alguns estudos indicam que os receptores de estrógeno (RE α e RE β), podem estar localizados na membrana celular e modular a atividade celular sem associação direta com o DNA (ações não genômicas). Os efeitos não genômicos são muito rápidos, não são bloqueados por inibidores de mRNA ou síntese de proteína, podem ser bloqueados por antagonistas clássicos de receptores esteróides genômicos, são muito específicos e ainda, os seus efeitos podem ser induzidos com doses fisiológicas (SCHAMS & BERISHA, 2002).

Os RP estão distribuídos amplamente no ovário, localizados no CL, 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 lumenal e carúncula (KIMMINS & MACLAREN, 2001). A menor expressão de RP nas células luteais em relação as foliculares, indica um efeito de *downregulation* local da P₄. Durante a prenhez, a redução da expressão destes receptores está relacionada ao longo período de exposição a P₄ luteal.

Existem dois subtipos de receptores de estrógenos identificados como receptor-alfa (ER α) e receptor-beta (ER β). O RE α está distribuído no ovário bovino, incluindo células da teca, do estroma superficial e profundo, túnica albugínea e superfície do epitélio. Os folículos terciários também expressam RE α , porém em menores concentrações (VAN DEN BROECK et al., 2002b). No útero, os receptores esteróides são expressos no estroma e epitélio glandular (KIMMINS & MACLAREN, 2001).

A expressão de receptores esteróides em diferentes partes do ovário está relacionada com os níveis circulantes de P₄. No CL e nas células da teca de folículos secundários, a maior expressão de RE α está positivamente correlacionada com os níveis plasmáticos de P₄,

enquanto o oposto foi encontrado no estroma superficial e profundo e túnica albugínea. Animais gestantes apresentam menor expressão de RE α do que vacas ciclando (com níveis plasmáticos de P₄ maiores que 3 ng/ml) nas células do estroma, túnica albugínea e superfície do epitélio. Em contraste, o mesmo grupo de vacas, apresentou maior expressão deste receptor nas células da teca de folículos secundários e terciários e estroma profundo. Esses achados indicam efeito indireto do estrógeno no desenvolvimento e função folicular por interações estroma/epitélio. Entretanto a exata função do ER α no ovário bovino parece ser dependente das variações do ciclo estral (VAN DEN BROECK et al., 2002b).

Durante o ciclo estral, a expressão dos receptores esteróides no 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 RE α , possivelmente causada pelos altos níveis de P₄. Em contraste, o RE β , nas fases tardia e de regressão do CL tem um aumento significativo na sua expressão (BERISHA et al., 2002).

O CL bovino expressa aromatase durante todo o ciclo estral, sendo capaz de produzir estradiol. A mais alta expressão da aromatase ocorre nas fases média a tardia do ciclo (OKUDA et al., 2001). Embora não se conheça exatamente a significância fisiológica do estradiol luteal como fator endócrino em bovinos, sua função como regulador autócrino e parácrino já foi relatada em suínos (PITZEL et al., 1990) e humanos (MAAS et al., 1992) e provavelmente em bovinos esse hormônio de origem luteal, seja responsável por funções regulórias reprodutivas.

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**EFEITO DA PRÉ-EXPOSIÇÃO DE GESTÁGENOS NA
EXPRESSÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES PELO CORPO
LÚTEO DE VIDA CURTA E ENDOMÉTRIO DE VACAS EM
ANESTRO PÓS-PARTO**

**Rosane da Silveira Loguercio, Luciano Pinto Loguercio, Cláudio
Alves Pimentel, Henrique Kurtz Löf, Rafael Fernandes, Valério
Valdetar Marques Portella Jr., João Francisco de Oliveira, Paulo
Bayard Dias Gonçalves**

Revista Brasileira de Reprodução Animal, 2005

Efeito da pré-exposição de gestágenos na expressão de receptores esteróides pelo corpo lúteo de vida curta e endométrio de vacas em anestro pós-parto

Rosane da Silveira Loguercio¹, Luciano Pinto Loguercio², Cláudio Alves Pimentel³, Henrique Kurtz Löff¹, Rafael Fernandes¹, Valério Valdetar Marques Portella Jr.¹ João Francisco de Oliveira¹, Paulo Bayard Dias Gonçalves^{1*}

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Clínica de Grandes Animais
Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal - BioRep, Santa Maria, RS, Brasil.

² Granjas 4 Irmãos S&A, Rio Grande, RS, Brasil.

³ Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Patologia Animal, Pelotas, RS, Brasil.

*Endereço para correspondência e pedidos de separatas: Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves,
Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal – BioRep, Universidade Federal de Santa
Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. e-mail: bayard@biorep.ufsm.br

Telefone: 55-55-3220-8484 ou 55-55-3220-8752 e fax: 55-55-3220-8484

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o mecanismo de luteólise do CL de vida curta, investigando a pré-exposição a gestágenos na expressão de receptor de estrógeno alfa (RE α), beta (RE β) e receptor de progesterona (RP) no endométrio e CL de vacas no primeiro ciclo estral pós-parto. Dez vacas com 30 dias de anestro pós-parto foram divididas em dois grupos. No grupo tratamento (AN+MAP; n=5), as vacas foram submetidas a implante vaginal com medroxiprogesterona por 7 dias (MAP; 250 mg; implante vaginal) e 5 mg de benzoato de estradiol (BE; im) na colocação do implante. O grupo AN (n=5), foi utilizado como controle

em anestro. Foi realizado acompanhamento da onda folicular diariamente e quando o folículo dominante alcançou diâmetro de 12 mm, as vacas de ambos os grupos (AN e AN+MAP) receberam gonadorelina (agonista do GnRH; 100 µg im) para formação de um corpo lúteo (CL). Após 7 dias, foram coletados tecidos luteal e endometrial. As amostras obtidas foram destinadas a expressão gênica (RT-PCR) e avaliação histológica endometrial e luteínica. A pré-exposição ao gestágeno no primeiro ciclo estral pós-parto resultou em uma maior expressão endometrial do RP (grupo AN+MAP; $P < 0,05$). Os indivíduos do grupo AN+MAP não expressaram $RE\beta$ no tecido endometrial, diferindo do grupo AN ($P < 0,05$). A expressão do $RE\alpha$, no endométrio não foi diferente nos grupos ($P > 0,05$). No CL, não houve diferença na expressão dos receptores esteróides ($P > 0,05$). As medidas de altura do epitélio glandular endometrial e número total de células luteais grandes, encontradas no grupo AN+MAP foram maiores que no grupo em anestro (AN; $P < 0,05$). Esses achados indicam que a exposição do gestágeno e BE no mecanismo de luteólise precoce, durante o primeiro ciclo estral pós-parto, envolve aumento da expressão de RP e inibição de $RE\beta$ no endométrio, modificações no epitélio glandular endometrial e na população de células luteais.

Palavras-chave: CL de vida curta, anestro pós-parto, receptores esteróides, RT-PCR

Introdução

Os bovinos apresentam um período de anestro após o parto, responsável pelas principais perdas econômicas no setor pecuário [1]. A primeira ovulação pós-parto nessa espécie, geralmente, é associada ao desenvolvimento de um corpo lúteo (CL) de vida curta [2-4], resultando em ciclo estral de menor duração, reduzida manifestação de sinais de estro [1,3,5] e conseqüente baixa fertilidade [1,6,7].

O processo de luteólise ocorre prematuramente, sendo que a glândula transitória permanece por um período de 7 a 10 dias em atividade biológica. Porém, esse evento parece

ser necessário para um retorno a ciclicidade normal, concepção e/ou manutenção da gestação [2,7,8]. A causa da redução na fertilidade ainda não está totalmente esclarecida, além da prematura luteólise, é possível que as baixas taxas de prenhez sejam resultado da ovulação de um oócito incapaz de ser fertilizado, se desenvolver ou ainda de um ambiente inapropriado para o transporte e desenvolvimento embrionário [7].

Os hormônios esteróides estão envolvidos na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, preparação do ambiente uterino para o desenvolvimento do embrião, manutenção da gestação e regulação de funções ovarianas, como crescimento folicular final, formação e função do CL. Os seus receptores, o de estrógeno das subunidades α e β e de P_4 , estão amplamente distribuídos nas estruturas ovarianas foliculares e luteais [9,10] e uterinas [11]. Também, o processo de luteólise, parece ser dependente da regulação destes receptores esteróides [12].

Com base nas funções conhecidas dos hormônios esteróides, vários protocolos hormonais a base de gestágenos são utilizados, simulando a função fisiológica de pré-exposição a progesterona (P_4). Essas alternativas apresentam como resultados a indução da atividade cíclica, diminuição do período improdutivo e em geral resultam em incremento nos índices reprodutivos pós-parto [13-16]. Porém, esses sistemas apresentam uma grande variabilidade nos resultados de prenhez, devido a influência de fatores externos na resposta dos animais e desconhecimento dos fatores envolvidos na luteólise prematura no primeiro ciclo estral pós-parto e ainda dos mecanismos responsáveis pelo incremento nas taxas reprodutivas após o uso de gestágenos.

Baseado nessas informações, foi formulada a hipótese de que uma pré-exposição ao gestágeno no primeiro ciclo estral pós-parto, altera os níveis de expressão de receptores esteróides no endométrio e CL, capaz de inibir o início precoce da cascata luteolítica no primeiro ciclo estral pós-parto. O objetivo do experimento foi avaliar o mecanismo de

luteólise no primeiro ciclo estral pós-parto (CL de vida curta), através da determinação do efeito da pré-exposição a gestágenos e BE na expressão de receptores esteróides ($RE\alpha$, $RE\beta$ e RP) no endométrio e CL de vacas em anestro pós-parto.

Material e Métodos

Animais e colheita dos materiais

Dez vacas de corte, múltíparas, de raças européias (cruzas da raça Angus hereford e charolês), com idades entre 3 e 5 anos, amamentando e em anestro pós-parto foram utilizadas. A condição de anestro foi determinada pela baixa contratilidade uterina e ausência de CL, confirmada por ultra-sonografia aos 30 dias pós-parto [17,18].

A partir dos 30 dias após a parição, os animais foram submetidos a exames diários de ultra-sonografia para o acompanhamento das ondas foliculares. Estes animais foram divididos em dois grupos. No grupo tratamento (AN+MAP; n=5), as vacas estavam em anestro, mas foram submetidas a um implante vaginal com medroxiprogesterona por 7 dias (MAP 250 mg implante intra-vaginal Purifarma) e uma injeção de 5 mg de benzoato de estradiol (BE im Purifarma) na colocação do implante. Após a retirada do implante foi realizado o acompanhamento diário da dinâmica folicular. No grupo AN (n=5), os animais também estavam em anestro e não receberam gestágenos e BE, sendo utilizados como controle, sendo monitorados diariamente por ultra-sonografia. No momento em que o folículo dominante alcançou diâmetro de 12 mm, as vacas de ambos os grupos (AN e AN+MAP) receberam 100 μ g i.m. de gonadorelina (agonista do GnRH-Profertil Tortuga) [19] para induzir a ovulação e formação de um CL. Após 7 dias da aplicação de gonadorelina, foram obtidos tecidos luteal e endometrial. Para isso, as vacas receberam anestesia epidural (lidocaína) e foram submetidas a ovariectomia unilateral, retirando o ovário ipsilateral ao CL, também foi realizada a biópsia endometrial. Esses procedimentos foram realizados da mesma maneira em ambos os grupos.

As amostras destinadas a expressão gênica foram congeladas imediatamente após a colheita e armazenadas a -196°C , em nitrogênio líquido. As amostras para avaliação histológica foram fixadas e armazenadas em Bouin.

As curvas de crescimento folicular monitoradas durante o anestro pós-parto, a partir dos 30 dias após a parição até o momento da aplicação do GnRH para os grupos de animais em anestro controle (AN) e pré-expostos ao MAP estão representadas na Fig. 1.

Extração do RNA total

A extração do RNA foi realizada com a utilização de Trizol (Invitrogen). Para quantificar o RNA total extraído, a densidade ótica foi determinada com espectrofotômetro (Biotech Photometer UV 1101). A integridade do RNA foi verificada eletroforeticamente por coloração com brometo de etídio e a pureza através da taxa de absorção da relação $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ [20].

Transcrição reversa e Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A sequência dos primers utilizados receptor de estrógeno alfa ($\text{RE}\alpha$), beta ($\text{RE}\beta$) e receptor de progesterona (RP) [20] e Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [21] estão na Tabela 1.

Para obtenção do cDNA, foi utilizado 1 μg de RNA, oligo-dt primer (0,5 μg ; Invitrogen) e inibidor da RNase (1 U; RNaseOUT; Invitrogen) em uma reação de 20 μl através do kit OmniscriptTM Reverse Transcriptase[®] (Quiagen). As condições de amplificação do cDNA para cada reação foram as seguintes: 16,5 μl de água, 2,5 μl de buffer (1x), 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 μM de cada primer, 0,2 μM de cada dNTP e 1,25 U de TAQ DNA polimerase (Invitrogen) para 3 μl de cDNA (volume final de 25 μl). Para validação dos resultados de expressão relativa dos genes de interesse com o gene constitutivo (GAPDH) foi realizada a

verificação da fase exponencial específica para cada iniciador, sendo a análise feita a partir de seis curvas com intervalo constante de número de ciclos. A amplificação foi realizada com uma primeira etapa de desnaturação a 94⁰C por 3 minutos, seguido de ciclos com desnaturação inicial a 94⁰C por 1 minuto, anelamento por 45 segundos e alongação por 1 minuto a 72⁰C e passo final de 72⁰C por 5 minutos. As condições de amplificação diferiram para cada iniciador na temperatura de anelamento e no número de ciclos (de acordo com a fase exponencial). O RP foi amplificado em 33 ciclos, em temperatura de anelamento de 55⁰C. Os RE α e RE β foram amplificados em 35 ciclos, em temperatura de anelamento de 56⁰C e 62⁰C, respectivamente. O GAPDH foi amplificado em 31 ciclos sob 55⁰C de temperatura de anelamento.

Alíquotas de 5 μ l foram adicionadas a 1 μ l 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 DNA, de peso molecular conhecido (Ready-Load 100 bp DNA Ladder, Invitrogen). 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 1000 (Alpha Ease FC, Alpha Innotech Corporation, 2002).

Os produtos oriundos do RT-PCR, amplificados (Fig. 2) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, resultaram em uma única banda de 227 pb para RP, 234 pb para RE α , 262 pb para RE β e 847 pb para GAPDH.

Análise histológica

O material destinado à histologia foi fixado e conservado em Bouin por 24 horas, desidratado em passagens sucessivas em álcool, diafanizado em xilol, incluído em parafina e corado pela hematoxilina-eosina. A altura do epitélio glandular foi medida por imagens digitalizadas e a avaliação destas imagens foi realizada através do programa Scion Image for

Windows (Scion Corporation, Maryland-USA). Para avaliar a estrutura do CL, foram contadas células grandes e pequenas em 30 campos aleatórios, com um aumento de 400x [22].

Análise estatística

Os dados foram normalizados através do PROC RANK e os tratamentos foram comparados por análise da variância do programa SAS [23].

Resultados

Expressão de RNA nos tecidos específicos

A expressão de RP no endométrio dos animais do grupo AN+MAP foi maior do que a do grupo AN ($P < 0,05$). A expressão de RE β no endométrio foi totalmente bloqueada pela presença do MAP, diferindo dos animais do grupo AN ($P < 0,05$; Tab. 2). Os grupos AN e AN+MAP não tiveram diferença na expressão endometrial de RE α ($P > 0,05$; Tab. 2).

A expressão luteal dos receptores esteróides não foi diferente nos dois grupos investigados ($P > 0,05$; Tab. 2).

O diâmetro folicular encontrado no momento da aplicação do agonista do GnRH (entre 10 e 16 mm), não influenciou ($P > 0,05$) na expressão dos receptores esteróides pelas células luteais.

Análise histológica

O MAP e BE induziram a um aumento da altura do epitélio endometrial (AN+MAP= 12,36 μm e AN= 8,27 μm ; $P < 0,05$; Fig.3) e do número total de células grandes no CL (AN+MAP= 473 células; AN= 401 células; $P < 0,05$; Fig.4). O número total de células pequenas não foi diferente entre os grupos ($P > 0,05$; Fig.4).

Discussão

Com o delineamento proposto, foi possível demonstrar que gestágeno e BE modulam a expressão de receptores de esteróides no endométrio, induzindo RP e bloqueando RE β após a primeira ovulação pós-parto e mantendo o CL. Como demonstrado por McCracken [12], o começo do processo de luteólise é dependente de uma *downregulation* nos receptores endometriais e hipotalâmicos de P₄, conseqüente perda da ação desse hormônio, retorno da ação do estradiol e seqüência do mecanismo de lise do CL. Dando suporte ao fato de que a *upregulation* dos RP endometriais, observada neste estudo, é uma evidência de participação da P₄ no bloqueio inicial do mecanismo de luteólise prematura, e esclarece, em parte, a manutenção do CL e os incrementos nos índices reprodutivos obtidos com a utilização de gestágenos prévia ao primeiro ciclo estral pós-parto.

A supressão de RE β endometrial pela pré-exposição ao gestágeno é uma evidência de que em bovinos, como ocorre em ovinos, a concentração plasmática de P₄ regula a expressão de RE no endométrio [24]. Além disso, os resultados indicam que a participação do estradiol na cascata da liberação de PGF₂ α é através dos receptores do subtipo β .

O maior desenvolvimento das glândulas endometriais nos animais pré-sensibilizados com gestágeno e BE indica a participação de esteróides na atividade secretória e preparação uterina para o desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação após a primeira ovulação pós-parto. Essa função poder ser um dos fatores envolvidos no aumento da fertilidade após a utilização de gestágeno e estrógeno em vacas com estro induzido. O incremento dos índices reprodutivos em vacas tratadas com a utilização de gestágenos está bem documentado [2,7,25]. Da mesma maneira, o controle hormonal da PGF₂ α e receptores de ocitocina no endométrio e a necessidade de exposição a P₄ para regulação desses hormônios em bovinos está demonstrada [26]. A pré-sensibilização obtida com esteróides no anestro pós-parto tem como objetivo simular os efeitos fisiológicos decorrentes dos níveis de

P₄ secretado pelo CL de vida curta formado no primeiro ciclo estral após o parto [2-4], objetivando aumento nos índices de prenhez.

O maior número de células luteais grandes (CLG) encontrado nos animais expostos ao gestágeno antes do primeiro ciclo estral pós-parto, indica a superior funcionalidade da estrutura luteal nesse grupo em relação aos animais em anestro. Esse fato baseia-se no conhecimento de que as CLG produzem até 40 vezes mais P₄ que as células luteais pequenas [27]. Embora a estrutura luteal seja constituída apenas por 3,5% de CLG e 26,7% de CLP, 80% da produção total desse hormônio é derivada das CLG [28].

O MAP foi utilizado nesse trabalho em decorrência do seu amplo uso em protocolos de indução e sincronização de vacas de corte no estado do Rio Grande do Sul. Esse gestágeno é empregado em função do seu menor custo em comparação a outros gestágenos e a P₄, com resultados reprodutivos similares aos encontrados em trabalhos que utilizam outras fontes de gestágenos. A conduta adotada para metodologia procurou esclarecer os efeitos do MAP na expressão de receptores esteróides e seus reflexos no processo luteolítico.

Este trabalho demonstra a participação de gestágeno e BE no mecanismo de regulação de receptores esteróides após a primeira ovulação, formação e manutenção do CL pós-parto em bovinos, elucidando parte do mecanismo do fenômeno de luteólise prematura durante o pós-parto em bovinos. O efeito ocorre também no endométrio pelo aumento de RP e da espessura do epitélio e glândulas endometriais, e no CL, pelo maior número de células luteais grandes, sendo, permitindo subsidiar os procedimentos para o incremento na fertilidade obtido com o uso de gestágeno e estrógeno em bovinos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Granja 4 Irmãos S&A pelos animais, ao Laboratório de Patologia da UFPel pelo material histológico e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

- [1]. Short RE, Bellows RA, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Custer EE. Physiological mechanisms controlling anestrus and fertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci* 1990;68:799-816.
- [2]. Ramirez-Godinez JA, Kiracofe GH, McKee RM, Shalles RR, Kittok RJ. Reducing the incidence of short estrous cycles in beef cows with norgestomet . *Theriogenology* 1981;15:613-23.
- [3]. Perry RC, Corah LR, Kiracofe GH, Stevenson JS, Beal WE. Endocrine changes and ultrasonography of ovaries in suckled beef cows during resumption of postpartum estrous cycles. *J Anim Sci* 1991;69:2548-55.
- [4]. Zollers WG, Garverick HA, Smith MF, Moffatt RJ, Salfen BE, Youngquist RS. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. *J Reprod Fertil* 1993;97:329–37.
- [5]. Murphy MG, Boland MP, Roche JF. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J Reprod Fertil* 1990;90:523-33.
- [6]. Schrick FN, Inskeep EK, Butcher RL. Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. *Biol Reprod* 1993;49:617-21.
- [7]. Breuel KF, Lewis PE, Schrick FN, Lishman AW, Inskeep EK, Butcher RL. Factors affecting fertility in the postpartum cow: Role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol Reprod* 1993;48:655-61.
- [8]. Corah LR, Quealy AP, Dunn TG, Kaltenbach CC. Prepartum and postpartum levels of progesterone and estradiol in beef heifers fed two levels of energy. *J Anim Sci* 1974;39:380-85.

- [9]. Van Den Broeck W, Coryn M, Simoens P, Lauwers H. Cellspecific distribution of oestrogen receptor-alfa in the bovine ovary. *Reprod Domest Anim* 2002;37:291-93a
- [10]. Van Den Broeck W, D'haeseleerl M, Coryn M, Simoens P. Cell specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary. *Reprod Domestic Animal* 2002;37:314-20b.
- [11]. Kimmins S, MacLaren LA. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 2001,22:742-48.
- [12]. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews* 1999;79:263-324.
- [13]. Utt MD, Jousan FD, Beal WE. The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. *J Anim Sci* 2003;81:1562-67.
- [14]. Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook WO, Mapletoft RJ. The use of progestins in regiments for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology* 2002;57:1049-59.
- [15]. Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J Dairy Sci* 2003;86:1876-94.
- [16]. Day ML. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:487-94.
- [17]. Bartolome JA, Silvestre FT, Kamimura S, Arteché ACM, Melendez P, Kelbert D, McHale J, Swift K, Archbald LF, Thatcher WW. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows: i. use of the ovsynch and heatsynch protocols after non-pregnancy diagnosis by ultrasonography. *Theriogenology* 2005;63:1617-27.

- [18]. Mcdougall S, Compton CWR, Hanlon DW, Davidson PJ, Sullivan DJ, Gore AH, Anniss FM. Reproductive performance in anestrous dairy cows following treatment with two protocols and two doses of progesterone. *Theriogenology* 2005;63:1529–48.
- [19]. Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 2001;65:1403-09.
- [20]. Berisha B, Pfaffl M, Schams D. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. *Endocrine* 2002;17:207-14.
- [21]. Eversole-Cire P, Ferguson-Smith AC, Surani MA, Jones PA.. Coordinate regulation of Igf-2 and H19 in cultured cells. *Cell Growth Differ.* 1995; 6:337–345.
- [22]. Neves MM, Marques Jr. AP. Tamanho da amostra para estudo da proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo bovino. *Archives of Veterinary Science* 2002;7:81-85.
- [23]. SAS System for Mixed Models, 1996.
- [24]. Wu WX, Owiny J, Zhang Q, Ma XH, Nathanielzs PW. Regulation of the estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid in the ovariectomized sheep myometrium and endometrium: The role of estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 1996; 55:762-68.

- [25]. Moraes JCF, Jaime CM. Sincrobovi: um pessário para sincronização de cios em bovinos. In: XII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1997, Caxambú. Rev. Bras. Repr. Anim.. Belo Horizonte, 1997. v. 1. p. 99-101.
- [26]. Mann GE. Hormone control of prostaglandin F2a production and oxytocin receptor concentrations in bovine endometrium in explant culture. Domestic Animal Endocrinology 2001;20:217-26.
- [27]. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Physiological Reviews 2000; 80:1-29.
- [28]. O'Shea JD, Rodgers RJ, D'Occhio MJ. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. J Reprod Fertil 1989;85:483-7.

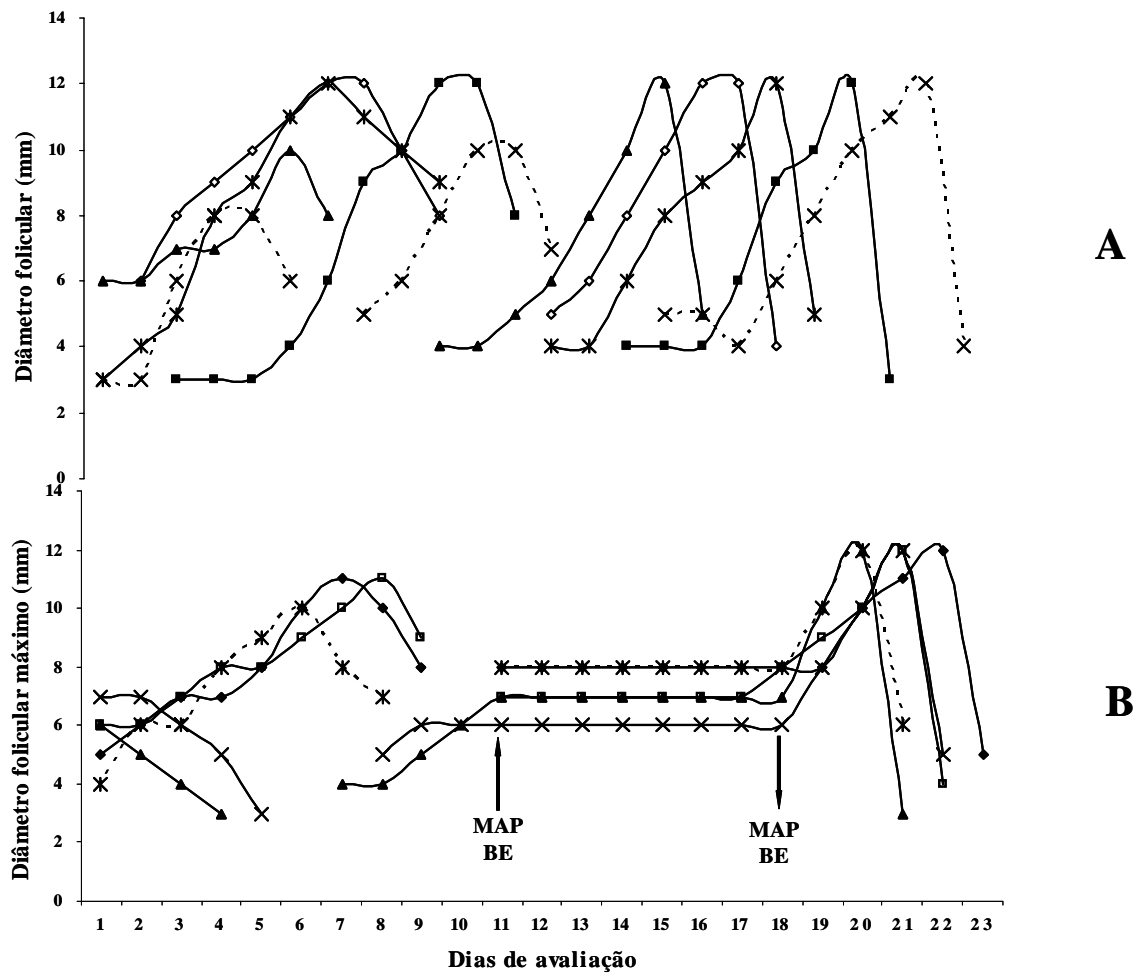


Fig. 1. Padrão de crescimento das ondas foliculares no período de anestro pós-parto. Característica do maior folículo (diâmetro) nos dias de avaliação (30 dias pós-parto até o momento da aplicação do GnRH) nos animais em anestro pós-parto. A) animais do grupo controle (AN), B) animais do grupo pré-exposto ao MAP (AN+MAP).

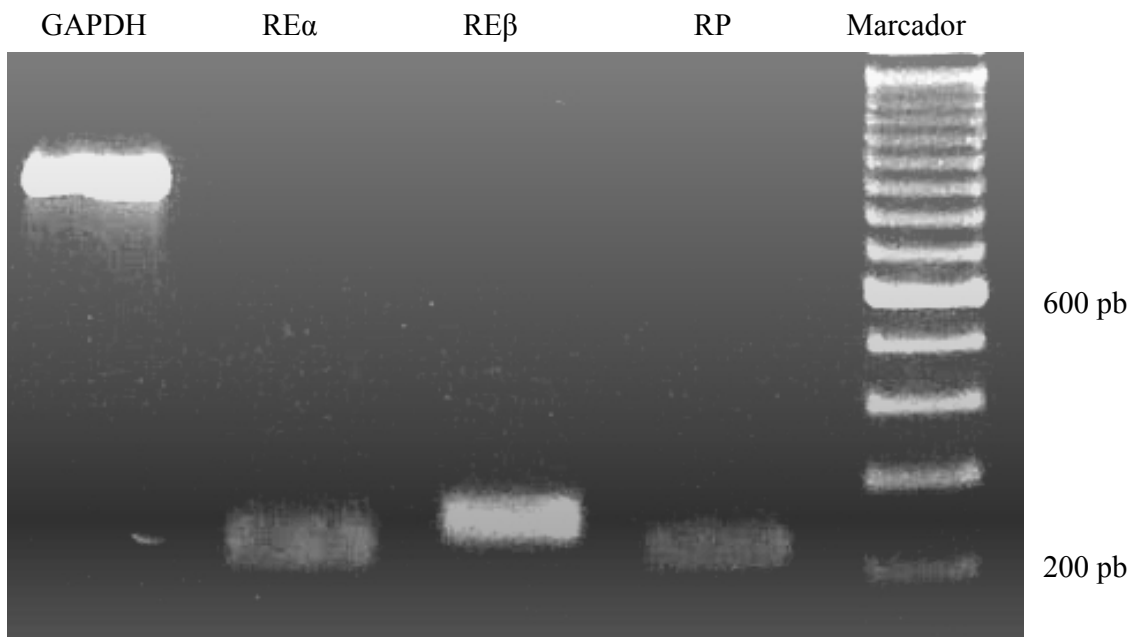


Fig. 2. Amostra representativa de produtos específicos de RT-PCR no CL para GAPDH (847 pb), RE α (234 pb), RE β (262 pb), RP (227 pb) e marcador de peso molecular conhecido (DNA Mass Ladder; Invitrogen).

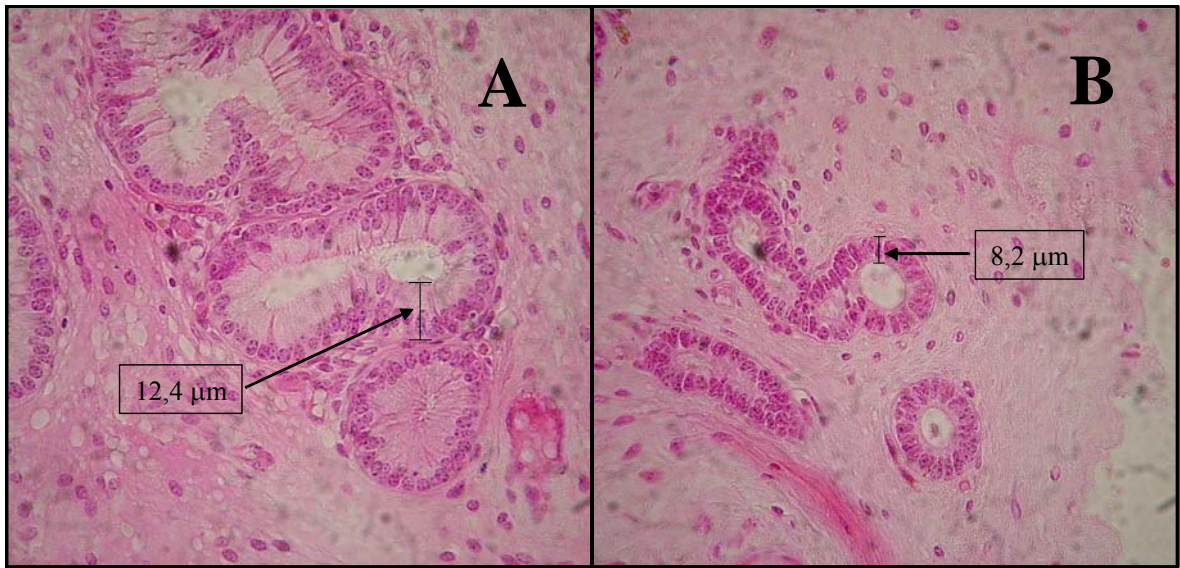


Fig. 3. Glândulas endometriais (altura das células) dos animais dos grupos em anestro submetidos a exposição prévia de gestágeno (AN+MAP; A) ou não (AN; B), ($P < 0,05$).

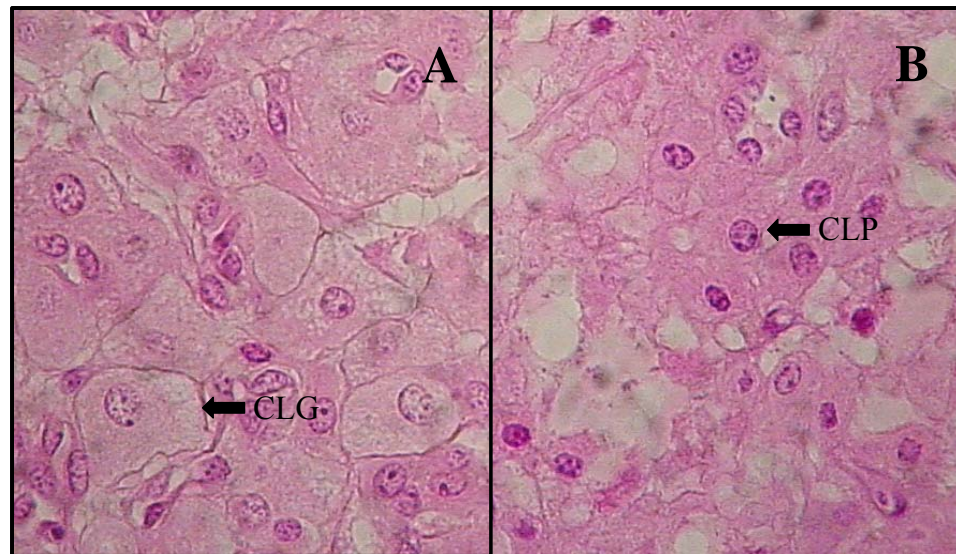


Fig. 4. Células do corpo lúteo dos animais dos grupos em anestro com pré-exposição de gestágeno (AN+MAP; A) ou não (AN; B). Número total de células luteais grandes (CLG) maior no grupo AN+MAP ($P < 0,05$), número de células luteais pequenas (CLP; $P > 0,05$).

Tab. 1. Sequência dos iniciadores utilizados e o tamanho de seu produto (pb).

PRIMER	Seqüência do nucleotídeo	Tamanho do fragmento (pb)
ER α	5'-AGG GAA GCT CCT ATT TGC TCC-3'	234
	5'-CGG TGG ATG TGG TCC TTC TCT-3'	
ER β	5'-GCT TCG TGG AGC TCA GCC TG-3'	262
	5'-AGG ATC ATG GCC TTG ACA CAG A-3'	
PR	5'-GAG AGC TCA TCA AGG CAA TTG G-3'	227
	5'-CAC CAT CCC TGC CAA TAT CTT G-3'	
GAPDH	5'-TGTTCCAGTATGATTCCACCC-3'	847
	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

Tab. 2. Expressão relativa dos genes Receptor de P₄ (RP), Receptor de estrógeno alfa (RE α) e Receptor de estrógeno beta (RE β) no tecido endometrial (Endom) e luteal (CL)

Grupos	RP		RE α		RE β	
	Endom	CL	Endom	CL	Endom	CL
AN+MAP	2,2 \pm 0,3 ^a	0,4 \pm 0,1 ^a	1,6 \pm 0,4 ^a	0,3 \pm 0,1 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,03 ^a
AN	0,9 \pm 0,3 ^b	0,5 \pm 0,2 ^a	1,5 \pm 0,4 ^a	0,4 \pm 0,1 ^a	0,6 \pm 0,4 ^b	0,3 \pm 0,07 ^a

Letras diferentes na mesma coluna P<0,05.

4. CAPÍTULO 2

TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**EFFECT OF EQUINE CHORIONIC GONADOTROPHIN ON
FOLLICULAR DYNAMICS AND OVULATORY CAPACITY
FOR FIXED-TIME INSEMINATION AND ESTRUS
RESYNCHRONIZATION IN POSTPARTUM BEEF COWS**

**Rosane da S Loguercio, Luciano P Loguercio, Cláudio A Pimentel,
Henrique K Löf, João Francisco de Oliveira, Paulo B Gonçalves.**

Theriogenology, 2005

**Effect of equine chorionic gonadotrophin on follicular dynamics and ovulatory capacity
for fixed-time insemination and estrus resynchronization in postpartum beef cows**

Running title: Estrus induction in postpartum beef cows

Rosane da Silveira Loguercio¹, Luciano Pinto Loguercio², Cláudio Alves Pimentel³, Henrique Kurtz Löff¹, João Francisco de Oliveira¹, Paulo Bayard Dias Gonçalves^{1*}

¹Biotechnology and Animal Reproduction Laboratory - Federal University of Santa Maria- RS-Brazil

² Granja 4 Irmãos S&A – RS – Brazil

³Animal Reproduction Laboratory - Federal University of Pelotas – RS – Brazil

*Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves, Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal – BioRep, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. e-mail: bayard@biorep.ufsm.br

Telephone: 55-55-3220-8484 or 55-55-3220-8752 and fax: 55-55-3220-8484

Abstract

The objective of the study was to develop an efficient system of estrus resynchronization and fixed-time artificial insemination (TAI) for postpartum lactating beef cows. In experiment 1, thirty cows were divided into six groups and follicular growth was monitored by ultrasonography. Females received medroxyprogesterone acetate (MPA) for 7 days and estradiol benzoate (EB) on Day 0, followed by eCG and temporary weaning of the calves on

Day 6 (B0E6) or Day 7 (B0E7). Similarly, in treatments B1E6 and B1E7, but EB was injected on Day 1, whereas in treatments B0 (EB on Day 0) and B1 (EB on Day 1) no eCG was administered. All females received GnRH agonist 45 h after device removal. Differences in follicular dynamics were observed between animals of the B0E6 group compared to the other groups ($P=0.0001$). The follicular diameter remained around 8 mm until the application of eCG and reached a mean size of 13 mm. In the other treatments, the maximum mean diameter ranged from 7 to 12 mm. In experiment 2, cows ($n=553$) were divided into the groups: hormonal induction (HI; Day 0= EB and MAP for 7 days, Day 6= eCG, $\text{PGF}_2\alpha$ and temporary weaning; $n=131$), early weaning at 60 days (EW; $n=299$), and natural breeding (NB; $n=123$). No difference in pregnancy rates was observed (85.0%; $P=0.4781$). However, calves of the HI treatment showed a mean 38 kg higher weight gain than that observed for the EW treatment at 7 months of age. In experiment 3, cows ($n=272$) were submitted to HI, using 300, 400 or 500 IU of eCG. No difference in pregnancy rates was observed (78.7%; $P=0.83$). In conclusion, follicular growth compatible with the ovulatory response to GnRH is obtained after the injection of EB on Day 0 and of eCG on Day 6, resulting in pregnancy rates similar to those observed for conventional AI processes.

Key word: postpartum beef cows; follicular dynamics; fixed-time artificial insemination; resynchronization, bovine

Introduction

The postpartum period is one of the critical periods in the fertility of beef cows. Considering a pregnancy period of approximately 280 days and a postpartum period of 60 days without manifestation of estrus, there are only 25 days for a cow to become pregnant and thus to calve

once a year. The presence of the calf, lactation, energetic needs, endocrine conditions and the difficulty in estrus detection are important factors that result in anovulation, artificial insemination (AI) failure and, consequently, increase the calving-conception interval [1-3]. In this respect, pregnancy rates of about 20% are obtained for postpartum lactating cows under the extensive beef cattle raising conditions in Brazil [4,5].

Systems for estrus and ovulation induction have been developed to increase the postpartum pregnancy rate and to reduce the calving-conception interval in beef cattle. In cows in anestrus, the first ovulation generally occurs without manifestation of estrus [1,6,7], oocyte fertility is low [8] and the corpus luteum shows a shorter mean life span of approximately 7 days [9-11]. For these reasons, slow-release progesterone (administered through vaginal devices or subcutaneous implants) is used for 7 or 9 days in most postpartum estrus induction protocols [12-15]. Additionally, estradiol benzoate (EB) is generally injected at the time of progestin application to control the follicular wave and to trigger the luteolytic process if a corpus luteum is present. However, these protocols result in pregnancy rates of about 40-50% [16,17], with wide variations at the time of ovulation and with variable outcomes as a result of feed availability.

Ovulation control for fixed-time artificial insemination (TAI) has been recommended with the use of EB or GnRH 24 hours or 48-56 hours [13,18], respectively, after removal of the progestin-containing vaginal device. The occurrence of estrus is higher than 80% when EB is used, but conception rates are around 30-40% [19]. On the other hand, the follicle acquires its ovulatory capacity in response to GnRH when reaching a diameter of approximately 12 mm [20], with no LH receptors being present on granulosa cells until the follicle reaches a mean

size of 10 mm [21]. Thus, significant variations in the results of ovulation induction are observed with GnRH.

The size of the follicle is also important for the capacity of the oocyte to be fertilized and to develop into an embryo. Oocytes that remain in dominant follicles for more than nine days due to the action of progestins show reduced fertility [8,22]. On the other hand, the capacity of oocytes to be fertilized and to develop into a blastocyst *in vitro* shows a directly proportional increase with follicle size as long as the follicle is not in a process of atresia [23,24]. In addition, cows receiving GnRH and PGF₂ α ovulate smaller follicles and present lower pregnancy rates, findings probably related to the shorter life span of the corpus luteum and the poor quality of the oocyte.

Follicle recruitment and growth until the time of follicular divergence is mediated by the action of FSH [25,26]. Estradiol and inhibin reduce FSH levels and the subordinate follicles initiate the process of atresia. Recently, a reduction in insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) 2, 4 and 5 has been shown to be related to an increase in free IGF-I in the follicle and to follicular dominance [27-29]. Theca and granulosa cells respectively respond to a lower frequency of LH pulses and FSH concentrations during steroidogenesis stimulation when free IGF-I levels are increased [30]. Thus, eCG has been applied at low doses (300-500 IU) to stimulate follicular growth in estrus induction programs, with poorly satisfactory outcomes (30-50%) when administered at the time of removal of the vaginal device [31, 32].

Based on the above considerations, we may conclude that some prerequisites are necessary to obtain fertile and synchronized ovulation in postpartum cows: 1) pre-exposure to progesterone, 2) the follicular diameter should be greater than 12 mm in order to obtain a

response to GnRH, and 3) the oocyte should remain no longer than nine days in the dominant follicle. Taking these three factors into account, we tested the hypothesis that application of eCG one day before removal of the vaginal device yields a follicular diameter compatible with the ovulatory response to GnRH in a 7-day progestin system. The objective of the present study was to develop an estrus induction system which yields pregnancy rates similar to those observed during conventional AI processes, determining the best time of application of EB and eCG that would promote follicular growth compatible with the ovulatory response to GnRH.

Material and Methods

Animals

A total of 855 multiparous lactating 4-year-old cows (50% pure breeds Angus and 50% 1/2 blood Angus with Hereford and Charolais), weighing 380 to 430 kg, with a mean postpartum period of 60 days, were used in three experiments. The cows belonged to a farm in the south of Brazil, located at 32°05' south latitude and 52°11' west longitude and characterized by a subtropical climate and a mean annual temperature of 17.6°C. At the beginning of the experiment, all animals were scored for body condition (BC) on a scale ranging from 1 to 5 (1 = thin, 5 = fat) [33].

At the beginning of the first experiment, the animals (n=30) were submitted to rectal examination and only those in anestrus were selected. The condition of anestrus was determined based on the absence of the corpus luteum and low uterine contractility. The absence of the corpus luteum was confirmed by ultrasonography [34,35].

Experiment 1

The present study was carried out during spring season (October). Follicular dynamics was evaluated by daily ultrasonographic examination starting from the application of the treatments. The diameter of the dominant follicle and of the two largest subordinate follicles was determined over a period of 11 days until the day of expected ovulation. The dominant follicle of the follicular wave was defined as the follicle that reached the largest diameter. Ovulation was determined based on the disappearance of the largest follicle from the ovary upon two exams after application of GnRH (24 and 48 h).

The cows were randomly allocated to six treatments, with each treatment consisting of 5 animals (Fig. 1). The day on which all animals received a vaginal device impregnated with 250 mg medroxyprogesterone acetate (MPA) was defined as Day 0. In treatments B0, B0E6 and B0E7, the animals were treated with EB (5 mg im) at Day 0 plus eCG (Folligon 500 IU im; Intervet) on Day 6 (B0E6), Day 7 (B0E7) or no eCG (B0). All cows had their calves weaned at the time of eCG injection or at the time of device removal. In the other treatments (B1, B1E6 and B1E7), the animals received EB 24 h after the application of the vaginal device, but eCG and weaning were the same as described for the previous treatments. The cows of all treatments received one application of gonadorelin (GnRH agonist; Profertil 100 µg im) 45 h after device removal. The calves returned to the cows 24 h after GnRH injection.

Experiment 2

This study was performed in spring and summer season (November, December, January and February). The animals (n=553) were selected according to BC score (BC=3) and all cows were at 60 (50-70) days postpartum at the time in which they were randomly allocated to three treatments. In the hormonal induction treatment (HI treatment, n=131), the animals

were treated with MPA (250 mg vaginal device) and EB (5 mg im) on Day 0. On Day 6, the cows received eCG (Folligon 500 IU im) and prostaglandinF2 (Lutalyse 5 mg vulvar submucosa), followed by temporary weaning for 96 h with total separation of the calves. After removal of the vaginal device (Day 7), the animals were submitted to AI 12 h after estrus detection. The cows which did not enter estrus within the first 48 h received GnRH and were submitted to TAI 16-18 h later. This estrus induction protocol was designated BioRep. The cows were divided into three lots in such a way that they were on average at 60 (50-70) days postpartum at the time of estrus induction. Pregnancy was diagnosed by ultrasound 27 days after TAI. Thus, only non-pregnant cows from lots 1 and 2 had the opportunity (two opportunities and one opportunity, respectively) of estrus resynchronization within the 77-day reproductive period (Fig. 2).

In the early weaning treatment (EW treatment, n=299), the calves were submitted to definitive weaning at 60 days of age. Estrus detection was performed twice a day and the animals were submitted to AI 12 h after detection for 90 days. The weaned calves remained in the corral, and received concentrated supplement and water supplemented with a probiotic (DRT probiotic) for 10 days. After this period, the calves were transferred to a pasture field containing selected cultivated pasture consisting of white clover (*Trifolium repens*), trefoil (*Lotus sp*) and rye grass (*Lolium multiflorum*). These animals received concentrated supplementation twice a day for 60 days.

In the natural breeding treatment (NB treatment, n=123), the calves were weaned temporarily for 96 h on the corral and the cows remained with 5% of the sires for 90 days.

Experiment 3

The animals were grouped according to BC scores (BC 3: 80.1% or BC 4: 19.9%) and distributed uniformly among treatments. The cows (n=272) were submitted to the same procedure of HI and diagnosis of pregnancy as described in Experiment 2, but received 300 (G300, n=91), 400 (G400, n=85) or 500 (G500, n=96) IU eCG and were not resynchronized.

Statistical analysis

In Experiment 1, the treatments were compared by covariance analysis using the PROC GLM program (SAS) [36]. Initially, the follicular dynamic curves were compared using the contrast statement applying the following statistical model: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j X_{ij} + \varepsilon_{ij}$, where Y_{ij} is the dependent variable, μ is a constant common to all observations, α_i corresponds to the different treatments, β_j is the regression coefficient for the relationship between X and Y, X_{ij} corresponds to the different days of assessment of the follicular wave, and ε_{ij} is the residual effect. In Experiments 2 and 3, estrus and pregnancy rates were analyzed by analyses of variance for categorical data, using the procedure for categorical data modeling in SAS [36]. The treatments were compared by contrast statement.

Results

Experiment 1

Animals of the B0E6 group showed a mean follicular diameter of 8 mm during the first 6 days of treatment. In these animals, an increase in follicular growth was observed after the application of eCG (Day 6), reaching a mean diameter of 13 mm on Day 9 (Fig. 3). Injection

of eCG one day before removal of the vaginal device stimulated follicular growth, resulting in a difference in the follicular growth curve and a larger diameter of the dominant follicle at time of GnRH injection compared to the other treatments ($P=0.0001$). In B0E6 treatment, ovulation was observed in 80% (4/5) of the animals. However, when EB was applied on Day 1 (B1E6; Fig. 4), the mean diameter of the dominant follicle was 9 mm and no ovulation was observed.

The growth pattern of the dominant follicle was not different for the other treatments ($P>0.05$). However, the mean follicular diameter obtained for B0E7 animals was 12 mm on Day 9, reaching an ovulation rate of 40% (2/5) after GnRH injection. A mean follicular diameter smaller than 10 mm was obtained with the other treatments, with no significant growth necessary for an ovulatory response. Considering the animals of these other treatments, only one ovulation was observed. The mean diameters of the second and third largest follicle present in the ovary were not different for all treatments ($P>0.05$).

Experiment 2

The percentage of estrus in the HI treatment was 57.2% considering an observation period of 48 h. The conception rate of cows inseminated after estrus detection was 76.5% and the pregnancy rate of cows submitted to TAI was 47.2% (Tab. 1). The final pregnancy rate obtained with the BioRep system (HI treatment) was 84.7% (111/131), with no difference compared to the EW (85.6%, 256/299) and NB treatments (84.6%, 104/123; $P=0.4781$).

Reproductive rates of reinduction of the three lots of the treatment HI are represented in Tab.

1. Mean total weight gain was 38 kg greater for calves of HI treatment (221 kg) than for calves of EW treatment (183 kg) at 7 months of age.

Experiment 3

The mean pregnancy rate obtained for the treatments using different doses of eCG for HI was 78.7% (214/272; G300 = 76.9%, 70/91; G400 = 80.0%, 68/85; G500 = 79.2%, 76/96; P=0.83). The estrus detection rate over 48 h of observation was 55.9% (152/272) for these treatments. Cows inseminated after estrus detection (from MPA removing to GnRH injection) showed a conception rate of 93.4%. Fixed-time artificial inseminations (after GnRH injection) resulted in a pregnancy rate of 60.8% (Tab. 2). The overall twinning rate was 4.4% (12/272), with rates of 3.3, 3.5 and 6.3% being observed for the G300, G400 and G500 treatments, respectively.

Discussion

The most relevant results obtained in the present study were the determination of the time of application of eCG in relation to removal of the vaginal device and the high pregnancy rate (85%) after resynchronization obtained for lactating beef cows at 60 days postpartum. One important advantage of this system is that AI is performed in three blocks lasting three days each, for a total of six days of estrus detection and nine days of AI within a reproductive season of 77 days. The development of this protocol was possible considering the results of follicular dynamics obtained in the first experiment.

The hypothesis that injection of eCG one day before removal of the vaginal device results in a larger diameter of the dominant follicle and in a greater ovulatory capacity was confirmed for treatment B0E6. The fact that ovulations were observed in most animals only with this treatment confirms the importance of follicular diameter for obtaining ovulation in response

to GnRH [20]. The increase in pregnancy rate as a result of the larger number of ovulating animals justifies the increased animal handling due to the fact that the application of eCG does not coincide with device removal. However, these results were not observed when EB was applied on Day 1. These findings are in contrast to the recommendations regarding the use of EB in the presence of elevated progesterone (P_4) levels [37]. In the present study, the main difference was the use of MPA instead of P_4 , a fact that might explain the variations between studies.

The pregnancy rates at the end of the reproductive season did not differ between the systems used (HI, early weaning or natural breeding), demonstrating adequate conditions of handling, nutrition and sanitation. However, the shorter AI period and the fact that the calf remains standing compared to the early weaning process and the possible increase in genetic improvement resulting from the use of AI compared to natural breeding justify the use of the BioRep system. In addition, the HI system permits a gain in productivity due to the anticipation of pregnancy during the reproductive season, standardization of the birth lots and a higher weight gain of the calves. Most animals become pregnant at 60 days postpartum, permitting a shorter calving-conception interval. Additionally, this protocol permits the anticipation of the next calving during the reproductive season, with a higher probability of recovery and, consequently, repeated breeding. The birth of calves in three homogenous lots also facilitates the control of parturition, management and commercialization of the animals.

The low pregnancy rates of beef cattle observed in Brazil are mainly related to the poor nutritional state of the animals. Body condition at the time of calving, weight gain and energetic balance are the main factors responsible for the return to cyclicity after calving [38, 39]. In Experiment 2, only animals with a BC score of 3 were selected. This is the minimum

score necessary to obtain a satisfactory response to the HI system. Animals under nutritional stress (BC 1 or BC 2) do not respond to the hormonal process of estrus induction [40].

Temporary weaning was carried out for a period of four days and consisted of total separation of the calves, which has been shown to influence the resumption of the estrous cycle [41-44]. The interruption of weaning, together with exogenous hormone treatment, is responsible for the maximization of neuroendocrine and ovarian responses, with the maximum hypothalamic response being obtained when the use of GnRH is preceded by this weaning practice [45]. In addition, weaning together with the HI protocol facilitates handling for estrus identification and AI.

Characteristics resulting from HI such as luteal quality, period of maintenance of the dominant follicle and oocyte viability at the end of treatment should be taken into account when obtaining fertility is the objective in TAI protocols. Generally, the dominant follicle persists without growth or atresia in the presence of subluteal levels resulting from progestins in vaginal devices [46]. On the other hand, oocytes that remain in the follicle for more than nine days result in low fertility [8]. In the BioRep system, the oocytes remained for a maximum of six days without follicular growth. On the sixth day, the animals received eCG and the follicle resumed its development. Using this approach, fertility was maintained and the final pregnancy rate was 84.7%. Considering a single AI, most lots showed a pregnancy rate of 60.0 to 80.0%, a value that is within the range obtained in systems without HI and with estrus detection.

Follicular development in response to eCG injection is dose dependent. High doses of this gonadotrophin induce superovulation [47,48]. Therefore, the effect of the dose on pregnancy

and twin production was determined. In addition, dose reduction decreases the cost of the estrus induction protocol, which might be a limiting factor in the commercial implantation of this system. For European breeds, eCG doses ranging from 300 to 500 IU have been established for estrus induction in the BioRep system. The twinning rate of 4.4% observed here is higher than that commonly observed for beef cows [49], but was independent of the eCG dose used.

In conclusion, eCG injected one day before removal of the vaginal device yielded a follicle size compatible with the ovulatory response to GnRH. Thus, the BioRep system promoted estrus induction and permitted TAI, generating high pregnancy rates within a resynchronization process in postpartum lactating beef cows.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Granja 4 Irmãos S&A for providing the animals. We are also grateful to CNPq for financial support.

References

- [1]. Short RE, Bellows RA, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Custer EE. Physiological mechanisms controlling anestrus and fertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci* 1990;68:799-816.
- [2]. Diskin MG, Mackey DR, Roche FJ, Sreenan JM. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;78:345-70.
- [3]. Yavas Y, Walton JS. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000;54:1-23.

- [4]. Cachapuz JM. A pecuária de corte nos anos 80: O setor primário do Rio Grande do Sul: Diagnóstico e perspectivas sócio-econômicas. *Série Realidade Rural* 1991;3:17-39.
- [5]. IBGE Anuário estatístico de Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 1996.
- [6]. Perry RC, Corah LR, Kiracofe GH, Stevenson JS, Beal WE. Endocrine changes and ultrasonography of ovaries in suckled beef cows during resumption of postpartum estrous cycles. *J Anim Sci* 1991;69:2548-55.
- [7]. Murphy MG, Boland MP, Roche JF. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J Reprod Fertil* 1990;90:523-33.
- [8]. Austin EJ, Mihm M, Ryan MP, Williams DH, Roche JF. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *J Anim Sci* 1999;77:2219-26.
- [9]. Ramirez-Godinez JA, Kiracofe GH, McKee RM, Shalles RR, Kittok RJ. Reducing the incidence of short estrous cycles in beef cows with norgestomet . *Theriogenology* 1981;15:613-23.
- [10]. Schrick FN, Inskeep EK, Butcher RL. Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. *Biol Reprod* 1993;49:617-21.
- [11]. Breuel KF, Lewis PE, Schrick FN, Lishman AW, Inskeep EK, Butcher RL. Factors affecting fertility in the postpartum cow: Role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol Reprod* 1993;48:655-61.
- [12]. Utt MD, Jousan FD, Beal WE. The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. *J Anim Sci* 2003;81:1562-67.

- [13]. Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook WO, Mapletoft RJ. The use of progestins in regiments for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology* 2002;57:1049-59.
- [14]. Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J Dairy Sci* 2003;86:1876-94.
- [15]. Day ML. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:487-94.
- [16]. Mapletoft RJ, Martinez MF, Colazo MG, Kastelic JP. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. *J Anim Sci* 2003;81(E.suppl.2):E28-E36.
- [17]. Ryan DP, Snijders S, Yaakub H, O'Farrell KJ. An evaluation of estrus synchronization programs in reproductive management of dairy herds. *J Anim Sci* 1995;73:3687-95.
- [18]. Pursley Jr, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. *Theriogenology* 1995;44:915-23.
- [19]. Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. The use of GnRH or estradiol to facilitate fixed-time insemination in an MGA-based synchronization regimen in beef cattle. *Anim Reprod Sci* 2002;67(3-4):221-29.
- [20]. Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 2001;65:1403-09.
- [21]. Evans ACO, Fortune JE. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. *Endocrinology* 1997;138:2963-71.

- [22]. Mihm M, Curran N, Hyttel P, Knight PG, Boland MP, Roche JF. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *J Reprod Fertil* 1999;116:293-304.
- [23]. Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Develop* 1992;31:63-67.
- [24]. Lequarre AS, Vigneronb C, Ribaucoura F, Holmc P, Donnaya I, Dalbiès-Tranb R, Callesenc H, Mermillodb P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 2005;63:841-59.
- [25]. Austin EJ, Mihm M, Evans ACO, Ireland JLH, Ireland JJ, Roche JF. Effects of oestradiol and progesterone on secretion of gonadotrophins and health of first wave follicles during the oestrous cycle of beef heifers. *Reproduction* 2002;124:531-41.
- [26]. Wiltbank MC, Fricke PM, Sangsritavong S, Sartori R, Ginther OJ. Symposium: Physiology, Lactation, and Reproduction. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J Anim Sci* 2000;83:2998-3007.
- [27]. Rivera GM, Chandrasekher YA, Evans ACO, Giudice LC, Fortune JE. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. *Biol Reprod* 2001;65:102–11.
- [28]. Rivera GM, Fortune JE. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Biol Reprod* 2001;65:112–18.
- [29]. Rivera GM, Fortune JE. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: Implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* 2003;144(7):2977–87.

- [30]. Roche JF. Control and regulation of folliculogenesis – A symposium in perspective. *Rev Reprod* 1996;1:19–27.
- [31]. Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:479-86.
- [32]. Mialot JP, Constant F, Dezaux P, Grimard B, Deletang F, Ponter AA. Estrus synchronization in beef cows: comparison between GnRH + PGF2 α + GnRH and PRID + PGF2 α + eCG. *Theriogenology* 2003;60:319–30.
- [33]. Lowman BG, Scott NA, Somerville SH. Condition scoring of cattle. *Bull East Scotl Coll Agric* 1976;6:1-31.
- [34]. Bartolome JA, Silvestre FT, Kamimura S, Arteché ACM, Melendez P, Kelbert D, McHale J, Swift K, Archbald LF, Thatcher WW. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows: i: use of the ovsynch and heatsynch protocols after non-pregnancy diagnosis by ultrasonography. *Theriogenology* 2005;63:1617–27.
- [35]. McDougall S, Compton CWR, Hanlon DW, Davidson PJ, Sullivan DJ, Gore AH, Anniss FM. Reproductive performance in anestrous dairy cows following treatment with two protocols and two doses of progesterone. *Theriogenology* 2005;63:1529–48.
- [36]. SAS System for Mixed Models, 1996.
- [37]. Rivera GM, Goñi CG, Chaves MA, Ferrero SB, Bo GA. Ovarian follicular wave synchronization and induction of ovulation in postpartum beef cows. *Theriogenology* 1998;49:1365-75.
- [38]. Santos JEP, Amstalden M. Effects of nutrition on bovine reproduction. *Arq Fac Vet URGs*. 1998;26:19-89.

- [39]. Ferreira AM. Novos conceitos sobre o anestro pós-parto. Cong Bras Reprod Anim Anais. 1995;11:62-70.
- [40]. Bastos GM, Brenner RH, Willke FW, Neves JP, Oliveira JFC, Bragança JFM, Machado SA, Porciúncula PM, Gonçalves PBD. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. Theriogenology 2004; 62:847-53.
- [41]. Williams GL. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. J Anim Sci 1990;68:831-52.
- [42]. Griffith MK, Williams GL. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. Biol Reprod 1996;54:761-68.
- [43]. Williams GL, Griffith MK. Sensory and behavioural control of gonadotrophin secretion during suckling-mediated anovulation in cows. J Reprod Fert 1995;49:463-75.
- [44]. Canto JI, Neves JP, Gonçalves PBD, Moraes JCF, Oliveira JFC. Dinâmica ovariana de vacas charoles submetidas a desmame interrompido aos 35 dias pós-parto. Rev Bras Rep Anim 1997;21:6-7.
- [45]. Troxel TR, Cruz LC, Ott RS, Kesler DJ. Norgestomet and Gonadotropin-Releasing Hormone Enhance Corpus Luteum Function and Fertility of postpartum Suckled Beef Cows. J Anim Sci 1993;71:2579-85.
- [46]. Fortune JE, Rivera GM. Folículo dominante persistente em bovinos: aspectos básicos e aplicados. Arq Fac Vet UFRGS 1999;27:22-34.
- [47]. Elsdon RP, Nelson LD, Seidel JR GE. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. Theriogenology 1978;9:17-26.

- [48]. Anderson GB, Bondurant RH. Multiple ovulation resulting from low level administration of PMSG to cattle at different stages of the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 1982;5:85-91.
- [49]. Komisarek J, Dorynek Z. Genetic aspects of twinning in cattle. *J Appl Genet* 2002;43:55-68.

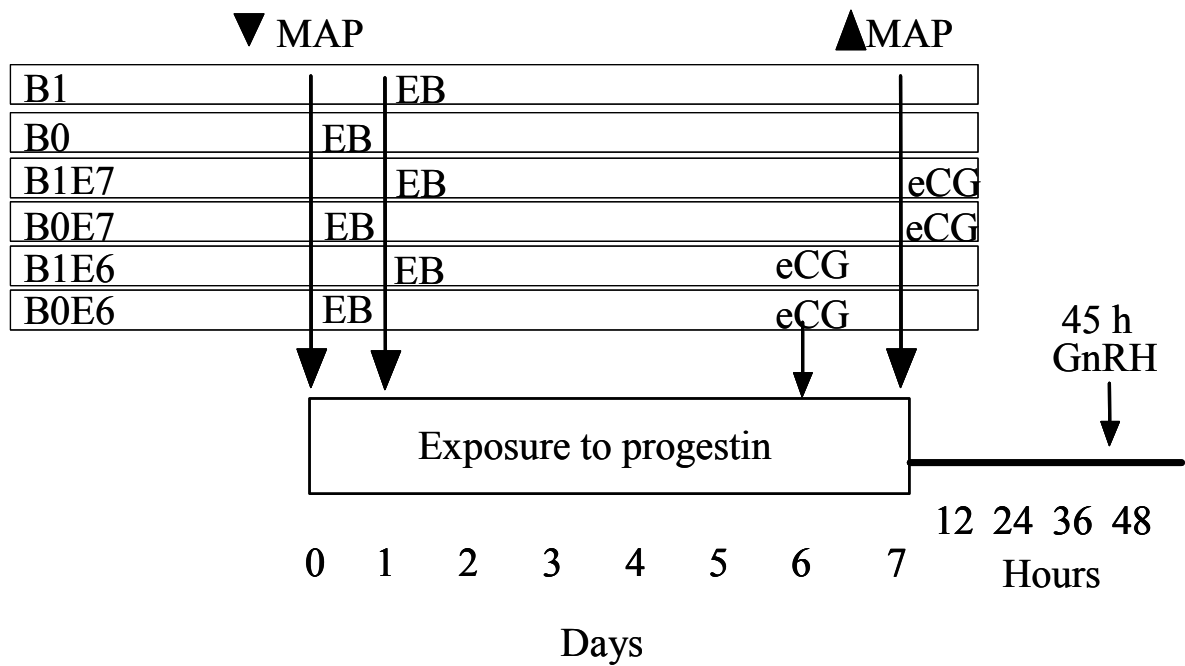
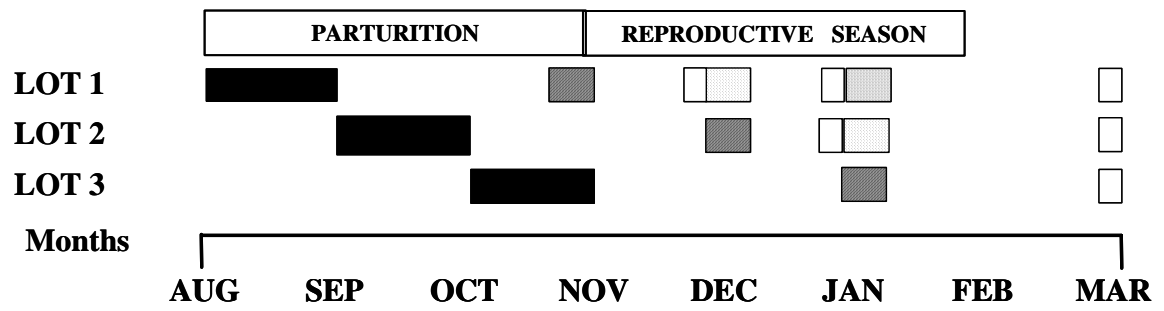


Fig. 1. Times of application of estradiol benzoate (EB) and equine chorionic gonadotrophin (eCG) in an estrus and ovulation induction protocol with medroxyprogesterone acetate (MPA, Experiment 1). Weaning was interrupted at the times of eCG application or removal of the vaginal device.



- Induction 1
- Induction 2
- Induction 3
- Diagnosis of pregnancy

Fig. 2. Distribution of the animals for hormonal induction within the three reinduction lots according to calving data obtained during the reproductive season (Experiment 2).

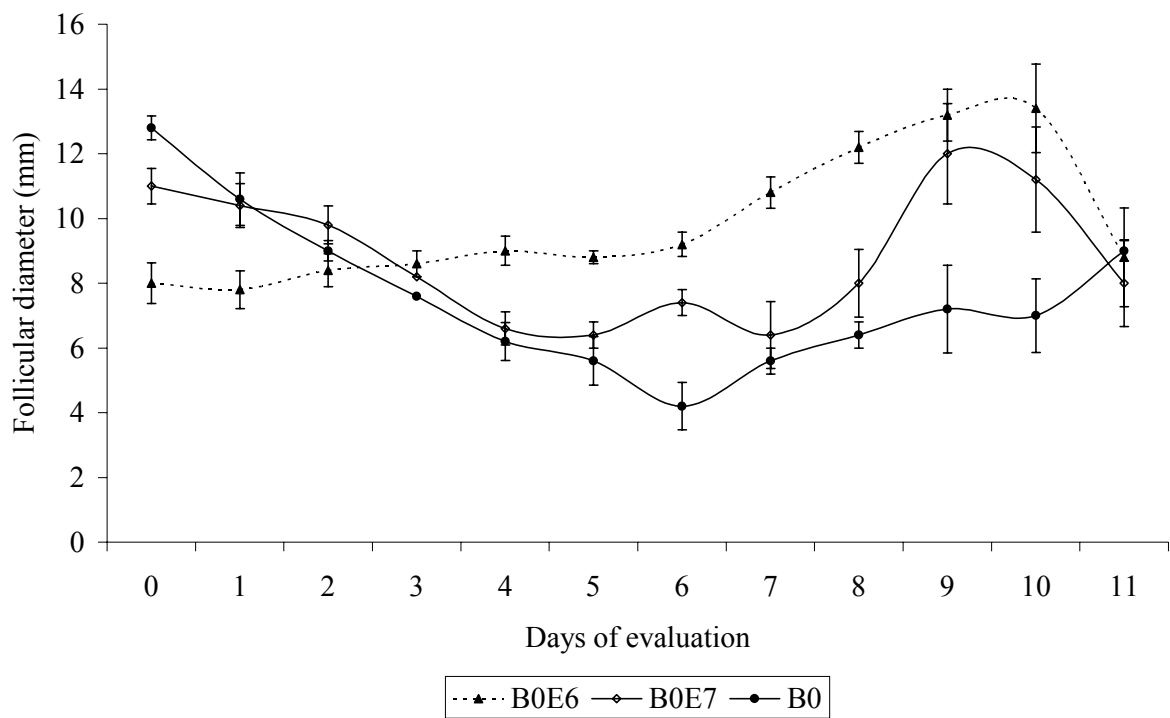


Fig. 3. Mean follicular diameter of the dominant follicle of cows receiving progestin for 7 days and an injection of EB on Day 0 (B0) and of eCG on Day 6 (B0E6) or 7 (B0E7) or no eCG (B0). The B0E6 curve differed from the other curves as shown by covariance analysis ($P=0.0001$).

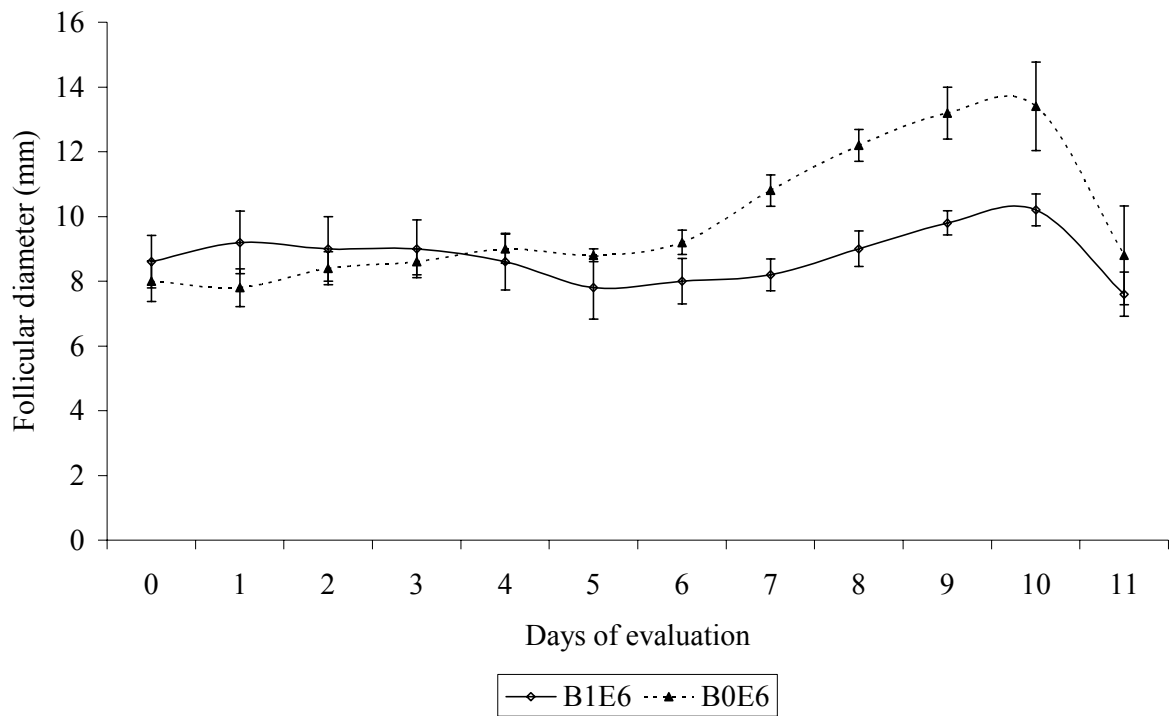


Fig. 4. Mean follicular diameter of the dominant follicle of cows implanted with medroxyprogesterone for 7 days, with EB being applied on Day 0 (B0E6) or Day 1 (B1E6) and eCG on Day 6.

Tab. 1. Pregnancy rates obtained for the different lots of hormonal induction (Experiment 2).

Lots	Reinduction	Estrus	Conception ^a	Pregnancy %	
	n	%	%	TAI	Total
	47	49	91	46	-
Lot 1	15	67	75	40	-
	7	57	75	33	94
Lot 2	35	57	75	53	-
	12	50	66	33	83
Lot 3	49	63	77	78	78
Total	165 ^b	57	77	47	85

Estrus and ovulation were induced on average at 60 (50-70) days postpartum, with intervals of 30 days between lots.

^aPregnant animals number/estrus rates

^bTotal induction process in 131 cows.

Tab. 2. Estrus, conception and pregnancy rates after AI and TAI obtained in the three groups (Experiment 3).

Groups	n	Estrus %	Conception* %	Pregnancy %	
				TAI	Total
G 300	91	52	92	58	77
G 400	85	55	94	62	81
G 500	96	59	93	64	79
Total	272	56	93	61	79

*pregnant animals number/estrus rates

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou aspectos básicos do período de anestro pós-parto, mecanismo de ação e efeitos de gestágenos e estradiol, e suas interações com o eCG, com o objetivo de desenvolver um sistema eficaz de IAETF, que viabilize IA de 100% das vacas amamentando. Os gestágenos e BE provocaram uma modulação na expressão de receptores esteróides no endométrio e CL, inibindo a luteólise prematura do primeiro ciclo estral. Além disso, a adequada associação desses hormônios ao eCG, foi capaz de promover um crescimento folicular compatível com a resposta ovulatória induzida, resultando em alta taxa ovulatória e elevados índices de prenhez (85%) após a IAETF.

A *upregulation* nos RP endometriais provocada pela associação de MAP e BE, deixa evidente a inibição da cascata luteolítica após a primeira ovulação pós-parto. Esse importante resultado pode ser apoiado pelo mecanismo de luteólise proposto por McCRAKEN et al. (1999), sendo a *downregulation* dos RP uterinos, o primeiro fator envolvido no desencadeamento desse processo. Adicionalmente, em condições *in vitro*, a P₄ inibe a secreção de PGF₂α (SCHAMS & BERISHA, 2004), sendo necessária sua adequada secreção e funcionalidade para impedir a liberação da prostaglandina. Ainda, o importante bloqueio nos REβ do endométrio, causado pela pré-exposição aos gestágenos, demonstra fase de diestro (KIMMINS & MACLAREN, 2001), comprovando o mecanismo de proteção a luteólise prematura do primeiro CL pós-parto.

A pré-exposição ao gestágeno foi capaz de suprimir a expressão de REβ endometrial, evidenciando que estes receptores, no endométrio, são regulados pelos níveis circulantes de P₄. Em ovinos, já foi descrito que a expressão de REα é regulada pela circulação de P₄ (WU et al., 1996). Na mesma direção, KIMMINS & MACLAREN (2001) observaram uma menor expressão de receptores de estrógeno na fase de diestro e inibição total destes receptores aos 20 dias de gestação. Ainda, esse bloqueio nos REβ endometriais, deixa evidente a participação do estradiol na cascata da liberação de PGF₂α através dos seus receptores do subtipo β.

A maior expressão de REβ demonstrada no tecido luteal, sem exposição prévia de gestágeno e BE, indica início do processo luteolítico. Essa explicação é baseada nos achados de BERISHA et al., (2002) que, estudando as modificações temporais dos receptores esteróides, encontraram alta expressão do REβ no final do ciclo estral/início da luteólise.

Embora alguns estudos relacionem a expressão de RE α luteal com níveis séricos de P₄ (VAN DEN BROECK et al., 2002a), no presente trabalho, essa regulação não foi encontrada. A expressão dos RE α não foi diferente nos grupos em anestro submetidos ou não ao gestágeno ou nos grupos de animais ciclando. Esses resultados podem ser baseados na constante expressão (*downregulation*) de RE α durante as fases média, tardia e de regressão luteal, parecendo ser regulada independente dos níveis circulantes de P₄ (BERISHA et al., 2002).

Baseado nas conhecidas ações dos gestágenos e estradiol na função reprodutiva, a associação do eCG objetivou um efeito adicional no crescimento folicular, para desenvolvimento de um sistema eficaz de indução do estro/ovulação e IAETF. A avaliação do momento mais adequado para aplicação dessa gonadotrofina no sistema de IAETF foi confirmado pela taxa de ovulação de 80% das vacas que receberam BE no momento da colocação do implante vaginal e eCG um dia antes da sua retirada. Isso demonstra a potencialização na ação do eCG, resultando na obtenção de diâmetro folicular com capacidade ovulatória para responder ao GnRH (SARTORI et al., 2001). Os resultados de dinâmica folicular justificam a adição de um dia de manejo e serviram de base para otimização do sistema BioRep.

O desenvolvimento desse protocolo foi possível a partir dos resultados de dinâmica folicular, adequando a aplicação de cada hormônio com a maximização de sua resposta. A alta taxa de prenhez (85%), obtida com a utilização do sistema BioRep de IAETF, foi similar aos índices reprodutivos alcançados com o uso de outros manejos tradicionais, como a IA convencional e a monta natural. Porém, benefícios evidentes deste sistema, em relação ao uso de touros, são o melhoramento genético e a redução dos custos com a manutenção dos machos. Ainda, a inseminação dos animais em três blocos de três dias cada, totalizando uma estação reprodutiva de 77 dias é a principal vantagem do sistema BioRep em relação a IA convencional. Além de tornar possível a inseminação de vacas amamentando, com apenas seis dias de detecção de estro e três dias de IATF. A permanência dos terneiros ao pé da vaca, resultou em ganho de peso médio superior de 38 kg aos sete meses de idade, comparado aos desmamados precocemente. Outros benefícios da utilização do sistema BioRep são a redução no intervalo parto/concepção, a padronização dos lotes de nascimento de terneiros, facilidade no manejo de acompanhamento das partições e comercialização dos animais, e ainda redução com custos de mão-de-obra.

Embora muitos protocolos utilizem somente a IATF, pela dificuldade de observação de estro em vacas amamentando, as taxas de prenhez não ultrapassam 50% (JORDAN et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002; CAVESTANY, et al., 2003; HIERS et al., 2003; BARUSELI

et al., 2004; BARTOLOME et al., 2005a,b). No sistema BioRep, os elevados índices de prenhez obtidos, justificam a associação do desmame temporário, que, além de maximizar a resposta ovariana e neuroendócrina (TROXEL et al., 1993), viabiliza a observação de estro, pelo afastamento total dos terneiros e IA por um curto período de 48 h.

Os resultados de prenhez ao final da indução evidenciam a formação de um folículo dominante responsivo ao GnRH e oócito fértil. A partir do conhecimento de que níveis subluteais de P₄ causam persistência folicular, resultando em oócitos de baixa fertilidade (FORTUNE & RIVERA, 1999), a permanência do pessário vaginal por 7 dias, parece não influenciar na fertilidade do oócito e na sua capacidade de desenvolvimento embrionário e fetal.

Surpreendentemente, a expressão de receptores esteróides no endométrio de animais ciclando e pré-expostos ao gestágeno foi diferente. Essa observação pode ser atribuída a efeitos na formação luteal e preparação endometrial proporcionada pelo efeito cumulativo da exposição da P₄ nos ciclos estrais normais em relação ao único contato com MAP nos animais em anestro. No entanto, a possibilidade de diferenças entre MAP e P₄ na regulação desses receptores não pode ser descartada. Reforçando essa possibilidade, os resultados do experimento de dinâmica folicular demonstraram que aplicação do BE um dia após a colocação do implante de gestágeno resulta em folículos de menor tamanho no momento da aplicação do GnRH. Apesar de não ter sido avaliado a regressão do folículo dominante, é amplamente conhecido que o BE desencadeia o reinício de uma nova onda folicular quando aplicado em presença de elevados níveis de P₄ (RIVERA et al., 1998). Embora similares índices reprodutivos sejam obtidos com o uso de MAP e P₄, possíveis diferenças regulatórias entre esses gestágenos devem ser consideradas.

A CC mínima de 3 (escala de 1 - 5) é requerida para obtenção de resposta satisfatória com a utilização de IAETF (BASTOS et al., 2004). Embora esta CC seja considerada razoável, somente 30% das vacas amamentando, aos 60 dias pós-parto retornam a sua atividade cíclica (JAUME et al., 2001). Esse fato justifica a escolha dos animais destinados ao processo de indução de estro, com o objetivo de antecipar a prenhez na estação reprodutiva através do desbloqueio neuroendócrino. Outras alternativas, como o desmame precoce, podem ser utilizadas no período pós-parto, após uma extratificação das fêmeas de acordo com a sua CC, para obtenção de melhores resultados ao final da estação reprodutiva.

O eCG é freqüentemente utilizado para superovulação de doadoras em programas de transferência de embriões (ELSDEN, et al. 1978; ANDERSON & BONDURANT, 1982) e em processos de indução de estro no momento da retirada do implante vaginal (MULVEHILL

& SREENAN, 1977; ROCHE, et al., 1992; MIALOT, et al., 1998; BARUSELLI, et al., 2003). No entanto, incremento significativo nos índices de prenhez é obtido com aplicação um dia antes da retirada do pessário vaginal em vacas em anestro pós-parto (MACIEL et al., 2001, BASTOS, et al., 2004). Dessa maneira, o eCG é fundamental nos processos de indução de estro durante o pós-parto em vacas de corte. No entanto, esse hormônio participa de uma percentagem significativa (50%) do custo final do processo e induz a um aumento no índice de prenhez gemelar. Por isso, foi necessária a investigação da dose mínima (300, 400 ou 500 UI) necessária para a indução de estro. Testou-se como dose máxima 500 UI porque é convencionalmente utilizada em sistemas de indução de estro em bovinos (MIALOT et al., 1998).

Além dos conhecidos efeitos da P₄ e BE, na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano e manutenção da gestação, os recentes achados demonstram maior desenvolvimento do epitélio glandular endometrial e número total de células luteais grandes. Dessa maneira, é sugerido um ambiente uterino mais adequado para o desenvolvimento embrionário precoce e manutenção da gestação, pela diferenciação do estroma, estímulo à secreção glandular e quiescência uterina proporcionada pelo gestágeno e ainda, uma adicional produção de P₄ pelo CL mais funcional. Além disso, a maior expressão de RP no endométrio evidencia a sua melhor funcionalidade. Esse conjunto de resultados permitem subsidiar os procedimentos para a alta fertilidade obtida com a implementação do sistema BioRep de IAETF e de outros protocolos que incluem o gestágeno.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho elucidou o envolvimento de MAP e BE na regulação dos receptores para esteróides no endométrio e CL durante o primeiro ciclo estral após o parto em bovinos de corte, elucidando parte do fenômeno de luteólise prematura no pós-parto em bovinos. Além disso, esses esteróides, em um sistema de sete dias de indução de estro e aplicação de eCG no sexto dia, estimulam o crescimento folicular compatível com a resposta ovulatória ao GnRH, permitindo protocolos de reindução que resultam em índices acima de 80% de prenhez aos 60 dias pós-parto em vacas de corte. Baseado nos achados, é proposto que a alta fertilidade obtida com sistemas a base de gestágenos e BE seja resultado da modulação dos receptores esteróides no endométrio, das modificações do epitélio glandular endometrial e da alteração na proporção de células grandes no CL.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- AMSTALDEN, M. et al. Leptin acts at the bovine adenohipophysis to enhance basal and gonadotropin-releasing hormone-mediated release of luteinizing hormone: differential effects are dependent upon nutritional history. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1539-1544, 2003.
- ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H. Multiple ovulation resulting from low level administration of PMSG to cattle at different stages of the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 5, p. 85-91, 1982.
- BARTOLOME J. A. et al. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows III. Administration of GnRH 23 days post AI and ultrasonography for nonpregnancy diagnosis on day 30. **Theriogenology**, v. 63, p. 1643-1658, 2005.
- BARTOLOME, J. A. et al. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows I: use of the Ovsynch and Heatsynch protocols after non-pregnancy diagnosis by ultrasonography. **Theriogenology**, v. 36, p. 1617-1627, 2005.
- BARUSELLI, P. S. et al. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, p. 214, 2003.
- BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-86, 2004.
- BASTOS, G. M. et al. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. **Theriogenology**, v. 62, p.847-853, 2004.
- 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.
- BISHOP, D. K.; WETTEMANN, R. P.; SPICER, L. J. Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 2703-2708, 1994.
- BO, G. A. et al. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17b on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 141-157, 2000.
- BRADEN, T. D. et al. Development of preovulatory follicles expected to form short-lived corpora lutea in beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 97- 104, 1989.

BRAGANÇA, J. F. M. et al. Sincronização de estro e ovulação em novilhas de 12 a 14 meses de idade e inseminadas artificialmente com observação de estro e horário pré-fixado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 73-77, 2004.

BREUEL, K. F. et al. Factors affecting fertility in the postpartum cow: Role of the oocyte and follicle in conception rate. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 655-661, 1993.

BUFORD, W. I. et al. Effect of premature luteal regression on embryo survival in beef cows given exogenous progestágeno. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 123 (supplement 2), 1994.

CANTO, J. I. et al. Dinâmica folicular de vacas Charolesas submetidas a diferentes métodos de desmame interrompido. **Ciência Rural**, v. 28, p. 653-658, 1998.

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.

CAVESTANY, D. et al. Use of medroxyprogesterone acetate (MAP) in lactating Holstein cows within an Ovsynch Protocol: follicular growth and hormonal patterns. **Theriogenology**, v. 59, p. 1787-1798, 2003.

CONNOR, H. C. et al. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, p. 403-411, 1990.

COPELIN, J. P. et al. Effect of active immunization of pre-partum and post-partum cows against prostaglandin F₂ α on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 199-207, 1989.

CORAH, L. R. et al. Prepartum and postpartum levels of progesterone and estradiol in beef heifers fed two levels of energy. **Journal of Animal Science**, v. 39, p. 380-385, 1974.

DAY, M. L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 487-494, 2004.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

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

FERREIRA, A. M. Novos conceitos sobre o anestro pós-parto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995, Belo Horizonte. **Anais XI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, 1995. p. 62-70.

FITZ, T. A. et al. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 703-711, 1982.

- FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M. Folículo dominante persistente em bovinos: aspectos básicos e aplicados. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, p. 22-34, 1999.
- 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.
- GARCIA-WINDER, M. et al. Effects of Norgestomet on follicular development in postpartum beef cows, **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 1099-1109, 1987.
- GARCIA-WINDER, M. et al. Endocrine profiles associated with life span of induced corpora lutea in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 1353-1362, 1986.
- 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.
- 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.
- GRIFFITH, M. K.; WILLIAMS, G. L. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 761-768, 1996.
- GINTHER, O. J; KASTELIC, J. P.; KNOFF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 187-200, 1989.
- HANSEL, W. et al. Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 43 (suppl), p. 77-89, 1991.
- HAYASHI, K. et al. Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 70, p. 339-349, 2003.
- HIERS, E. A. et al. Synchronization of *Bos indicus* x *Bos taurus* cows for timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone plus prostaglandin F2 in combination with melengestrol acetate. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 830-835, 2003.
- HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 457-475, 1998.
- JAROSZEWSKY, J. J.; HANSEL, W. Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span os the bovine corpus luteum. **Proc. Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 224, p. 50-55, 2000.

JAUME, C. M. ; SOUZA, C. J. H. DE ; MORAES, J. C. F. Alguns fatores que afetam a fertilidade de vacas de corte em sistemas extensivos. In: XIV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2001, Belo Horizonte. Revista Brasileira de Reprodução Animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2001. v. 25. p. 122-125.

JORDAN, E.R. et al. Comparison of two timed artificial insemination (TAI) protocols for management of first insemination postpartum. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1002-1008, 2002.

JUENGEL, J. L. et al. Effects of luteotrophic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insulin-like growth factor I and growth hormone receptor in the ovine corpus luteum. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 291-298, 1997.

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.

KIRBY, C. J. et al. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary and oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 996-1002, 1996.

KOELLE, S. et al. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 836-842, 1998.

LAMB, G. C. et al. Effect of dietary energy on milk production and metabolic hormones in thin, primiparous beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2762-2769, 1997.

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.

LUCY, M. C. et al. Placental lactogen and somatotropin: hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 1136-1144, 1994.

MAAS, S. et al. Paracrine actions of oxytocin, prostaglandin F2a, and estradiol within the human corpus luteum. **Journal Clinical Endocrinology Metab**, v. 74, p. 306-312, 1992.

MACIEL, M. N.; et al. Programa hormonal associado ao desmame temporário na indução de ovulação em vacas de corte durante o pós-parto. **Ciência Rural**, v. 31, p. 473-478, 2001.

MAFFEI, M. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature Medicine**, v. 1, p. 1155-1161, 1995.

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.

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.

MARTINEZ, M. F. et al. The use of GnRH or estradiol to facilitate fixed-time insemination in an MGA-based synchronization regimen in beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 221-229, 2002.

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

McDONALD, J. K.; LUMPKIN, M. L.; DePAULO, L.V. Neuropeptide Y suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized rats: Possible site of action. **Endocrinology**, v. 125, p. 186-191, 1989.

McSHANE, T. M. et al. Central actions of neuropeptide Y may provide a neuromodulatory link between nutrition and reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1151-1157, 1992.

MEYER, H. H.; MITTERMEIER, T.; SCHAMS, D. Dynamics of oxytocin, estrogen and progesterin receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 118, p. 96-104, 1988.

MIALOT, J. P. et al. The fertility of autumn calving suckler beef cows is increased by the addition of prostaglandin to progesterone and eCG estrus synchronization treatment. **Theriogenology**, v. 49, p. 1353-1363, 1998.

MORAES, J. C. F.; EGGLETON, C. M. J. Viabilidade de indução hormonal da ovulação 45 dias pós-parto em vacas paridas na primavera. In: XI Congresso de Reprodução Animal, Belo Horizonte, 1995. **Anais XI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, 1995. v. 1. p. 365.

MULVEHILL, P.; SREENAN, J. Improvement of fertility in postpartum beef cows by treatment with PMSG and progestogen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 323-325, 1977.

MURPHY, M. G.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 523-533, 1990.

NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C. Fatores que afetam a eficiência reprodutiva na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 99-105, 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.

NISWENDER, G. D. et al. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 41, p. 101-151, 1985.

OKUDA, K. et al. Estradiol-17 β is produced in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1634-1639, 2001.

PERRY, R. C.; et al. Endocrine changes and ultrasonography of ovaries in suckled beef cows during resumption of postpartum estrous cycles. **Journal Animal Science**, v. 69, p. 2548-2555, 1991.

PIMENTEL, C. A. et al., Effects of early weaning on reproductive efficiency in beef cows. **Theriogenology**, v. 11, p. 421-427, 1979.

PINTO ANDRADE, L. et al. Effects of infusion of GnRH pulses and level of body condition on ovarian function in postpartum beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 40, p. 177-192, 1995.

PITZEL, L. et al. Effects of oxytocin on in vitro steroid release of midstage small and large porcine luteals cells. **Endocrinology**, v. 126, p. 2343-2349, 1990.

PORTELLA JUNIOR, V. V.; MORAES, J. C. F.; JAUME, C. M. Sincronização deaios e inseminação artificial com tempo pré-fixado empregando acetato de medroxi-progesterona. In: XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2002, Gramado, p. 1094.

RAMIREZ-GODINEZ, J. A. et al. Evidence for ovulation and fertilization in beef cows with short estrous cycles. **Theriogenology**, v. 17, p. 409-414, 1982.

RAMIREZ-GODINEZ, J. A. ET AL. Reducing the incidence of short estrous cycles in beef cows with norgestomet. **Theriogenology**, v. 15, p. 613-623, 1981.

RHODES, F. M. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. **Journal Dairy Science**, v. 86, p. 1876-1894, 2003.

RIVERA, G. M. et al. Ovarian follicular wave synchronization and induction of ovulation in postpartum beef cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 1365-1375, 1998.

ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 371-378, 1992.

ROSA, N. A.; REAL, C. M. Desmame interrompido: novo método para aumentar a fertilidade do rebanho bovino. **Arquivo Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 6, p. 63-75, 1978.

- RYAN, D. P. et al. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor-I relationships in suckled beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body condition maintained during the puerperium. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 11, p. 161-174, 1994.
- SANTOS, J. E. P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 26, p. 19-89, 1998.
- SANTOS, I. W.; NEVES, J. P. Diagnostico de gestação na vaca pela ultra-sonografia. **Ciência Rural**, v. 24, p. 365-369, 1994.
- SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1403-1409, 2001.
- SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle-na overview. **Reproduction Domestic Animal**, v. 39, p. 241-251, 2004.
- SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 53-65, 2002.
- SCHRICK, F. N.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, R. L. Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 617-621, 1993.
- SHORT, R. E. et al. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 799-816, 1990.
- SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Sensitivity of bovine corpora lutea to Prostaglandin F2a is dependent on progesterone, oxytocin, and prostaglandins. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1292-1298, 1999.
- SMITH, G. D.; JACKSON, L. M.; FOSTER, D. L. Leptin regulation of reproductive function and fertility. **Theriogenology**, v. 57, p. 73-66, 2002.
- 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.
- TERRA, G. H. et al. Sistemas para indução da ovulação em vacas de corte ganhando e perdendo peso, durante o período pós-parto. In: XV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TE, 2000, Pousada do Rio Quente, Goiás. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. Porto Alegre, RS : UFRGS, 2000. v. 28. p. 269.
- TROXEL, T. R. et al. Norgestomet and Gonadotropin-Releasing Hormone Enhance Corpus Luteum Function and Fertility of postpartum Suckled Beef Cows. **Journal Animal Science**, v. 71, p. 2579-2585, 1993.

UTT, M. D.; JOUSAN, F. D.; BEAL, W. E. The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 1562-1567, 2003.

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

VOGG, G. et al. Utilidade do benzoato de estradiol após a suplementação com gestágeno na sincronização deaios de novilhas de corte. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, p. 41-46, 2004.

WILLIAMS, G. L. et al. The postweaning rise of tonic luteinizing hormone secretion in anestrus cows is not prevented by chronic milking or the physical presence of the calf. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 1079-1084, 1987.

WILLIAMS G. L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal Animal Science**, v. 68, p. 831-852, 1990.

WILLIAMS, G. L. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 339-349, 2002.

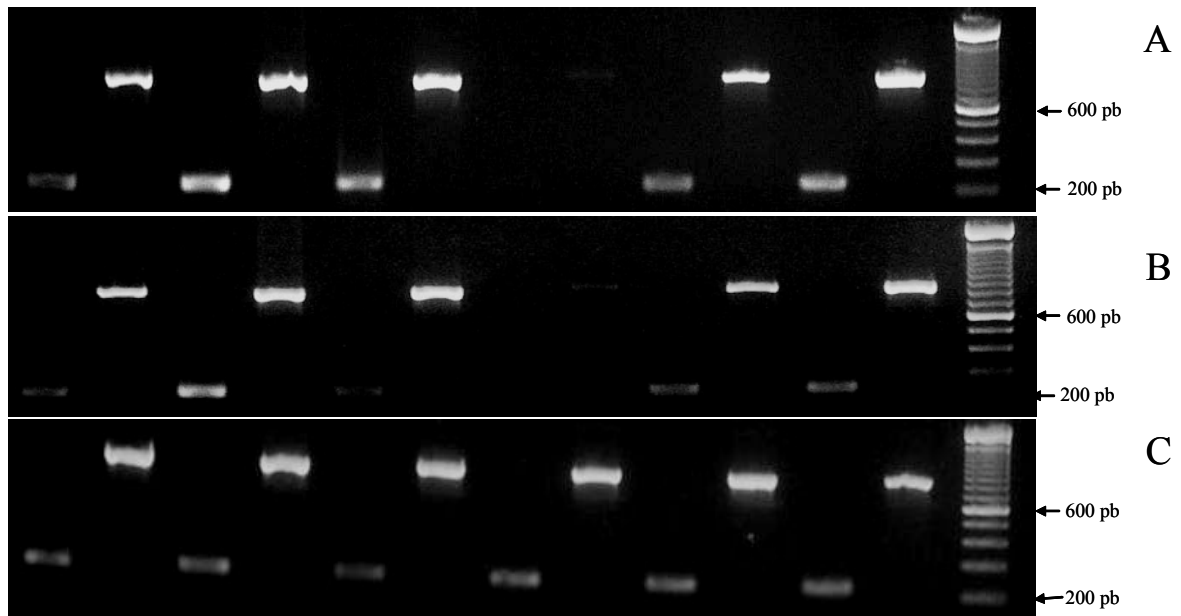
WILLIAMS, G. L.; GRIFFITH, M. K. Sensory and behavioural control of gonadotrophin secretion during suckling-mediated anovulation in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 463-475, 1995.

WILTBANK, M. C.; GTIMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

WU, W. X. et al. Regulation of the Estrogen Receptor and its Messenger Ribonucleic Acid in the Ovariectomized Sheep Myometrium and Endometrium: The Role of Estradiol and Progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 762-768, 1996.

YAVAS, Y. & WALTON, J. S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, p. 1-23, 2000.

ZOLLERS, W. G. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 329-337, 1993.

APÊNDICE A - Avaliação semi-quantitativa dos produtos de RT-PCR

Apêndice A- Produtos específicos de RT-PCR no útero para avaliação semi-quantitativa do A) receptor de estrógeno alfa (234 pb); B) receptor de estrógeno beta (262 pb); C) receptor de progesterona (227 pb). GAPDH (847 pb) e marcador de peso molecular conhecido (DNA Mass Ladder; Invitrogen).