



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Veterinária

Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária

Félix H. D. González

Laboratório de Bioquímica Clínica Animal

**Porto Alegre
2002**

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL DA PUBLICAÇÃO

UFRGS

Copyright 2002 by Félix H. D. González.

Todos os direitos reservados. Não é permitida a reprodução total ou parcial desta publicação sem a autorização escrita e prévia do autor.

Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária

ÍNDICE

- 1. Características dos hormônios**
- 2. Hormônios hipotálamo-hipofisiários**
- 3. Papel dos hormônios no embrião**
- 4. Endocrinologia reprodutiva do macho**
- 5. Endocrinologia reprodutiva da fêmea**
- 6. Endocrinologia da gestação e do parto**
- 7. Endocrinologia do pós-parto e da lactação**
- 8. As prostaglandinas e a reprodução**

I. CARACTERÍSTICAS DOS HORMÔNIOS

I.1. Introdução.

A integração do metabolismo entre os diferentes órgãos dos mamíferos é realizada por dois sistemas: o nervoso e o endócrino. No primeiro, a comunicação opera através de neurotransmissores (tais como noradrenalina, acetilcolina ou serotonina) enquanto que no segundo os mensageiros químicos são chamados de hormônios, os quais são transportados pelo sangue até seu local de ação (órgão-alvo). Estes dois sistemas estão interrelacionados, uma vez que o sistema nervoso pode controlar a função endócrina, por exemplo, a secreção de insulina, prolactina, adrenalina e glicocorticóides está regulada via estímulos neurais. Inversamente, alguns hormônios controlam funções nervosas. Por exemplo, a tiroxina e o cortisol regulam a função de alguns neurônios hipotalâmicos em sistemas de regulação *feedback*.

Alguns mensageiros químicos são comuns para ambos sistemas, como é o caso da adrenalina e da noradrenalina, as quais funcionam como neurotransmissores em algumas sinapses do cérebro e do músculo liso, e também como hormônios reguladores do metabolismo energético no fígado e no músculo esquelético.

Embora os sistemas nervoso e endócrino geralmente são estudados de forma separada, eles de fato atuam de forma integrada no sistema neuro-endócrino quando se trata da regulação do metabolismo. O sistema neuro-endócrino constitui a base do controle dos outros sistemas estando, portanto, estreitamente ligado aos processos metabólicos de nutrição, crescimento e reprodução.

De forma geral, os hormônios são modificadores ou moduladores das reações enzimáticas do metabolismo, embora também participem em outras funções específicas tais como crescimento celular e tissular, regulação do metabolismo, regulação da frequência cardíaca e da pressão sanguínea, função renal, eritropoiese, motilidade do trato gastrointestinal, secreção de enzimas digestivas e de outros hormônios, lactação e atividade do sistema reprodutivo.

As características endócrinas são frequentemente herdadas, ou que poderia levar à utilização dos níveis sanguíneos de determinados hormônios, por exemplo, somatotropina ou hormônios gonadotrópicos e sexuais, como parâmetros de seleção para melhoramento em várias espécies animais.

I.2. História.

O primeiro a descrever fatos relacionados

com a função endócrina foi Aristóteles (ca. 322 a.C.) quem relatou os efeitos da castração nas aves e no homem, constituindo a primeira alusão à atividade hormonal, embora sem compreender o mecanismo. A endocrinologia como ciência tem pouco mais de 100 anos; antes disso, se conheciam os órgãos endócrinos mas ainda não se conheciam as suas funções e nem os mecanismos de controle de sua secreção. Von Haller, em 1766, foi o primeiro que propôs o conceito de “órgão endócrino”, no sentido de um órgão cuja secreção é vertida no sangue, conceito ampliado por Teophile de Bordeu, em 1775, quem propôs que tais secreções eram necessárias para manter a integridade do organismo. Bordeu declarou que os testículos produziam uma substância que se integrava ao organismo, causando-lhe modificações.

A endocrinologia experimental foi iniciada por John Hunter, em 1786, quem realizou transplantes de testículos em aves, dentro da cavidade abdominal para observar possíveis mudanças no desenvolvimento do animal. O conceito sobre secreções endócrinas e exócrinas foi claramente definido por Johannes Müller em 1834, enquanto que Claude Bernard, em 1855, usou o termo de “secreção interna” (por exemplo, a glicose secretada pelo fígado no sangue) para diferenciá-la da “secreção externa” (por exemplo, a bile secretada pelo fígado ao trato gastrointestinal), e propôs pela primeira vez o conceito da “homeostase” de determinados metabólitos. Thomas Addison, também em 1855, descreveu clinicamente a insuficiência adrenal, atribuindo-a à destruição do córtex adrenal, o que foi demonstrado experimentalmente por Brown-Séquard um ano depois. Em 1889, von Mering e Minkowski, descreveram o que posteriormente se chamaria diabetes mellitus, extirpando o pâncreas de um cão. Este experimento levaria posteriormente ao descobrimento da insulina.

No século XX, o conhecimento da endocrinologia começa seus rápidos avanços com Starling e Bayliss, quem descreveram a “secretina”, uma substância produzida na mucosa intestinal que atuava sobre o pâncreas para estimular a secreção de suco pancreático. Hardy, um estudante de línguas clássicas, propôs a Starling o termo *hormônio*, do grego *excitar*, para denominar a substância descrita por eles. Bayliss e Starling propuseram o termo em 1905, definindo-o como aquela substância produzida em um órgão endócrino e transportada no sangue para exercer sua ação em outro órgão. O termo foi inicialmente atacado e foram propostas

substituições que finalmente não tiveram sucesso. Mais tarde, Pende propôs o termo *endocrinologia*, como o área de estudo dos hormônios. O termo *endócrino* vem do grego *endo*: em, dentro, e *krinein*: liberar, ou seja, liberar ou secretar dentro do organismo. O primeiro texto de endocrinologia foi publicado por Sajon, em 1903, seguido por Parhon e Goldstein, em 1909 e por Biedl, em 1910. Hench, em 1949, foi o primeiro em utilizar hormônios terapêuticamente, quando tratou casos de artrite reumatóide com cortisona, hormônio do córtex adrenal. A partir de então foi iniciada a corrida das indústrias farmacêuticas para sintetizar este hormônio e outros glicocorticóides relacionados, os quais têm sido amplamente utilizados por suas aplicações terapêuticas.

Banting e Best, que vinham trabalhando para isolar extratos de insulina desde 1921, deram a base para o isolamento em forma cristalina deste hormônio, por parte de Abel, em 1926. A insulina foi assim o primeiro hormônio a ser isolado em forma pura. Posteriormente, em 1954, seria o primeiro hormônio a ter sua sequência de aminoácidos elucidada, graças aos trabalhos de Sanger. A insulina também foi o primeiro hormônio a ser produzido

industrialmente mediante a tecnologia do DNA recombinante, no início da década de 1980.

I.3. Classificação química dos hormônios.

Atualmente se conhecem mais de 50 hormônios. Na Tabela I-1 se relacionam os principais hormônios com efeito na função reprodutiva. Existem quatro grupos químicos de hormônios: peptídios, esteróides, aminas e eicosanóides. Os vários tipos de hormônios têm diferentes características quanto a sua forma de síntese, armazenagem, meia-vida, forma de transporte no sangue e mecanismo de ação (Tabela I-2).

Os hormônios peptídicos podem ter desde 3 até 200 resíduos de aminoácidos e constituem o grupo de hormônios mais numeroso. Os principais órgãos que produzem hormônios peptídicos são o hipotálamo, a hipófise, as ilhotas pancreáticas, a placenta, a glândula paratireóide e o trato gastrointestinal.

Os hormônios esteróides são produzidos pelo córtex adrenal, as gônadas e a placenta, e incluem os corticosteróides, os estrógenos, os andrógenos e a progesterona. Neste grupo está incluída a forma hormonal da vitamina D (1,25-dihidroxi-colecalciferol). Os hormônios

Tabela I-1. Principais hormônios que agem na função reprodutiva.

Hormônio	Órgão secretor	Órgão alvo	Principal ação
GnRH	hipotálamo	adenohipófise	liberação de LH e FSH
PIF	hipotálamo	adenohipófise	inibe a liberação de PRL
PRF	hipotálamo	adenohipófise	liberação de PRL
Prolactina (PRL)	adenohipófise	glândula mamária	favorece lactação
FSH fêmea	adenohipófise	foliculo ovariano	maturação folicular
FSH macho	adenohipófise	túbulos seminíferos	maturação de espermatozoides
LH fêmea	adenohipófise	ovário	ovulação/manutenção do corpo lúteo
LH macho	adenohipófise	células de Leydig	secreção de andrógenos
Ocitocina	endométrio	miométrio	favorecimento do parto
Ocitocina	endométrio	glândula mamária	favorecimento da descida do leite
Tiroxina	tireóide	todas as células	aumento do metabolismo
Triiodotironina	tireóide	todas as células	aumento do metabolismo
Estrógenos	ovário	órgãos sexuais acessórios	função cíclica / caracteres sexuais
Estrógenos	ovário	glândula mamária	desenvolvimento
Progesterona	ovário	glândula mamária	desenvolvimento mamário
Progesterona	ovário	útero	manutenção da gestação
Relaxina	ovário	sínfise pubiana	relaxamento para o parto
Andrógenos	testículo	órgãos sexuais acessórios	caracteres sexuais secundários
hCG (primatas)	placenta	ovário	similar ao LH
eCG (égua)	placenta	ovário	similar ao FSH
Lactógeno placent.	placenta	glândula mamária	similar ao GH e a prolactina
Prostaglandina F _{2α}	miométrio	corpo lúteo	luteólise

esteroidais são compostos derivados do colesterol, com variações pequenas em suas moléculas que determinam ações biológicas muito diferentes entre si.

Os hormônios do grupo das aminas incluem as catecolaminas, que são produzidas pela medula adrenal e algumas células nervosas, e as iodotironinas, derivadas do aminoácido tirosina, que são produzidas exclusivamente pela tireóide. Os mecanismos de ação dos dois grupos de aminas são diferentes. As catecolaminas compartilham mecanismos de ação similares aos hormônios peptídicos, enquanto que as iodotironinas têm mecanismos similares aos hormônios esteroidais.

Finalmente, os eicosanóides incluem as prostaglandinas, os leucotrienos e os tromboxanos, compostos derivados do ácido araquidônico e produzidos em quase todos os tecidos. Na função reprodutiva são importantes a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a PGE.

I.4. Características da atividade hormonal.

Classicamente são considerados como hormônios aquelas substâncias produzidas pelos órgãos endócrinos, isto é, órgãos cuja secreção é vertida na corrente sanguínea em contraposição à secreção exócrina, cujos produtos vão para o exterior do organismo ou para o trato gastrointestinal. No entanto, atualmente são reconhecidos também como hormônios algumas substâncias secretadas não por órgãos mas por neurônios, como é o caso da vasopressina e da ocitocina, secretadas pelos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo.

Também são considerados como

hormônios algumas substâncias presentes em zonas do cérebro com funções de neurotransmissão, como os hormônios liberadores do hipotálamo (GnRH, TRH, CRH, somatostatina) e alguns hormônios da pituitária (ACTH, β -endorfinas).

Outros hormônios são sintetizados por células disseminadas em determinados tecidos e não por órgãos endócrinos definidos, como os hormônios do trato gastrointestinal (gastrina, secretina, GIP, VIP, CCK) ou as prostaglandinas, produzidas em quase todas as células.

Existem outros hormônios que não são sintetizados nas células, mas produzidos no sangue por ação enzimática, sobre um precursor sintetizado no fígado, como é o caso da angiotensina; ou bem, produzidas em outros órgãos a partir de precursores exógenos, como é o caso da vitamina D_3 .

A secreção hormonal não é necessariamente uniforme, mas pode obedecer a estímulos, estabelecendo ciclos ou ritmos de vários tipos, como são os casos dos ritmos circadiano (cada dia), ultradiano (menos de 1 dia) e circalunar (cada mês).

Outro conceito clássico é que os hormônios devem ser transportadas via sanguínea desde o sítio de produção até o sítio de ação (função telócrina). Entretanto, alguns hormônios não entram na circulação sanguínea, mas vão até a célula-alvo por difusão passiva, como é o caso de algumas prostaglandinas que têm função parácrina. Por outro lado, há substâncias que compartilham algumas características dos hormônios sem ser consideradas como tais. É o caso das somatomedinas, produzidas no fígado por ação do GH, e que vão a outros órgãos via

Tabela I-2. Características de vários tipos de hormônios.

Característica	Esteróides	Tireoidianos	Peptídicos	Aminas
Feedback	sim	sim	sim	sim
Biossíntese	várias enzimas	modificação pós-tradução	modificação pós-tradução	várias enzimas
Armazenamento	horas	semanas	um dia	dias
Secreção	difusão	proteólise	exocitose	exocitose
Proteínas de união (no plasma)	sim	sim	raro	não
Meia-vida	horas	dias	minutos	segundos
Receptores	núcleo	núcleo	membrana plasmática	membrana plasmática
Mecanismo de ação	regula a transcrição	regula a transcrição	segundo mensageiro	segundo mensageiro

sanguínea, para intermediar a ação da somatotropina (hormônio do crescimento).

Os hormônios esteróides e os tireoidianos são transportados pelo sangue mediante proteínas específicas, como a globulina transportadora de tiroxina (TBG), a globulina transportadora de corticóides (CBG ou transcortina) ou a globulina transportadora de hormônios sexuais (SHBG). A união dos hormônios a essas proteínas limita sua difusão através dos tecidos, mas ao mesmo tempo protege os hormônios da degradação enzimática.

Os hormônios que são transportados por proteínas do sangue devem estar em forma livre para poder entrar nas células-alvo, devendo, portanto, haver um equilíbrio entre a forma unida e a forma livre destes hormônios. Este equilíbrio varia em função da espécie. Nas aves, a tiroxina tem uma meia-vida menor do que nos mamíferos, porque a TBG aviar tem menor capacidade de união e a tiroxina é gasta pelo metabolismo com maior rapidez.

O sistema neuro-endócrino possui sensores ou mecanismos que podem detectar os efeitos biológicos dos hormônios, de forma a manter o equilíbrio homeostático dos metabólitos, eletrólitos e fluidos biológicos e a velocidade dos processos metabólicos. Exemplos de regulação *feedback* simples são a secreção do hormônio da paratireóide (PTH) ou da insulina, em resposta aos níveis sanguíneos de Ca^{2+} ou de glicose, respectivamente. Uma diminuição nos níveis plasmáticos de cálcio, induz a secreção de PTH pela paratireóide (*feedback* negativo), enquanto que uma elevação dos níveis de glicose estimula a secreção de insulina nas células B das ilhotas pancreáticas (*feedback* positivo).

Existe uma regulação *feedback* mais complexa, como é a que opera nos hormônios liberados através do eixo hipotálamo-hipofisiário. Estes mecanismos podem ser de “alça longa”, predominantemente negativos, nos quais os hormônios secretados pelos órgãos efetores (esteróides sexuais, glicocorticóides, hormônios tireoidianos) têm efeito negativo sobre a secreção dos hormônios tróficos hipofisiários (LH, FSH, ACTH, TSH) e sobre os hormônios hipotalâmicos (GnRH, CRH, TRH). Também podem ser de “alça curta” e de “alça ultracurta” ou *auto-feedback*, que funcionam a nível do eixo hipotálamo-hipofisiário, de forma mais rápida.

Os fatores hipotalâmicos são secretados obedecendo a uma regulação *feedback* predominantemente negativa. Estes fatores podem exercer um efeito positivo (liberador) ou negativo (inibidor). Existe um caso em que a

regulação pode ser negativa ou positiva, dependendo da fase fisiológica. Trata-se da secreção de LH que ao longo do ciclo estral obedece a uma regulação *feedback* negativa em resposta a baixos níveis de estrógenos e progesterona e que se torna de regulação *feedback* positiva horas antes da ovulação, quando responde a altos níveis de estrógenos.

Também existe controle do sistema nervoso diretamente sobre a secreção de alguns hormônios. Por exemplo, uma fibra pré-ganglionar simpática pode estimular a liberação de adrenalina, depois de um impulso gerado pelo córtex cerebral em resposta a um estímulo visual. Outro exemplo de controle nervoso sobre a secreção endócrina é através da conexão hipotalâmica, como no efeito que a luz causa sobre a atividade reprodutiva de algumas espécies. Assim, na ovelha a atividade reprodutiva aumenta com a diminuição das horas-luz/dia, enquanto que na égua e na galinha a atividade reprodutiva aumenta com o aumento das horas-luz/dia. Nos anteriores casos, a ação da luz opera via hipotálamo para modificar a secreção dos hormônios hipofisiários gonadotrópicos, mediante a melatonina, um hormônio da glândula pineal.

De forma resumida, as funções dos hormônios podem incluir, entre outras, as seguintes:

- (a) regulação do metabolismo dos carboidratos e de outros metabólitos (insulina, glucagon);
- (b) adaptação ao stress (catecolaminas, glicocorticóides);
- (c) regulação do crescimento e da maturação (GH);
- (d) regulação da função reprodutiva (hormônios do eixo hipotálamo-hipofisiário, hormônios gonadais, prostaglandinas);
- (e) regulação do equilíbrio hidro-eletrolítico (ADH, aldosterona);
- (f) controle do metabolismo do cálcio e o fósforo (PTH, calcitonina, vitamina D_3);
- (g) modulação das funções digestivas (secretina, gastrina, CCK, GIP, VIP);
- (h) regulação da taxa metabólica e a calorigênese (hormônios tireoidianos).

I.5. Mecanismos de ação hormonal.

Todos os hormônios atuam através de receptores específicos, os quais estão presentes unicamente nas células alvo, isto é, naquelas células onde o hormônio atua. Os receptores são proteínas que têm sítios de união aos quais se ligam os hormônios com bastante especificidade

e afinidade, provocando mudanças conformacionais que geram o desencadeamento de reações modificadoras do metabolismo da célula alvo. O número de receptores varia em cada tipo de célula, variando portanto o grau da resposta de cada célula à ação hormonal.

A união hormônio-proteína receptora é forte mas não é covalente. É equivalente à união de um efetor alostérico com a enzima que regula. O sítio de união é estereoespecífico e somente une o hormônio correspondente ou moléculas muito similares. As estruturas análogas que se unem ao receptor ocasionando os mesmos efeitos que o hormônio são chamadas de *agonistas*. Em oposição, àquelas estruturas que também se unem ao receptor mas sem causar o efeito hormonal, isto é, bloqueiam o receptor, são chamadas de *antagonistas*.

Existem dois mecanismos básicos da ação hormonal, os quais estão em função do tipo de hormônio:

- (a) os hormônios peptídicos e as catecolaminas não podem penetrar as membranas plasmáticas das células e seus receptores se localizam na membrana plasmática das células alvo; a união do hormônio a seu receptor específico causa uma mudança conformacional na proteína receptora levando à geração de *segundos mensageiros*, os quais regulam uma reação enzimática específica ou modificam a velocidade de transcrição de genes específicos;
- (b) os hormônios esteróides e tireoidianos podem atravessar as membranas plasmáticas e seus receptores se localizam no núcleo; a interação hormônio-receptor nuclear altera diretamente a transcrição de genes específicos.

O mecanismo de ação dos hormônios peptídicos e das catecolaminas, os quais atuam através de segundo mensageiro, é mais rápido que o mecanismo de ação dos hormônios esteróides e tireoidianos, pois os primeiros não necessitam entrar na célula, enquanto que os segundos devem atravessar a membrana plasmática e o citosol até chegar no núcleo. A relativamente lenta ação dos hormônios esteróides (horas ou dias) é uma consequência de seu modo de ação, uma vez que se requer tempo para a síntese de mRNA no núcleo e para a subsequente síntese de proteínas nos ribossomos.

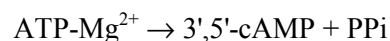
Os *segundos mensageiros*, metabólitos intermediários da ação dos hormônios peptídicos e das catecolaminas, podem ser de vários tipos. Entre os mais importantes estão: o AMP cíclico

(cAMP), o GMP cíclico (cGMP), o cálcio e os derivados do fosfatidil-inositol.

I.5.1. Adenosina-monofosfato cíclico (cAMP) como segundo mensageiro.

Earl Sutherland, em 1972, identificou o adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico) como o mensageiro intracelular produzido em resposta à ação da adrenalina nas células do fígado. Depois se encontrou que o cAMP era o mediador comum da ação de muitos hormônios.

O cAMP é formado pela ativação de uma enzima da membrana plasmática presente em todas as células (exceto nos eritrócitos) como consequência da interação entre um hormônio e seu receptor específico. A enzima que forma cAMP é a adenilciclase, que catalisa a seguinte reação:



A adenilciclase pode ser estimulada ou inibida mediante mecanismos que envolvem complexos regulatórios localizados na membrana. Existem dois sistemas paralelos, um estimulatório (Gs) e outro inibitório (Gi). Os complexos regulatórios são trímeros com subunidades, α , β e γ , que reagem com outro nucleotídeo (GTP) e regulam a atividade da adenilciclase. A proteína estimulatória G (Gs) está localizada do lado citossólico da membrana plasmática, e quando se une ao GTP estimula a produção de cAMP, mediante a ativação da adenilciclase. A proteína Gs é uma entre a grande família de proteínas que se unem a nucleotídeos de guanosina (GTP) e são intermediárias de uma grande variedade de sinais transduccionais (transferência de informação hormonal).

A proteína Gs pode existir em duas formas. Quando a subunidade α está ocupada por GTP, a proteína Gs ativa a adenilciclase. Isto ocorre pela união do hormônio ao receptor específico na membrana plasmática. Quando a subunidade α está unida a GDP, a proteína Gs está inativa. Ocorrendo a união hormônio-receptor, se catalisa a fosforilação de GDP da subunidade α para formar GTP, ativando a proteína Gs. Simultaneamente, as subunidades β e γ da Gs se dissociam da subunidade α . A $\text{Gs}\alpha$ unida a GTP se desloca na membrana desde o receptor até uma molécula de adenilciclase. A adenilciclase é uma proteína integral da membrana plasmática com seu sítio ativo do lado citossólico. Quando a $\text{Gs}\alpha$

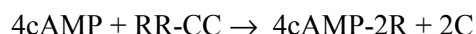
se reassocia com as subunidades β e γ , então a Gs torna a estar disponível para uma nova interação com o complexo hormônio-receptor.

Em resumo, o sinal transducional através da adenilciclase, envolve dois passos sequenciais que amplificam o sinal hormonal original, quais sejam:

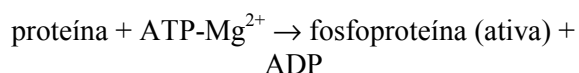
- (a) a molécula de hormônio se une ao receptor e catalisa a ativação de várias moléculas de Gs;
- (b) a molécula de Gs α ativa leva à síntese de muitas moléculas de cAMP, mediante a ativação da adenilciclase.

O mecanismo amplificador desta cascata é importante para conseguir o efeito metabólico dos hormônios, os quais estão normalmente em concentrações muito baixas no sangue.

Dentro da célula, o cAMP se une a uma enzima proteína-quinase dependente de cAMP (proteína-quinase A), proteína composta por duas subunidades regulatórias (RR) e duas subunidades catalíticas (CC). A ação do cAMP é separar o tetrâmero inativo R₂C₂, para produzir duas subunidades catalíticas (2C) ativas:



As unidades catalíticas da proteína-quinase A ativada fosforilam proteínas específicas em grupos hidroxila de resíduos de Thr e Ser, o que pode induzir mudanças em rotas metabólicas específicas:



Outro tipo de proteína-quinases fosforilam em resíduos de Tyr. As proteína-quinases dependentes de cAMP fosforilam uma variedade de enzimas em citoplasma, membranas, mitocôndria, ribossomos e núcleo. A ação das proteína-quinases é reversível pela ação de fosfatases específicas, as quais defosforilam as proteínas inativando-as.

Como as células têm receptores específicos para os diferentes hormônios, o cAMP opera como um metabólito comum para a ação de vários hormônios, ou seja, cada célula tem diferentes proteínas receptoras que reconhecem diferentes hormônios, mas que operam através do cAMP.

O estado de fosforilação ou defosforilação das enzimas afetadas pelas proteína-quinases determina a atividade fisiológica. Por exemplo, a enzima que degrada o glicogênio, a glicogênio-

fosforilase α , é ativa quando está fosforilada, enquanto que a enzima que sintetiza o glicogênio, a glicogênio-sintetase, é ativa quando está defosforilada.

O cAMP tem uma meia-vida curta, sendo degradado no interior das células onde se forma pela ação da enzima fosfodiesterase (PDE), a qual rompe a estrutura cíclica do cAMP produzindo 5'-AMP, metabólito inativo. Existem três tipos de fosfodiesterases: uma regulada por Ca²⁺-calmodulina, outra regulada por hormônios e outra ativada por cGMP. Por outro lado, a fosfodiesterase pode ser inibida por metilxantinas (cafeína, teofilina) as quais, evitam a degradação do cAMP na célula e portanto potencializam a ação dos agentes que atuam através do cAMP.

Alguns hormônios que têm o cAMP como segundo mensageiro incluem: ACTH, LH, FSH, TSH, MSH, hCG, GnRH, TRH, PTH, calcitonina, catecolaminas β -adrenérgicas, glucagon, serotonina e vasopressina.

Existem alguns hormônios que atuam inibindo a enzima adenilciclase, diminuindo portanto os níveis de cAMP dentro da célula e evitando a fosforilação de proteínas específicas. Estes hormônios, quando se unem a seu receptor específico na membrana, ativam uma proteína G inibidora (Gi), a qual é estruturalmente homóloga à proteína G estimulatória (Gs). A proteína Gi atua de forma similar à Gs, unindo-se a GTP para ativar-se, porém tendo o efeito oposto, isto é, ao invés de estimular, inibe a adenilciclase. Entre os hormônios que atuam mediante este mecanismo estão: catecolaminas α -adrenérgicas, insulina, somatostatina, PGE₁, PGE₂, além de outras substâncias, tais como opiáceos e agonistas colinérgicos muscarínicos (acetilcolina).

I.5.2. Guanosina-monofosfato cíclico (cGMP) como segundo mensageiro.

Outro nucleotídeo que atua como segundo mensageiro é o guanosina-monofosfato cíclico (cGMP), especialmente nas células do epitélio intestinal, coração, vasos sanguíneos, cérebro e dutos coletores renais. A ação do cGMP varia conforme o tecido. Assim, no rim e no intestino o cGMP produz mudanças no transporte de íons e na retenção de água, no coração causa diminuição da contração, ao passo que no cérebro está envolvido com o desenvolvimento e a função nervosa.

O cGMP é formado por mecanismos similares ao cAMP, pela ação da enzima guanilciclase:



A enzima guanilciclase pode ser encontrada nas células, na forma de duas isoenzimas, uma no citosol e outra na membrana. Os níveis celulares de cGMP, no entanto, são 5% dos níveis do cAMP e podem ser aumentados pela ação de vários hormônios ou neurotransmissores, como acetilcolina, insulina, somatostatina, angiotensina e prostaglandinas, entre outros. Se postula que o cGMP seria intermediário de efeitos opostos aos do cAMP.

O cGMP, similarmente ao cAMP é hidrolisado por fosfodiesterases específicas. Muitas das ações do cGMP são mediadas por proteína-quinases dependentes de cGMP (proteína-quinases G) amplamente distribuídas nos organismos eucarióticos. A proteína-quinase G contém os domínios regulatório e catalítico no mesmo polipeptídeo (peso molecular 80kD). O domínio catalítico contém sequências homólogas com a subunidade C da proteína-quinase dependente de cAMP (proteína-quinase A) e o domínio regulatório é parecido com a subunidade R da proteína-quinase A. A união do cGMP à proteína-quinase G provoca na enzima uma mudança conformacional, ativando-a para fosforilar resíduos de Ser ou Thr em proteínas diferentes daquelas reguladas pela proteína-quinase A.

1.5.3. Cálcio-calmodulina como segundo mensageiro.

O cálcio em estado ionizado (Ca^{2+}) é um importante regulador de vários processos celulares. Atua na contração muscular, é fator da coagulação sanguínea, participa na atividade de várias enzimas, na excitabilidade das membranas das células nervosas, nos processos de exocitose e também atua em algumas células como segundo mensageiro da ação hormonal.

A concentração de Ca^{2+} extracelular é maior que a intracelular (5 mM vs. 0,1-10 μM , respectivamente). A concentração citosólica de Ca^{2+} é mantida baixa por ação de uma bomba de Ca^{2+} que atua no retículo endoplasmático, a mitocôndria e a membrana plasmática. A entrada de Ca^{2+} na célula é restringida e só acontece por estímulos neuronais ou hormonais.

A ação do Ca^{2+} é regulada pela calmodulina, uma proteína ubíqua de baixo peso molecular (17kD) homóloga à troponina c do músculo. Tem 4 sítios de união ao Ca^{2+} , os quais quando estão ocupados provocam uma mudança conformacional relacionada com a habilidade da

calmodulina para ativar ou inativar enzimas. A união Ca-calmodulina é similar à união cAMP-proteína-quinase. Quando a concentração intracelular de Ca^{2+} aumenta para 1 μM , íons de Ca^{2+} se unem à calmodulina, causando-lhe uma mudança conformacional e ativando-a. Dessa forma, a calmodulina pode associar-se a uma grande variedade de proteínas, as quais sofrem modificação de sua atividade.

1.5.4. Derivados do fosfatidil-inositol como segundos mensageiros.

Na membrana plasmática existe uma enzima hormônio-sensível chamada fosfolipase C, que atua especificamente sobre o lipídio fosfatidilinositol-4,5-difosfato, catalisando sua hidrólise em diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (ITP). Os dois últimos compostos são segundos mensageiros da ação hormonal. Os hormônios que têm este mecanismo de ação, quando se unem a seu receptor, catalisam a troca de um GTP por um GDP na proteína Gp da membrana (uma proteína similar à proteína Gs) ativando-a. A proteína Gp ativa pode estimular a enzima fosfolipase C da membrana, a qual hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-difosfato em ITP e DAG.

A forma de ação destes segundos mensageiros está definida. O ITP estimula a saída de Ca^{2+} dos organelos citoplasmáticos, razão pela qual acredita-se que seria um integrador entre o efeito do hormônio e a mobilização de Ca^{2+} das reservas intracelulares (retículo endoplasmático, mitocôndria) para o citosol. O DAG ativa uma proteína-quinase dependente de Ca-fosfolipídio (proteína-quinase C) a qual fosforila proteínas em resíduos de Ser e Thr, modificando suas atividades. Alguns hormônios que atuam mediados pelo DAG e/ou pelo ITP são: TRH, ACTH, LH, angiotensina II, serotonina e vasopressina.

1.5.5. Outros segundos mensageiros.

Não tem sido identificado ainda com certeza o segundo mensageiro para alguns hormônios. É o caso da insulina, dos fatores de crescimento IGF I e II, da ocitocina e do grupo de hormônios da família da somatotropina (GH, prolactina e somatomamotropina coriônica).

Vários candidatos têm sido propostos para a ação da insulina (cAMP, cGMP, H_2O_2 , Ca^{2+}). Entretanto, é sabido que o receptor da insulina é uma proteína-quinase que se auto-fosforila em resíduos de Tyr contendo duas cadeias α idênticas que sobressaem para o exterior da

membrana plasmática e que atuam como sítio de união à insulina, além de duas cadeias β , do lado citosólico da membrana, que possuem capacidade fosforilante. A proteína-quinase autofosforilada por ação da insulina tem capacidade para fosforilar enzimas ou proteínas dentro da célula que causariam os efeitos intracelulares da insulina, alterando a atividade de uma ou mais enzimas. Os eventos sequenciais posteriores a esta ativação não estão dilucidados completamente.

Em alguns casos, os receptores estão acoplados direta ou indiretamente com canais de íons na membrana plasmática. O melhor exemplo desses casos é o receptor nicotínico para acetilcolina. A acetilcolina é um neurotransmissor e seu receptor está localizado nas células pós-sinápticas de alguns neurônios e na união neuro-muscular. O receptor de acetilcolina é um complexo composto por 4 diferentes cadeias polipeptídicas, com um peso molecular total de 250kD. As cadeias protéicas se organizam na membrana criando um canal hidrofílico através do qual podem passar íons. Quando a acetilcolina é liberada por um estímulo (despolarização) do nervo pré-sináptico, se une a seu receptor da célula pós-sináptica e o canal do receptor se abre permitindo a passagem de íons Na^+ e K^+ .

1.5.6. As proteína-quinases como intermediários da ação hormonal.

Um comum denominador nos sinais transducionais da ação hormonal, seja através de adenilciclase, guanilciclase, cálcio/calmodulina, fosfolipase C, receptor tirosina-quinase ou canais iônicos, é a regulação sobre a atividade de uma proteína-quinase. O número de proteína-quinases descobertas tem aumentado muito desde que as primeiras foram mencionadas por Edwin Krebs e Edmond Fischer, em 1959. Existem centenas de proteína-quinases, cada uma com seu ativador específico e sua própria proteína substrato.

A adição de grupos fosfato a resíduos de Ser, Thr ou Tyr, introduz grupos carregados eletricamente em uma região moderadamente polar. Quando a modificação ocorre em uma região crítica para a estrutura tridimensional da proteína, é de esperar-se que ocorram modificações dramáticas em sua conformação e portanto em sua atividade catalítica. Como resultado da evolução, os resíduos de Ser, Thr ou Tyr suscetíveis de serem fosforilados estão localizados em “sequências consenso” da proteína, isto é, sequências repetidas que são

reconhecidas pela proteína-quinase específica.

Para poder funcionar como um mecanismo regulatório efetivo, a fosforilação causada pelas proteína-quinases deve ser reversível, de modo a permitir o retorno ao nível anterior à estimulação hormonal, quando o sinal hormonal termine. As enzimas que exercem a função de reversão do processo (defosforilação) são as fosfoproteína-fosfatases, das quais existem também centenas e cuja função é hidrolisar ésteres específicos de fosfoserina, fosfotreonina ou fosfotirosina em proteínas específicas. Em alguns casos, as fosfoproteína-fosfatases são reguladas por um segundo mensageiro ou por um sinal extracelular. A complexidade e sutileza dos mecanismos regulatórios atingidos pela evolução são inimagináveis e o desafio da ciência é dilucidar todos esses mecanismos.

1.5.7. Ação hormonal mediada por receptores nucleares.

Alguns hormônios com pesos moleculares cerca de 300, como os esteróides, os hormônios tireoidianos e o metabólito da vitamina D_3 (1,25-dihidroxi-colecalciferol), atuam através de receptores nucleares. Esses hormônios, cuja molécula é lipofílica, atravessam a membrana plasmática por difusão simples e entram no citosol alcançando diretamente o núcleo. O complexo hormônio-receptor ativado se une a regiões específicas do DNA para ativar ou inativar genes. A ação hormonal afeta seletivamente a transcrição e a produção do mRNA respectivo.

Foi identificado um elemento sensível a hormônio (HRE) na região regulatória do DNA, perto do elemento promotor, que possivelmente regula, por estimulação ou inibição, a frequência da iniciação da transcrição de forma similar aos genes facilitadores (*enhancers*). As sequências de DNA dos HREs aos quais se une o complexo hormônio-receptor, são similares em comprimento porém diferentes em sequência para os vários hormônios esteroidais. Para cada receptor existiria uma sequência consenso na qual se uniria o complexo hormônio-receptor. Cada sequência consenso de HRE consiste de 2 sequências de 6 nucleotídeos, que podem estar vizinhas entre si ou separadas por 3 nucleotídeos.

A habilidade de um hormônio para alterar a expressão de um gene em uma determinada célula, depende da sequência exata de HRE e sua posição relativa no gene, bem como da quantidade de HREs associados com o gene. Além de sua união ao DNA e ao hormônio, os

receptores nucleares têm domínios que interatuam com elementos da transcrição, que afetam a velocidade com que se produz a ação hormonal.

Os receptores dos hormônios esteróides e tireoidianos mostram seqüências de aminoácidos conservadas. Por exemplo, existe uma seqüência de 66-68 resíduos muito similar em todos os receptores, que serve para sua união ao DNA. Estas proteínas compartilham uma estrutura conhecida como região de “dedo de zinco”, a qual contém 8 resíduos de Cys que permitem a união de 2 íons de Zn^{2+} , que ajudam a estabilizar a união da proteína ao DNA. A região do receptor que se une ao hormônio está localizada sempre no extremo carboxila e varia entre os diferentes hormônios. O receptor dos glicocorticóides é 30% homólogo com o receptor de estrógeno e somente 17% homólogo com o receptor de tiroxina. O receptor da vitamina D tem unicamente 25 resíduos de aminoácidos, enquanto que o receptor dos mineralocorticóides tem 603 resíduos. Uma mutação do receptor na seqüência de união ao hormônio, afeta a atividade do receptor e a ação do hormônio.

Existem compostos sintéticos com capacidade de união a receptores hormonais. É o caso do esteróide conhecido como RU486, que tem capacidade de unir-se a receptores de progesterona, bloqueando sua atividade (efeito antagonista). Essa droga pode ser usada para a terminação da gestação no estágio inicial.

1.6. Métodos de medição da concentração dos hormônios.

Os hormônios estão normalmente em concentrações muito baixas no sangue, da ordem de micromolar ($\mu M = 10^{-6} M$) a picomolar ($pM = 10^{-12} M$). Isto contrasta com outros metabólitos, como a glicose, cujas concentrações no sangue são da ordem de milimolar ($mM = 10^{-3} M$). Por esta razão, a medição, identificação e isolamento dos hormônios foi uma tarefa difícil por muitos anos, até o aparecimento da técnica da radioimunoanálise (RIA). Esta técnica, desenvolvida por Yallow e Berson em 1960, é altamente sensível para determinar quantidades mínimas de muitos hormônios de forma bastante específica.

Os componentes do RIA incluem:

- (a) o antígeno, essencialmente idêntico à substância a medir, marcado com um radioisótopo; geralmente se usa ^3H , ^{125}I , ^{32}P , ^{57}Co ou ^{14}C ;
- (b) o antígeno não marcado, isto é, a substância a

ser dosada, em quantidades conhecidas para servir de curva de calibração;

- (c) o anticorpo específico contra o antígeno a medir, adicionado em uma concentração limitada de tal forma que permita a adequada competência entre os dois antígenos (marcado e não marcado);
- (d) um método de separação das fases unida (antígeno unido ao anticorpo) e livre (antígeno não unido ao anticorpo).

A radiatividade resultante do ensaio pode ser determinada em um contador da radiação específica que emite o isótopo (beta ou gama).

A análise imuno-radiométrica (IRMA) é outra técnica usada para dosar hormônios, similar ao radioimunoensaio, com a diferença que a marcação isotópica se realiza no anticorpo ao invés do antígeno. O antígeno não marcado se liga a um material inerte (por exemplo, celulose) para que reaja com os anticorpos marcados. O IRMA possui grande sensibilidade e precisão. O isótopo usado com maior frequência é o ^{125}I .

Uma técnica posteriormente desenvolvida como uma variação do RIA é a enzimoimunoanálise (ELISA), que dispensa a utilização de radioisótopos, os quais implicam certo risco à saúde e demandam a utilização de aparelhos de alto custo. O ELISA utiliza em seu lugar enzimas como marcadores. Os primeiros trabalhos que mencionam a marcação de antígenos ou anticorpos com enzimas foram os de Nakore e Pierce, em 1966, quem a usaram para localizar antígenos virais em tecidos. Na década de 1970, foram introduzidos ensaios imunoenzimáticos para medir hormônios com sensibilidade similar à RIA. No ELISA, os compostos marcados podem ser tanto os antígenos quanto os anticorpos. A marcação na molécula consiste na união de uma enzima cujo produto de reação seja determinável fotométrica ou fluorometricamente. Existem vários tipos de ELISA mas em todos eles os componentes do ensaio devem estar imobilizados num suporte (imunoadsorventes).

Outro tipo de marcadores desenvolvidos a fim de evitar o uso de substâncias radiativas são as substâncias quimioluminescentes ou fluorescentes, utilizadas na técnica de fluorimunoanálise (FIA). Exemplos de substâncias fluoróforas são o európio, elemento classificado como lantânido (terras raras) e o isotiocianato de fluoresceína. Os princípios da reação do FIA são similares às imunoanálises, com a diferença de que no FIA o marcador, que está ligado ao anticorpo, é uma substância

fluorescente, ou seja, têm a propriedade de absorver luz a determinado comprimento de onda e emitir luz a um comprimento de onda maior. Cada substância fluorescente tem um espectro de absorção e um espectro de emissão. A leitura do sinal deve realizar-se em um fluorômetro. O FIA tem alta sensibilidade potencial, mas pode diminuir pelo efeito opacador (efeito *quenching*) da água. Para evitar isto, são adicionadas soluções formadoras de micelas que protegem o composto a ser lido. Um dos fluorensaios mais usado é o desenvolvido pelo laboratório Pharmacia, que utiliza o európio (Delfia).

I.7. Referências bibliográficas.

- Berridge, M.J. 1985. The molecular basis of communication within the cell. *Sci. Am.* 253 (oct), 124-134.
- Berridge, M.J. & Irvine, R.F. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.
- Brent, G.A., Moore, D.D. & Larsen, P.R. 1991. Thyroid hormone regulation of gene expression. *Annu. Rev. Physiol.* 53, 17-36.
- Crapo, L. 1985. *Hormones: The messengers of life*. W.H. Freeman & Co. New York.
- Gass, G.H. & Kaplan, H.M. 1982. *CRC Handbook of Endocrinology*. CRC Press Inc. Boca Raton.
- Gilman, A.H. 1989. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *JAMA* 262, 1819-1825.
- Gorbman, A. et al. 1983. *Comparative Endocrinology*. John Wiley and sons. New York.
- Hadley, E. 1984. *Endocrinology*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs.
- Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 266, 15555-15558.
- Krebs, E.G. 1989. Role of the cyclic AMP-dependent protein kinase in signal transduction. *JAMA* 262, 1815-1818.
- Linder, M.E. & Gilman, A.G. 1992. G proteins. *Sci. Am.* 267 (jul), 56-65.
- McDonald, L.E. & Pineda, M.H. 1991. *Endocrinologia Veterinaria y Reproducción*. 4ª edn. Interamericana/McGraw-Hill. México.
- O'Malley, B.W., Tsai, S.E., Bagchi, M., Weigel, N.L., Schrader, W.T. & Tsai, M.J. 1991. Molecular mechanism of action of a steroid hormone receptor. *Recent Prog. Horm. Res.* 47, 1-26.
- Rasmussen, H. 1989. The cycling of calcium as an intracellular messenger. *Sci. Am.* 261 (oct), 66-73.
- Snyder, S.H. 1985. The molecular basis of communication between cells. *Sci. Am.* 253 (oct): 114-123.
- Snyder, S.H. & Bredt, D.S. 1992. Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.* 266 (may), 68-77.
- Sutherland, E.W. 1972. Studies on the mechanisms of hormone action. *Science* 177, 401-408.
- Wilson, J.D. & Foster, D.W. (eds.) 1992. *Williams' Textbook of Endocrinology*. 8th edn. W.B. Saunders Co. Philadelphia.

II. HORMÔNIOS HIPOTÁLAMO-HIPOFISIÁRIOS

II.1. História.

Galeno descreveu anatomicamente a hipófise, atribuindo-lhe funções de secreção de muco e mencionando-a como “fonte de um dos 4 humores”. Vesalius, grande crítico de Galeno, que viveu 14 séculos depois, ainda concordava com esse conceito e a chamou *glans cerebri pituitam excipiens*, donde deriva o termo pituitária. Soemmering em 1778, propõe o termo hipófise. Em 1838, Rathke descreve a anatomia e a embriologia da hipófise sendo complementado por Hannover, em 1843, quem descreveu os tipos de células (cromóforas, acidófilas e basófilas).

As primeiras hipofisectomias foram feitas por Hursley em 1886, seguido por Caselli em 1900 e por Aschner em 1909, mas foi Paulesco, em 1908, quem assinala que a extirpação do lóbulo anterior da hipófise é mortal, mas não a do lóbulo posterior. O conhecimento da função da hipófise foi iniciado em 1909 por Delille quem assinalou que extratos hipofisiários causavam hipertrofia adrenal. Evans e Lang, em 1921, administrando extratos de lóbulo anterior hipofisiário, observaram aumento do crescimento em ratos, o que levou à conclusão da presença de um hormônio do crescimento nesta glândula.

Zondik e Aschheim, em 1926, induziram a puberdade em ratas imaturas mediante transplantes de lóbulo anterior hipofisiário e propuseram a existência de dois hormônios, aos que chamaram de prolân A e prolân B, e que foram posteriormente rebatizados como hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) respectivamente, pelo grupo de Fervola em 1930.

Vários autores mostraram a relação entre a hipófise e a tireóide: Uhlenhuth e Schwartzbach, em 1928, viram que a atrofia tireóidea causada por hipofisectomia era revertida com extratos hipofisiários. Leeb e Basset, um ano depois, assinalaram que a injeção de tais extratos de forma repetida causava mudanças histológicas compatíveis com o hipotireoidismo.

O grupo de Riddle em 1932 isolou da hipófise um hormônio lactogênico que foi chamado de prolactina e, no mesmo ano, Zondek e Krohn identificaram a MSH, a qual chamaram de intermedina. O último hormônio da adenohipófise a ser descoberto foi o ACTH por parte de Collip, em 1933.

A finais dos anos 1930s foi estabelecida a função integradora da hipófise sobre várias funções endócrinas e a proposta de uma regulação bidirecional. Em 1935, uma comissão internacional unificou a nomenclatura para todos

os hormônios hipofisiários.

O lóbulo posterior da hipófise foi motivo de estudo depois de sua identificação feita por Santorini, em 1824. Luscka, em 1860 reconheceu sua natureza nervosa e a chamou neurohipófise e Ramón y Cajal, em 1894, estabeleceu suas conexões com o hipotálamo. Oliver e Schafer, em 1895, observaram uma ação vasopressora dos extratos de hipófise. Três anos depois, esta ação foi localizada na hipófise posterior por Howell. Em 1901, Magnus e Schafer descreveram o efeito antidiurético da neurohipófise. Dale, em 1909, demonstrou sua ação oxitócica e Ott e Scott, em 1910, sua ação lactogênica. O grupo de Kamm em 1928, conseguiu separar duas frações da neurohipófise, uma com atividade vasopressora e antidiurética e outra com ação ocitócica. Bargmann e Scharrer, em 1951, formularam a hipótese de que os hormônios da neurohipófise eram de origem hipotalâmica e que eles eram transportados via nervosa até a neurohipófise. Lederis, em 1962, descreveu os sítios de síntese dos hormônios da neurohipófise como sendo o núcleo paraventricular para a ocitocina e o núcleo supraóptico para a vasopressina.

Em meados do século XX, considerando todos os achados anteriores e a relação sanguínea portal existente entre o hipotálamo e a hipófise, foi proposto por Popa e Fielding o papel regulador do hipotálamo no controle hormonal. Mais tarde, começaria a identificação dos fatores hipotalâmicos que regulam a ação hipofisiária.

II.2. Hipotálamo.

O eixo hipotálamo-hipofisiário é a unidade funcional de integração dos sistemas nervoso central e endócrino, que regula importantes funções metabólicas, tais como crescimento, lactação, reprodução e equilíbrio hídrico. O hipotálamo é uma parte especializada do sistema nervoso central (SNC) que se encontra situado na base do cérebro, acima e atrás do quiasma óptico, enquanto que a hipófise ou pituitária está localizada diretamente abaixo do hipotálamo. Os elementos celulares hipotalâmicos que regulam a secreção da hipófise anterior não estão localizados em uma região específica; no entanto, os núcleos nervosos mais importantes do hipotálamo foram identificados como o supraóptico e o paraventricular.

Os hormônios secretados pelas células nervosas do hipotálamo são conhecidos como transdutores neuro-endócrinos, pois transformam os impulsos nervosos em sinais hormonais. Em resposta às mensagens do SNC, o hipotálamo

produz hormônios regulatórios que passam para a hipófise anterior, seu órgão-alvo primário. Alguns hormônios hipotalâmicos estimulam a pituitária anterior, enquanto que outros são inibitórios. Depois de estimulada, a hipófise anterior secreta hormônios que vão via sanguínea para outro grupo de órgãos endócrinos (órgãos-alvo secundários) os quais incluem o córtex adrenal, a glândula tireóide, as gônadas e as ilhotas do pâncreas. Estas glândulas, por sua vez, ao serem estimuladas pelos hormônios hipofisiários, secretam hormônios que vão pelo sangue até seus respectivos órgãos-alvo finais.

Os hormônios liberadores ou inibidores se armazenam em terminais nervosos na eminência média do hipotálamo, onde suas concentrações são 10 a 100 vezes maiores do que em outros lugares do hipotálamo. O sistema portal hipotálamo-hipofisiário não é compartimentado e todos os hormônios hipotalâmicos chegam a todos os tipos de células da hipófise. A especificidade da resposta, porém, não se obtém por segregação anatômica, mas pela presença de receptores específicos nas células da adenohipófise.

Em contraste com outras zonas do cérebro, a barreira hemato-encefálica na área da eminência média é incompleta, permitindo a passagem de peptídeos e proteínas, bem como de outras moléculas com carga elétrica, desde os espaços intercapilares até os terminais nervosos, os quais respondem a estímulos tanto humorais como neuronais secretando hormônios liberadores ou inibidores no sistema portal.

Os hormônios hipotalâmicos relacionados com a reprodução incluem o GnRH, os fatores liberador (PRF) e inibidor (PIF) da prolactina e o TRH.

II.2.1. Hormônio Liberador de Gonadotropinas (GnRH, LHRH).

O GnRH foi isolado e caracterizado em 1971 por Schally e Guillemin. Inicialmente se pensou que o GnRH estimulava tão somente a secreção do LH, mas posteriormente foi esclarecido que uma única substância decapeptídica estimula a secreção tanto do FSH quanto do LH. A sequência de aminoácidos do GnRH foi elucidada por Matsuo em 1971:

p-

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

O GnRH tem dois tipos de secreção, uma tônica e outra cíclica. A secreção é estimulada

pela noradrenalina e inibida pela dopamina e pelas vias serotoninérgicas. O mecanismo de ação do GnRH sobre as células gonadotrópicas da hipófise parece ser através de cAMP e de cálcio. O cAMP causa um aumento do nível de Ca²⁺ intracelular, o qual provoca a contração de microfilamentos direcionando os grânulos que contêm o hormônio para a periferia da célula e liberando-o no sistema portal hipotálamo-hipofisiário. Este mecanismo de ação opera para todos os hormônios liberadores hipotalâmicos.

A secreção dos hormônios liberadores hipotalâmicos é modulada pelos níveis dos hormônios secretados nos órgãos-alvo primários e secundários. No caso do GnRH, o controle da secreção é feito pelas próprias gonadotropinas hipofisiárias (LH, FSH) e pela progesterona e o estradiol (na fêmea) e a testosterona (no macho). A inibina, um hormônio glicoprotéico secretado pelo ovário e o testículo, inibe especificamente a secreção de FSH.

Existem agonistas sintéticos do GnRH, que são utilizados com fins terapêuticos na prática veterinária. Um deles, a buserelina, é 17 vezes mais potente que o GnRH natural devido a sua menor taxa de degradação e, portanto, maior meia-vida. Outro agonista do GnRH, o fertirelin, é obtido por substituição de aminoácidos nas posições 3, 6 e 9.

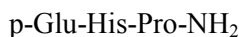
II.2.2. Fatores Liberador e Inibidor de Prolactina (PRF e PIF).

Os fatores PRF e PIF controlam a biossíntese e a secreção da prolactina. O efeito inibitório parece prevalecer durante o estado basal através do PIF. A secreção de prolactina também é estimulada por neurotensina, substância P, histamina, serotonina e agentes α -adrenérgicos. A TRH tem sido pesquisada como o fator liberador (PRF) devido a que estimula a secreção de prolactina. Os estrógenos também estimulam a secreção de prolactina por inibir o fator inibidor (PIF) o qual foi identificado como a dopamina, uma amina biogênica que atua como neurotransmissor. A dopamina, que constitui o único fator hipotalâmico não peptídico, parece atuar impedindo a mobilização de Ca²⁺ ao interior da célula lactotrópica secretora da prolactina na adenohipófise. A amamentação parece inibir a secreção da dopamina e, portanto, aumenta os níveis de prolactina. A prolactina, por sua vez, provoca a liberação de dopamina da eminência média, conformando uma regulação

feedback negativa.

II.2.3. Hormônio Liberador de Tireotropina (TRH).

O TRH é um tripeptídeo, sendo o menor hormônio peptídico que se conhece e tendo a seguinte sequência:



O TRH estimula a liberação de tireotropina (TSH), somatotropina (GH) e prolactina (PRL) na hipófise e sua secreção é controlada pelos hormônios tireoidianos (T_3 e T_4) e pela TSH. Seu mecanismo de ação é através do cAMP.

II.3. Hipófise.

A hipófise ou pituitária é uma estrutura altamente complexa formada por grupos celulares que sintetizam diferentes tipos de hormônios. Se considera dividida em três porções:

- adenohipófise ou hipófise anterior, com grupos de células diferenciadas pela reação que têm com corantes histoquímicos dependentes de pH em células acidófilas, basófilas e cromóforas;
- neurohipófise ou hipófise posterior, a qual difere embriológica, histológica e funcionalmente da adenohipófise; e
- lóbulo intermediário.

A neurohipófise (*pars nervosa*) é originada do infundíbulo do cérebro e é mantida unida a este pelo caule neural. A adenohipófise (*pars distalis*) é originada do teto da boca primitiva a partir de uma invaginação chamada duto crânio-faríngeo ou bolsa de Rathke. O lóbulo intermediário (*pars intermedia*) é originado a partir da bolsa de Rathke, perto do ponto de fusão com a neurohipófise, isto é, separa a *pars nervosa* da *pars distalis*. Em anfíbios e répteis, a *pars intermedia* é importante nas mudanças de cor de pele que ocorrem como adaptação ao meio, através do hormônio MSH. Nos mamíferos sua função está relacionada com a regulação nervosa, através de substâncias opióides. A *pars intermedia* não está desenvolvida no humano e nem nas aves.

II.3.1. Adenohipófise.

Os hormônios da adenohipófise podem ser divididos em três grupos:

- hormônios derivados da pro-opiomelanocortina (POMC) produzidos pelas células cromóforas que incluem:

corticotropina (ACTH), α e β -lipotropinas (LPH), α , β e γ -endorfinas (END), Met-enkefalina e Leu-enkefalina, melanotropina (MSH) e CLIP (peptídeo do lóbulo intermediário similar à corticotropina);

- hormônios glicoprotéicos produzidos pelas células basófilas que incluem: hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio tireotrópico (TSH);

- hormônios promotores do crescimento e lactogênicos produzidos pelas células acidófilas, representados pela somatotropina ou hormônio do crescimento (GH) e pela prolactina (PRL).

Os dois últimos grupos estão relacionados diretamente com a reprodução.

II.3.1.1. Hormônios glicoprotéicos.

Este grupo de hormônios hipofisiários compreendem as gonadotropinas (FSH/LH) e a tireotropina (TSH). Os hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) são glicoproteínas que possuem duas cadeias polipeptídicas chamadas subunidades α e β , as quais estão unidas por ligações não covalentes. A sequência de aminoácidos das subunidades α de LH, FSH e TSH, é igual em todas as espécies (92 aminoácidos) podendo existir diferenças no conteúdo de carboidratos, ao passo que as subunidades β diferem para cada espécie, sendo a fração responsável pelas características biológicas e imunológicas do hormônio.

As subunidades α e β livres não são biologicamente ativas; tão somente os dímeros α - β são ativos. A cadeia β tem entre 115 a 147 aminoácidos, dependendo da gonadotropina e da espécie.

As placentas da égua e da mulher sintetizam gonadotropinas com características similares às gonadotropinas hipofisiárias. Estas gonadotropinas placentárias são a gonadotropina coriônica equina (eCG), antigamente chamada de gonadotropina de soro de égua prenhe (PMSG) e a gonadotropina coriônica humana (hCG). Esses hormônios atuam sobre as células gonadais da fêmea gestante estimulando a biossíntese dos hormônios esteroidais. As cadeias α de hCG e eCG são maiores em número de aminoácidos quando comparadas com as gonadotropinas hipofisiárias. Também possuem maior conteúdo de carboidratos, o que lhes confere meia-vida mais prolongada (Tabela II-1).

II.3.1.1.1. Gonadotropinas hipofisiárias (LH/FSH).

Cada subunidade protéica das gonadotropinas possui duas cadeias de oligossacarídeos unidos por ligações N-glicosídicas, sendo as unidades monossacarídicas mais comuns manose, glicosamina, fucose e ácido siálico. Este último é o responsável pela meia-vida do hormônio devido a que antes da degradação do hormônio, deve ocorrer a remoção dos resíduos de ácido siálico. Assim, quanto maior é a proporção de ácido siálico na molécula, maior é a meia-vida do hormônio (Tabela II-1).

A secreção das gonadotropinas hipofisiárias está sob controle do GnRH hipotalâmico, obedecendo a uma modulação *feedback* negativa por parte dos esteróides gonadais (estrógeno e progesterona na fêmea, testosterona no macho). A secreção basal das gonadotropinas é pulsátil sendo interrompida por um pico massivo de LH durante o estro, no caso dos mamíferos que têm ovulação espontânea. Esse pico de LH é disparado por um pico de GnRH hipotalâmico, o qual, por sua vez, é causado por um aumento na liberação de 17β -estradiol durante o proestro (*feedback* positivo).

Os agentes opiáceos exógenos causam diminuição, tanto da frequência quanto da altura, dos picos de secreção de LH. Este fato pode ter importância quando se relaciona o stress, e a consequente secreção de opióides endógenos com inibição da função reprodutiva.

No macho, o *feedback* negativo da testosterona sobre o LH, depende de sua aromatização a estradiol no cérebro. A inibina, hormônio glicoprotéico secretado pelas células de Sertoli do testículo e as células da granulosa do ovário, causa inibição específica sobre a secreção de FSH da hipófise.

O FSH na fêmea é responsável pelo

crescimento e a maturação dos folículos ováricos e no macho participa, junto com a testosterona, do estímulo para a espermatogênese. O LH tem como função induzir a ovulação e manter o corpo lúteo, além de estimular, junto com o FSH, a secreção de esteróides, tanto no ovário (estrógenos antes da ovulação e progesterona no corpo lúteo) quanto no testículo (testosterona nas células de Leydig).

II.3.1.1.2. Tireotropina (TSH).

A tireotropina (TSH) é secretada pelas células tireotrópicas da hipófise anterior e, similarmente às gonadotropinas, tem duas subunidades protéicas, α e β , unidas por várias pontes dissulfeto intercatenárias e contendo oligossacarídeos em sua molécula. O peso molecular médio do TSH é de 30.000 existindo considerável variação da cadeia β entre as espécies. A secreção do TSH é estimulada por TRH, estrógenos, progesterona, frio e stress e é inibida por somatostatina, dopamina, glicocorticóides e hormônios tireoidianos. A secreção de TSH é modulada pelos hormônios tireoidianos em um *feedback* negativo.

O TSH atua sobre as células foliculares tireodianas afetando múltiplas vias metabólicas, como a glicólise, a via das pentoses-fosfato, o ciclo de Krebs, a síntese de fosfoglicerídeos e esfingolipídios, a síntese de mRNA e proteínas, a síntese de prostaglandinas, a captação de aminoácidos e o consumo de oxigênio. A atividade tireodiana, portanto, afeta praticamente todos os sistemas orgânicos, em especial o sistema reprodutivo.

O TSH não tem efeito sobre as células para-foliculares da tireóide e portanto não regula a secreção da calcitonina, hormônio produzido por estas células, cuja secreção é regulada pelos níveis sanguíneos de cálcio.

Funcionalmente, o TSH incrementa a atividade secretora e biossintética das células foliculares da tireóide, estimulando 3 processos: (a) a captação de iodeto pela glândula, (b) a produção e liberação de T_3 e de T_4 , e (c) a proteólise da tiroglobulina. O TSH estimula a produção de cAMP para que atue como segundo mensageiro. Por outro lado, o Ca^{2+} intracelular pode modular o efeito biológico do TSH via fosfatidil-inositol.

II.3.1.2. Hormônios somato-lactotrópicos.

Este grupo de hormônios está representado pela somatotropina (hormônio do crescimento) e

Tabela II-1. Conteúdo de carboidratos e meia-vida das gonadotropinas.

Hormônio	peso molec.	glicídios (%)	ácido siálico (%)	meia-vida (h)
LH	28.500	16	1-2	0,5
FSH	34.000	30	5	2
hCG	36.700	32	8,5	11
eCG	68.000	48	10,4	26

a prolactina. Este último hormônio tem maior interesse do ponto de vista reprodutivo.

II.3.1.2.1. Prolactina.

A prolactina (PRL) ou hormônio lactogênico é sintetizado nas células mamotrópicas da adenohipófise. É o maior hormônio peptídico que existe (199 aminoácidos, peso molecular 23,3kD) considerando uma cadeia só. Existe grande variabilidade das PRLs entre as distintas espécies. A meia-vida da PRL é de 15 minutos. Sua secreção é pulsátil sendo controlada inibitoriamente por ação da dopamina e estimulada pelas endorfinas pois estas inibem a secreção de dopamina. A secreção de PRL também está favorecida por PRF, TRH, estrógenos, progesterona e por estímulos neurogênicos como a sucção do mamilo pelo lactente, a ordenha ou por sensações de calor, dor e stress. Os estrógenos, especialmente o 17 β -estradiol, aumentam a secreção de PRL por modular os receptores de TRH, hormônio que estimula a secreção de PRL na hipófise. A secreção de PRL pode ser inibida por derivados do ergot como a bromocriptina, um agonista da dopamina. A PRL pode também regular sua própria secreção atuando diretamente sobre o hipotálamo (*feedback* de alça curta sobre o TRH).

A PRL é secretada com flutuações durante os diferentes estados do ciclo reprodutivo (Tabela II-2). Aumentos de PRL ocorrem durante a ovulação e também durante a fase luteal do ciclo ovárico na cadela e na vaca, mas não na gata. Também ocorre aumento de PRL durante a lactação e no parto. A prolactina faz parte do complexo mamotrófico que promove o crescimento da glândula mamária, junto com GH,

estradiol, progesterona, glicocorticóides e hormônios tireoidianos. Também faz parte do complexo lactogênico que mantém a lactação, junto com os anteriores hormônios, exceto progesterona e adicionando insulina.

A PRL tem efeito luteotrópico na ovelha, mas não na vaca. Em vários animais, a PRL parece ter um efeito inibitório sobre a secreção das gonadotropinas hipofisiárias, pelo qual tem sido sugerido que a PRL seria um hormônio anti-gonadotrópico, uma vez que estimula a biossíntese de dopamina, a qual tem efeito negativo sobre a secreção de GnRH.

A PRL tem sido responsabilizada pela ação inibitória da amamentação sobre o início da atividade ovárica durante o pós-parto em vacas de corte. Por outro lado, tem sido utilizada bromocriptina, agente agonista da dopamina, com a idéia de desbloquear o suposto efeito da PRL sobre a ciclicidade ovárica em vacas. Foi encontrado que a bromocriptina causa diminuição dos níveis de PRL, porém sem ocorrer redução do intervalo do parto ao primeiro cio pós-parto e nem aumento nos níveis de LH. Os indícios levam a aceitar que é o efeito do estímulo neural do amamentamento como tal e não a maior quantidade de PRL secretada, o responsável pela supressão da secreção de gonadotropinas durante o pós-parto de vacas de corte.

É possível que a PRL interfira com a atividade reprodutiva diretamente em nível do ovário em algumas espécies. Na cadela, a PRL parece influir na manutenção dos longos intervalos interestros. Quando cadelas foram tratadas com bromocriptina, ocorreu um considerável encurtamento do período interestral. Em algumas espécies, a PRL induz comportamento maternal, tal como construção de ninhos ou atitudes de preparação para o parto. Em algumas aves, a PRL estimula a proliferação e a descamação do epitélio do papo, produzindo uma secreção chamada “leite do papo” com importantes características nutritivas para os filhotes. Nas aves tem sido observada também uma alta secreção de PRL durante o período da incubação.

A placenta de algumas espécies não carnívoras produz um hormônio protéico com atividade similar à PRL e à GH, chamado lactógeno placentário (PL) ou somatomamotropina. O PL tem propriedades químicas, biológicas e imunológicas muito similares com a PRL mas os fatores que regulam sua síntese e secreção são muito diferentes daqueles da PRL.

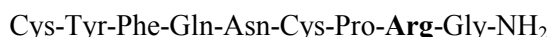
Tabela II-2. Níveis sanguíneos de prolactina em várias espécies.

Espécie	Valor (ng/ml)
Cadela (anestro)	9,1 $\pm$ 1,2
Cadela (2ª sem. de lactação)	86 $\pm$ 19
Cadela (pré-parto)	117 $\pm$ 24
Cadela (ovariectomizada)	7,9-11,5
Gata (início de gestação)	7,0 $\pm$ 0,3
Gata (fim de gestação)	43,5 $\pm$ 4,5
Vaca (fase luteal)	23,3 $\pm$ 4,8
Vaca (fase folicular)	15,8 $\pm$ 2,7
Porca (2ª sem. de lactação)	9,1-26,1
Porca (pós-desmame)	1,4-1,9

II.3.2. Neurohipófise.

A neurohipófise possui terminações axônicas de neurônios hipotalâmicos que armazenam dois hormônios: a arginina-vasopressina (AVP) ou hormônio antidiurético (ADH) e a ocitocina (OXT). Os neurônios produtores desses hormônios no hipotálamo têm abundante retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi, além de grânulos secretores, os quais se localizam no corpo do neurônio e nos axônios que se estendem à neurohipófise. Os neurônios secretores se encontram em núcleos específicos do hipotálamo. O núcleo supraóptico se relaciona com a síntese de AVP e o núcleo paraventricular com a síntese de OXT. Os hormônios, dentro dos grânulos, estão unidos a uma proteína transportadora chamada neurofisina e são secretados à circulação desta forma. Existe uma grande similaridade entre as neurofisinas de bovino, suíno e equino. A meia-vida da AVP é de poucos minutos quando está livre mas sua união à neurofisina a mantém por mais tempo.

A ocitocina e a vasopressina são nonapeptídeos que têm em comum 7 aminoácidos. Nos vertebrados não mamíferos é produzido um hormônio único na neurohipófise chamado de vasotocina, que é considerado o peptídeo neurohipofisiário mais primitivo. Na maioria dos mamíferos a vasopressina contém arginina na posição 8, o que explica o nome de arginina-vasopressina (AVP):



Do ponto de vista reprodutivo o hormônio neurohipofisiário de interesse é a ocitocina.

II.3.2.1. Ocitocina (OXT).

A estrutura da ocitocina muda nos aminoácidos 3 e 8 com relação à vasopressina, os quais são isoleucina e leucina, respectivamente:

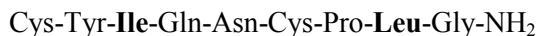


Tabela II-3. Concentração plasmática de ocitocina em alguns animais.

Espécie	Valor (pmol/l)
cadela (lactação)	15-66
vaca (pré-ordenha)	1,6 ± 0,6
cabra (basal)	4,5 ± 1,0

A secreção da OXT é estimulada via neurogênica por amamentação, ordenha, parto, dilatação cervical ou vaginal ou estímulo clitoridiano, sendo a acetilcolina o modulador estimulante e a adrenalina e a noradrenalina os agentes inibidores. Os níveis de OXT têm variações entre as espécies (Tabela II-3) e durante o ciclo ovário em vaca, ovelha e cabra. A concentração sanguínea de OXT aumenta depois do pico pré-ovulatório de LH e diminui depois da regressão do corpo lúteo. Os estrógenos ovários estimulam a liberação de OXT pituitária enquanto que a progesterona a inibe. Tem sido encontrado outros fatores não reprodutivos, como stress e osmolaridade plasmática, que afetam a liberação de OXT.

A ação da OXT causa contração do miométrio durante o parto. O termo “ocitócico” provem do grego e significa “parto rápido”. A OXT também causa a contração das células mioepiteliais da glândula mamária durante a lactação, o que facilita a descida do leite. O estrógeno é necessário para a ação da OXT pois estimula a síntese de receptores para OXT; portanto os estrógenos aumentam a resposta do útero à OXT. A progesterona, por sua parte, inibe a secreção de OXT, o que explica que durante a gestação a resposta do útero à OXT está muito reduzida. A adrenalina, secretada no stress, diminui a descida do leite da glândula mamária por bloquear a ação da OXT mediante a inibição de sua secreção na neurohipófise e também, possivelmente, por bloquear os receptores da OXT nas células mioepiteliais.

A OXT não tem função aparente no macho, embora parece estar envolvida no transporte dos espermatozoides no trato reprodutor masculino.

O corpo lúteo também secreta OXT estando envolvida no processo da luteólise na maioria dos mamíferos. A OXT ovárica, que se secreta sem neurofisina, tem receptores no endométrio e sua ação estimula a biossíntese de prostaglandina $F_{2\alpha}$. A síntese dos receptores de OXT no endométrio é estimulada por 17β -estradiol.

II.4. Bibliografia.

Comitee on Bovine Reproductive Nomenclature. Recommendations for standarizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet.* 62: 216-237. 1972.

Canfield, R.W. & Butler, W.R. Energy balance,

- first ovulation and the effects of naloxone on LH secretion in early post-partum dairy cows. *J. Anim. Sci.* 69: 740-746. 1991.
- Gauthier, D., Terqui, M. & Mauleon, P. Influence of nutrition on prepartum plasma levels of progesterone and total oestrogens and postpartum plasma levels of LH and FSH in suckling cows. *Anim. Prod.* 37: 89-96. 1983.
- Hall, S.J.G., Forsling, M.L., and Broom, D.M. (1998): Stress responses of sheep to routine procedures: changes in plasma concentrations of vasopressin, oxytocin and cortisol. *Veterinary Record*, 142:91-93.
- Kotwica, J., Skarzynski, D., and Miszkiel, G. (1998): Oxytocin modulates the pulsatile secretion of prostaglandin F2 α in initiated luteolysis in cattle. *Research in Veterinary Science*, 66:1-5.
- O'Connell, C.M. & Wettemann, R.P. Immunization of postpartum cows against GnRH influences the onset of luteal activity and establishment of pregnancy. *Anim. Sci. Res. Rep.* June 1990: 334-337.
- Weesner, G.D., Norris, T.A., Forrest, D.W. & Harms, P.G. Biological activity of LH in the peripartum cow: least activity at parturition with an increased throughout the postpartum interval. *Biol. Reprod.* 37: 851-858. 1987.

III. PAPEL DOS HORMÔNIOS NO EMBRIÃO

III.1. Determinação do sexo.

O sexo pode ser cromossômico (genético), gonadal, fenotípico (somático) e psíquico. Conforme o “paradigma de Jost”, o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos começa com o estabelecimento do sexo cromossômico no momento da fertilização, seguido da diferenciação do sexo gonadal e terminando com a formação do sexo fenotípico, ou seja a genitália interna e externa.

Cada passo depende do anterior sendo que, em condições normais, o sexo cromossômico corresponde ao sexo fenotípico. Entretanto, em ocasiões não existe essa coincidência, como são os casos dos machos XX, as fêmeas XY e os intersexos, nos quais o sexo fenotípico pode ser ambíguo.

III.1.1. Sexo cromossômico.

Os estudos sobre a determinação do sexo cromossômico começaram em 1910 com Morgan, quem demonstrou, trabalhando com moscas *Drosophila*, que o sexo estava ligado aos genes. Contudo, foi até o final da década de 1950 que Jacobs e Strong mostraram que a determinação do sexo residia no cromossomo Y.

Nos mamíferos, a fêmea é homogamética, ou seja, todos os ovócitos têm o mesmo conteúdo cromossômico. Um ovócito contém metade dos autossomos da espécie (n) além do cromossomo sexual X ($n+X$). Já o macho é heterogamético, isto é, 50% dos espermatozoides têm conteúdo cromossômico $n+X$, e 50% tem $n+Y$. Assim, na fertilização o zigoto pode resultar com carga cromossômica $2n+XX$ e será fêmea ou $2n+XY$ e será macho. Portanto, o sexo cromossômico está ligado à presença dos cromossomos sexuais do espermatozoide e do óvulo.

Nas aves, o sexo genético está determinado pelas fêmeas, pois os ovócitos são heterogaméticos (ZW) e os espermatozoides homogaméticos (ZZ). Os zigotos que resultam com cromossomos sexuais ZZ serão machos e os que tenham ZW serão fêmeas.

O cromossomo Y tem um braço curto invariável em tamanho e um braço longo, que pode variar consideravelmente em comprimento. Na década de 1960 foi demonstrado que a fração genética que determina o sexo masculino, denominado «gene determinante do testículo» (TDG) estava localizado no braço curto do cromossomo Y. Também foi estabelecido que outros genes adicionais dos braços curto e longo do cromossomo Y podem ser essenciais para a

normal espermatogênese.

Não se conhece ainda a base molecular dos genes que promovem a diferenciação testicular no cromossomo Y. A base da teoria atual foi estabelecida inicialmente em 1955 nos estudos de Eichwald e Silmsner com camundongos. Eles mostraram que os genes que regulam a expressão do sexo possuem uma região que codifica para um antígeno específico, uma proteína que provoca a transformação da gônada indiferenciada em testículo. O gene que codifica para tal antígeno foi conhecido como gene de histocompatibilidade Y ou gene H-Y.

Na década de 1970 foi postulado que o gene H-Y era, na verdade, o gene de determinação testicular (TDG). Entretanto, a partir de vários achados, como o fato de encontrar camundongos com testículos que não possuíam o antígeno H-Y, bem como fêmeas que possuíam o antígeno H-Y, foi sugerido que o gene H-Y e o gene TDG seriam genes separados. Isso não elimina a hipótese de que o gene H-Y codifique para um fator essencial da espermatogênese. De qualquer maneira, os dois genes estão muito próximos entre si, localizados no braço curto do cromossomo Y, sendo que a presença do gene H-Y corresponde, na maioria dos casos mas nem sempre, à presença do gene TDG.

Além do gene TDG, parecem existir outros genes autossômicos que também seriam necessários para a diferenciação gonadal normal. Tais genes poderiam determinar a formação de ovários, como é o caso do gene determinante de ovário (ODG). Segundo esta hipótese, nos indivíduos XY normais, os genes TDG seriam ativados antes que os genes ODG, inibindo estes últimos. Os indivíduos XX não teriam genes TDG e portanto manifestariam os genes ODG. Esta hipótese explicaria o que acontece com os hermafroditas verdadeiros XY. Nesses casos, os indivíduos sofreriam mutações em porções do DNA que interferem com a expressão dos genes TDG, o que resultaria em falhas na supressão dos genes ODG, desenvolvendo ovários e genitália feminina.

Assim, o cromossomo X dos indivíduos XY normais deve ser inativado para que ocorra a normal diferenciação testicular. Por outro lado, as fêmeas XX normais devem ter um dos cromossomos X ativo durante a diferenciação gonadal e os dois cromossomos XX ativos durante a ovogênese.

Estudos de Page em 1987, assinalaram um

gene responsável pela determinação do sexo masculino que codifica para uma proteína. O gene foi chamado de gene *zfy* (*zinc-finger gene for Y*) e está localizado no intervalo 1A2 do braço curto do cromossomo Y. Todavia, foram encontrados homens XX que não possuíam o gene *zfy*, embora fossem positivos ao segmento 1A1 do cromossomo Y, sugerindo que o TDG se encontrava nessa região e não na região 1A2.

Em 1990, o grupo de Palmer propôs a existência de uma região de DNA no intervalo 1A2 de 35 kb como sendo o TDG. Chamaram-na de gene *sry* (*sex-determining region for Y*). As evidências atuais levam a considerar o gene *sry* como o mais firme candidato para ser o TDG.

III.1.1.1. Distúrbios na determinação do sexo.

Os distúrbios na determinação do sexo envolvendo falhas na expressão dos genes TDG no cromossomo Y são basicamente duas: o macho que apresenta cromossomos XX e o hermafroditismo verdadeiro.

O caso dos machos XX, inicialmente descrito em camundongos, foi chamado de “mutação de reversão de sexo”. Esta anomalia parece ocorrer devido a uma translocação da região TDG do cromossomo Y no momento da meiose durante a espermatogênese, de forma que um cromossomo X estaria carregando a região TDG, causando diferenciação testicular em um indivíduo XX. O animal portador dessa mutação é conhecido como indivíduo XX_{Sxr}. Um distúrbio similar tem sido descrito em humanos com uma frequência de 1 em 24.000 nascimentos masculinos, em indivíduos com fenótipo de homem mas com carga cromossômica 46, XX. Clinicamente estes indivíduos mostram testículos pequenos com genitália externa masculina, azoospermia e infertilidade, um quadro similar ao síndrome de Klinefelter (47, XXY). Todos os casos de homens XX resultam positivos ao antígeno H-Y.

O hermafroditismo ou intersexo é causado por transtornos que envolvem os cromossomos sexuais e a expressão dos genes que controlam a determinação sexual. Como resultado pode ocorrer o hermafrodita verdadeiro, evento mais comum em humanos, em que geralmente o indivíduo tem características de macho.

No hermafroditismo verdadeiro estão presentes ovários e testículos separados ou unidos, porém sempre diferenciados (ovotestis). Em humanos, os cariótipos desses casos podem ser: 46, XX (66% dos casos); 46, XY (10% dos

casos) ou mosaicos (46, XX/46, XY).

Os hermafroditas XY têm mutação do gene TDG que impediria a supressão do gene ODG. Já o hermafrodita XX tem uma explicação mais complexa. Pode ser por presença não detectada de cromossomos Y (mosaico), por translocação da região TDG do cromossomo Y ao cromossomo X ou a um cromossomo autossômico, ou então por mutação genética.

Em cães têm sido encontrados hermafroditas XX, com frequência não estabelecida, porém bem menor que nos humanos.

No pseudohermafrodita, o indivíduo pode ser macho XY com testículos e/ou ovários, além de órgãos secundários femininos.

Transtornos na expressão do sexo cromossômico do tipo fêmeas XY podem ser consequência de deleções do gene TDG, ou então de inativação deste gene por mutações em regiões do DNA que codificam para as proteínas que controlam a via da diferenciação gonadal.

III.1.1.2. Erros cromossômicos.

Alguns erros cromossômicos, que envolvem os cromossomos sexuais e os autossômicos, são os seguintes:

(a) Não disjunção ou monossomia: ocorre quando falta um dos cromossomos sexuais. É o caso do indivíduo XO (síndrome de Turner), que se expressa somaticamente como fêmea. É um distúrbio relativamente frequente em humanos (1 em 1.000) e raro em animais. O caso YO não é viável, ocorrendo morte embrionária;

(b) Trissomias: quando existem três cromossomos sexuais no mesmo indivíduo. Podem ser XXY (síndrome de Klinefelter), que se expressa como macho com hipogonadismo, azoospermia e ginecomastia. É mais comum em humanos e raro em animais. Nos casos de animais observados, ocorre infertilidade. Também podem ser observadas fêmeas XXX (“superfêmeas”), que também resultam estéreis. Em humanos ocorrem trissomias de cromossomos autossômicos, como é o caso da trissomia do cromossomo 21 ou síndrome de Down. Em animais estas trissomias são letais;

(c) Inversões e translocações de cromossomos: esses transtornos podem ser compatíveis com a vida na maioria dos casos. Nos bovinos são especialmente frequentes as chamadas translocações robertsonianas devido à alta proporção de cromossomos acrossômicos (29);

(d) Triploidias: é um estado inviável do embrião, no qual ocorre inclusão de vários núcleos masculinos (polispermia) ou de vários pronúcleos femininos e um masculino (poliginia), evento causado frequentemente por envelhecimento das gametas;

(e) Quimerismo: caso em que estão presentes duas ou mais populações de células diferentes derivadas de dois ou mais zigotos (como por exemplo, XX/XY), caso que inclui o *freemartinismo* bovino. Este último transtorno ocorre em 92% das fêmeas de gestações gemelares em que um dos fetos é macho e o outro é fêmea. Como os embriões fêmeas têm o mesmo sistema receptor de andrógenos no trato urogenital que os machos, a exposição a andrógenos durante a diferenciação sexual causa virilização nas fêmeas. Isto significa que as diferenças no desenvolvimento anatômico entre machos e fêmeas depende da presença de hormônios e não de diferenças nos receptores hormonais nos tecidos-alvo. O fenótipo do indivíduo no freemartinismo vai depender de quando começa a produção de testosterona no testículo fetal em relação ao desenvolvimento do embrião;

(f) Mosaico: caso em que ocorrem duas ou mais linhagens de células cariotipicamente diferentes.

III.1.2. Sexo gonadal.

O sexo gonadal está determinado pelo sexo cromossômico quando os genes se expressam no embrião indiferenciado. Nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, as células germinativas, que podem ser identificadas na massa celular interna do embrião, migram por movimentos amebóides para o sulco genital onde se forma a gônada, ainda indiferenciada. Os gonócitos primitivos se movimentam do epitélio para o parênquima gonadal perdendo enseguida sua motilidade.

O gene de determinação testicular (TDG) codifica para proteínas que possuem receptores na membrana das células da gônada indiferenciada. A ação da proteína codificada pelo TDG leva à diferenciação da gônada, expressada como a migração do epitélio germinativo para a medula no caso do testículo ou para a periferia no caso do ovário.

A gônada indiferenciada possui três tipos de células: (a) as células germinativas, que originam espermatozóides ou ovócitos, (b) as células de suporte, que dão origem às células de Sertoli no testículo e às células da granulosa no

ovário, e (c) as células que originam o estroma ovárico ou o interstício testicular; precursor das células de Leydig.

O primeiro sinal de dimorfismo sexual nas gônadas de um indivíduo XY normal é o desenvolvimento das células de Sertoli e sua agregação para formar cordões espermato gênicos, fato que ocorre no testículo fetal humano por volta da 6ª a 8ª semana de gestação.

O ovário fetal demora mais tempo em manifestar sinais morfológicas, sendo identificado simplesmente por exclusão, isto é, se não se diferencia para testículo nesse tempo, é ovário. Aproximadamente no 6º mês de gestação no humano, as células da granulosa ficam organizadas no ovário fetal ao redor das células germinativas (ovócitos) para formar camadas simples de células foliculares, constituindo os folículos primordiais.

As células germinativas não são pré-condição para a diferenciação gonadal, ou seja, a gônada pode estar desenvolvida para ser testículo ou ovário, independentemente da presença de células germinativas, se por algum distúrbio não houver.

Jost determinou que o desenvolvimento do trato urogenital masculino é induzido por secreções do próprio testículo fetal, enquanto que o desenvolvimento do trato urogenital feminino pode ocorrer em ausência de gônadas e não requer secreções dos ovários fetais.

Duas substâncias dos testículos seriam necessárias para o desenvolvimento do trato genital masculino: (a) o hormônio anti-mulleriano (MIH), que causa a regressão dos dutos de Müller, e (b) os andrógenos, necessários para a virilização dos dutos de Wolff, o seio urogenital e o tubérculo urogenital.

O MIH é uma glicoproteína dimérica de aproximadamente 140 kD produzida pelas células de Sertoli do testículo fetal. Sua ação é local, inibindo o desenvolvimento dos dutos de Müller, sendo potencializada pela testosterona, embora os andrógenos ou estrógenos sozinhos não afetem o desenvolvimento mülleriano. Distúrbios na produção de MIH ou na resposta do tecido a este hormônio pode causar indivíduos com características de macho genético e fenotípico, porém com útero e ovidutos, o que dificulta a descida dos testículos e pode causar criptorquidia. É possível que a própria descida dos testículos esteja influenciada pelo MIH, porque este hormônio facilitaria a ancoragem dos

testículos no tecido peritoneal.

O mecanismo de ação do MIH não está claro. Foi demonstrado, contudo, que um efeito do MIH é a dissolução da membrana basal e a condensação das células mesenquimatosas dos dutos müllerianos. O MIH parece atuar mediante fosforilação de proteínas específicas na superfície da membrana celular.

O andrógeno mais importante do testículo fetal é a testosterona, que é produzido logo depois da diferenciação gonadal pelas células de Leydig. Com a diferenciação morfológica gonadal, ocorre também diferenciação enzimática que leva a produzir testosterona (testículos) ou estrógenos (ovário) por volta da 6ª a 8ª semana de gestação, no caso dos humanos. Os andrógenos são responsáveis pela virilização do trato urogenital masculino, além de “programar” o hipotálamo para que ocorra uma secreção tônica ao invés de uma secreção cíclica, como é o caso da fêmea.

Por outra parte, a administração de andrógenos a embriões femininos, no momento próprio, causa virilização da genitália interna e externa. Distúrbios genéticos que envolvem a síntese de andrógenos podem causar virilização incompleta dos dutos de Wolff em machos, que pode levar à manifestação de características femininas nesses indivíduos. Quando o transtorno é leve, podem ocorrer anormalidades no desenvolvimento da uretra (hipospadias). Nesses casos, a ausência de ovidutos e útero pode indicar que a inibição mülleriana foi efetivada, independente da ação da testosterona.

O controle da secreção de testosterona pelo testículo fetal e a consequente diferenciação da genitália, parece não estar influenciada pelas gonadotropinas sejam elas placentárias ou fetais.

A testosterona origina outro andrógeno mais potente, a 5 α -di-hidrotestosterona (DHT), que se une aos receptores androgênicos no núcleo com maior afinidade que a própria testosterona, para modificar a transcrição dos genes das células-alvo. A DHT é formada a partir da testosterona pela ação da enzima 5 α -redutase, cuja atividade é máxima antes da virilização do seio e do tubérculo urogenitais. As evidências sugerem que a testosterona viriliza os dutos de Wolff, enquanto que a DHT é responsável pela diferenciação da uretra, da próstata e da genitália externa masculina. A deficiência genética de sintetizar 5 α -redutase pode causar distúrbios na ação androgênica sobre o desenvolvimento da

genitália, causando pseudohermafroditismo.

III.1.3. Sexo fenotípico.

O sexo fenotípico é referido à evidência dos órgãos genitais, ou seja a genitália interna e externa, além dos caracteres sexuais secundários. Estes últimos, por sua vez, estão definidos pelos esteróides sexuais.

A principal diferenciação fenotípica no macho acontece entre a 8ª e a 11ª semana de gestação nos mamíferos pela ação conjunta de MIH e andrógenos sem a participação de gonadotropinas. Já outros aspectos do desenvolvimento sexual masculino, tais como o crescimento do pênis e a descida dos testículos, eventos que ocorrem no último terço da gestação, são dependentes das gonadotropinas que estimulam a síntese de testosterona naquele período.

No caso do ovário, a diferenciação enzimática para produzir estrógenos acontece em época similar à diferenciação para produzir testosterona no macho. Embora os estrógenos não sejam essenciais para o desenvolvimento fenotípico normal da fêmea, eles são importantes no desenvolvimento do ovário em si.

Até a 8ª semana de gestação, nos humanos, o trato urogenital está indiferenciado. Ele se desenvolve a partir de um sistema tubular dual, o sistema wolffiano e o sistema mülleriano, formado do rim mesonéfrico no início da embriogênese. O duto mülleriano não se pode desenvolver em ausência do duto wolffiano, evidenciando que este último duto atua como “guia” do primeiro. Até ocorrer a diferenciação fenotípica sexual, o sistema dual está presente.

III.1.3.1. Trato reprodutivo masculino.

O primeiro sinal de diferenciação do trato urogenital no macho é a degeneração dos dutos müllerianos, evento que ocorre posterior à formação dos cordões espermáticos no testículo.

Logo a seguir, ocorre uma sequência de eventos que levam à diferenciação dos dutos wolffianos. Primeiro, a porção do duto wolffiano que fica adjacente aos testículos sofre convoluções e é transformada em epidídimo. A porção central origina o vaso deferente e a porção inferior origina as vesículas seminais. Depois, no extremo do tubo wolffiano, ocorre a divisão do seio urogenital em uma porção superior, que origina a bexiga e a uretra superior e uma porção inferior que origina a uretra inferior, a próstata e parte da genitália externa. O tubérculo genital

origina o pênis, cujo desenvolvimento junto com o escroto, que é formado a partir das dobras genitais, está completo até o final do primeiro trimestre de gestação, nos humanos. Todos os anteriores eventos dependem de andrógenos. No final da gestação, ocorre um maior crescimento do pênis por ação da testosterona, superando em tamanho ao tubérculo genital da fêmea.

A descida dos testículos, que ocorre no final da gestação, é um fenômeno bastante complexo que depende de andrógenos. O evento está basicamente dividido em três fases: (a) movimento transabdominal, no qual o testículo migra para a parede anterior abdominal na região inguinal, (b) formação do processo vaginal e desenvolvimento do canal inguinal e o escroto, e (c) descida do testículo pelo canal inguinal para a bolsa escrotal.

III.1.3.2. Trato reprodutivo feminino.

O trato reprodutivo feminino se origina dos dutos de Müller. As porções cefálicas originam os ovidutos e as porções caudais se unem para formar o útero. O contato do útero com o seio urogenital induz a formação da placa uterovaginal, cujas células proliferam afastando o seio urogenital do útero e formando a vagina. Diferentemente do macho, no qual as porções fálica e pélvica do seio urogenital se fusionam para formar o escroto e fechar a uretra, na fêmea a maior parte do seio urogenital permanece aberto. O tubérculo urogenital na fêmea tem crescimento limitado e forma o clitóris.

O papel dos hormônios no desenvolvimento do trato genital no caso das fêmeas é menos claro que no caso dos andrógenos. Em marsupiais, os estrógenos influem na diferenciação do trato urogenital feminino, porém nos mamíferos não foi estabelecido o papel que os hormônios sejam eles placentários, do ovário fetal ou da circulação materna, possam ter sobre esse desenvolvimento. Embora tanto estrógenos quanto progesterona estejam envolvidos no crescimento e na

maturação do trato reprodutivo feminino, eles não são requeridos para a sua diferenciação. Por outra parte, diferentemente dos andrógenos, não têm sido identificadas mutações genéticas que resultem em falhas na síntese de estrógenos ou na resistência à ação estrogênica.

A diferenciação sexual é um evento biológico que não está completamente elucidado, especialmente em nível molecular, sendo que em humanos têm sido envolvidos até hoje pelo menos 19 genes não somente nos cromossomos sexuais mas também nos autossômicos. Ainda não se conhecem aspectos como o mecanismo pelo qual o mesmo sinal hormonal é traduzido em diferentes eventos fisiológicos nos diferentes tecidos e sobre as mudanças moleculares e celulares que causam estes eventos diferenciados.

III.2. Referências bibliográficas.

- Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H. et al. Genetic evidence equating SRY and the testis determining factor. *Nature* 348, 448-450. 1990.
- Cotinot, C., McElreavey, K., Fellous, M. Sex determination: genetic control. In: *Reproduction in mammals and man*. Ed. by C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Paris: Ellipses. 1993.
- Josso, N. Antimüllerian hormone: new perspectives for a sexist molecule. *Endocrin. Rev.* 7, 421-433. 1986.
- Jost, A., Magre, S. Sexual differentiation. In: *Reproduction in mammals and man*. Ed. by C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Paris: Ellipses. 1993.
- Jost, A., Vigier, B., Prepin, J. Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 29, 349-379. 1972.
- Page, D.C., Mosher, R., Simpson, E. et al. The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51, 1091-1104. 1987.

IV. ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DO MACHO

IV.1. Endocrinologia da puberdade.

A puberdade está definida no macho como a época em que atinge a capacidade para fertilizar uma fêmea. Isto significa que o indivíduo deve ter número suficiente de espermatozóides fecundantes, além de um comportamento sexual que permita a cópula.

A puberdade é atingida aos 3-4 meses no coelho, 6-7 meses nos caprinos, ovinos e suínos, 12 meses nos bovinos e 15-18 meses nos equinos. No touro, a puberdade é atingida quando o número de espermatozóides totais por ejaculado é de 50 milhões. No período pós-puberal, os testículos do touro continuam a crescer e o número de espermatozóides/ejaculado vai aumentando até a idade de 18-24 meses, quando a maturação é alcançada. O período de “infertilidade adolescente pós-puberal” com duração por volta de 1 ano, que é observada no homem, é de curta duração nos animais, só algumas semanas.

A idade em que se alcança a puberdade está afetada por vários fatores, entre os quais podem ser mencionados os seguintes :

- (a) os níveis hormonais de testosterona e de gonadotropinas secretadas durante o período pré-puberal;
- (b) a raça, sendo que as raças bovinas leiteiras são mais precoces que as de corte; as raças nativas de vacas e ovelhas apresentam puberdade a menor idade que as raças originadas em outras regiões;
- (c) o nível nutricional, tendo a energia como o fator mais importante; uma alimentação que leve a ganho de peso elevado, reduz a idade em que a puberdade é atingida;
- (d) o meio ambiente, principalmente em relação ao clima; o stress calórico ou o frio extremo atrasam o início da puberdade.

Em geral, os bovinos chegam à puberdade quando têm 30-40% do seu peso adulto nas raças leiteiras, ou 50% nas raças de corte. Nas ovelhas, a puberdade ocorre antes na raça Romney Marsh (40% do peso adulto) do que na raça Blackface (60% do peso adulto).

Estudos feitos em ratos, como animal modelo de experimentação, mostram que existem receptores para GnRH na pituitária anterior desde o 16º dia de gestação, o que sugere um papel ativo deste hormônio no controle da função pituitária fetal. As evidências, pelo menos em ratos, indicam que existe produção de LH na pituitária fetal. Por outro lado, existem receptores para LH no testículo fetal, os quais aumentam progressivamente durante a gestação até ter

níveis máximos no momento do nascimento. O aumento do número de receptores de LH no testículo coincide com o aumento no número de células de Leydig e o maior conteúdo testicular de testosterona. Entretanto, a testosterona diminui no momento do nascimento, o que leva a pensar que a testosterona fetal tenha mais a ver com a diferenciação sexual e o crescimento dos órgãos sexuais no feto. Esses fatos levam a crer que os hormônios FSH e LH têm função de controle no desenvolvimento testicular desde antes do nascimento.

Depois do nascimento, gradualmente com a idade, os níveis de GnRH aumentam, bem como o conteúdo pituitário de LH e de FSH. Entretanto, no período pós-natal a produção de testosterona é baixa. Durante o período infanto-juvenil, o testículo produz andrógenos, especialmente androstenediona, 5 α -androstenediol e 5 α -di-hidrotestosterona (DHT). A proteína transportadora de andrógenos (ABP) produzida pelas células de Sertoli por influência de FSH, aumenta seus níveis sanguíneos abruptamente logo após o nascimento.

Com o início da puberdade, ocorre um pronunciado aumento de testosterona, que está correlacionado com o padrão de secreção de LH, hormônio que estimula a secreção direta de testosterona nas células de Leydig. Os eventos primários que estabelecem o início da puberdade são originados no SNC e concorrem para causar uma alteração no padrão de secreção hipotalâmica de GnRH. Fatores hormonais e, possivelmente, um fator nervoso direto, influem no crescimento e na maturação testicular.

O FSH também participa da esteroidogênese estimulando a produção de receptores para gonadotropinas no testículo; portanto, o crescimento testicular avança em paralelo com o aumento de secreção de FSH. Além do FSH, outros hormônios, como GH e PRL, contribuem na indução da resposta testicular à ação do LH. Esses hormônios mostram aumento de seus níveis sanguíneos durante o desenvolvimento sexual. Com a puberdade, um padrão pulsátil de secreção de GnRH inicia, ocorrendo um pico de secreção de gonadotropinas durante o período pós-puberal. Também, têm sido achados receptores para GnRH no tecido intersticial do testículo, sugerindo uma função controladora deste hormônio hipotalâmico na secreção de andrógenos, possivelmente mediante inibição.

Assim, a esteroidogênese testicular estaria influenciada por dois fatores: (a) o padrão de

secreção dos hormônios hipotálamo-hipofisiários, e (b) a resposta das células intersticiais a esses hormônios.

O macho atinge a puberdade com transformações menos radicais que a fêmea. Diferentemente da fêmea, as interrelações entre a unidade hipotálamo-hipófise e as gônadas estão já funcionais no macho desde antes do nascimento, faltando tão somente um “ajuste” ou sincronização. O evento mais significativo na puberdade é a mudança na esteroidogênese que permite a produção de testosterona como principal andrógeno. Depois, na medida que o animal amadurece, os testículos ficam mais sensíveis à ação estimulatória das gonadotropinas, principalmente pelo aumento na secreção de FSH. Tanto testosterona como gonadotropinas proporcionam o principal estímulo para o início da espermatogênese.

O aumento de testosterona também produz alterações típicas da puberdade sobre os órgãos sexuais acessórios. Por outro lado, a testosterona e a inibina atuam em *feedback* negativo para atenuar a secreção de gonadotropinas. A testosterona aumenta progressivamente desde níveis muito baixos até os níveis de adulto, obedecendo à estimulação de LH de forma que cada pulso de LH é seguido de aumento de testosterona. A resposta de secreção de testosterona aumenta na medida em que a puberdade vai sendo atingida.

A hipótese “gonadostática” constitui a mais popular das explicações para o início da puberdade. Essa hipótese propõe que na medida em que ocorre a maturação, a sensibilidade da unidade hipotálamo-hipófise para reagir ao mecanismo *feedback* negativo dos esteróides gonadais diminui. Isto significa que um aumento gradual nos níveis de gonadotropinas resulta num estímulo mais forte de liberação de esteróides sexuais e que, quando a puberdade chega, a unidade hipotálamo-hipófise requer de maiores quantidades de andrógenos para inibir a secreção de gonadotropinas. Provavelmente haveria maior descarga de GnRH e maior resposta da hipófise a esse hormônio, provocando aumentos na frequência e na amplitude da secreção de LH.

Entretanto, outros estudos indicam que as mudanças na sensibilidade hipotalâmica, medida pelo número de receptores, não são tão evidentes fazendo perder relevância à hipótese gonadostática no processo de iniciação da atividade sexual. Mas, por outro lado, é evidente que os animais imaturos são mais sensíveis que

os animais pós-púberes ao efeito inibitório dos esteróides gonadais sobre a liberação de gonadotropinas.

Na procura de uma explicação alternativa para o início da puberdade, deve considerar-se a mais óbvia possibilidade, isto é, que é um evento independente da gônada, originado por um mecanismo central que ativa a liberação de GnRH. Uma noção que está clara é que os centros hipotalâmicos produtores de GnRH proporcionam um estímulo inicial para o início da maturação sexual. As mudanças morfológicas que acontecem nos neurônios produtores de GnRH quando a puberdade se aproxima podem indicar o controle central de início da puberdade.

IV.2. Órgãos reprodutivos do macho.

O trato reprodutivo masculino consta dos testículos, as vias espermáticas, o pênis e as glândulas acessórias.

IV.2.1. Os testículos como órgãos endócrinos.

No século XIX vários eventos marcaram história na fisiologia endócrina do testículo. Berthold, em 1849, demonstrou a existência de uma secreção do testículo com efeitos “corretivos” da castração em galos. Em 1850, Franz von Leydig descreveu as células intersticiais que levam seu nome e Sertoli fez o próprio em 1865 com outro tipo de células testiculares. Em 1890, Reinke relatou a presença de “cristalóides” nas células intersticiais, o que sugeria a existência de substâncias lipídicas. No início do século XX, Ancel e Bouin concluíram que a secreção testicular provem das células de Leydig, fato confirmado mais tarde por Tandler e Gross, quem ao destruir as células espermáticas por aplicação de raios X, sem afetar as células de Leydig, não observaram mudanças nos caracteres sexuais secundários, os quais são dependentes dos andrógenos. Em 1927, McGee obteve extratos alcoólicos de testículos de touro e Dond, em 1935 isolou a testosterona destas células, sendo Laqueur o responsável pelo nome.

Os testículos têm a dupla função de espermatogênese e de esteroidogênese. Os túbulos seminíferos são responsáveis pela formação dos espermatozóides e as células intersticiais produzem os esteróides. Os testículos se formam no embrião a partir das células germinativas primordiais que migram do saco vitelino para o sulco genital perto do mesonefros. Após a diferenciação gonadal, os dutos de Wolff

formam o epidídimo, os dutos deferentes, a âmpula e as vesículas seminais. A próstata e a glândula bulbouretral derivam do seio urogenital.

Em todos os mamíferos, os testículos são órgãos pares ovóides encapsulados, compostos de túbulos seminíferos separados por tecido intersticial. A unidade estrutural e funcional dos testículos são os túbulos seminíferos, os quais se consideram constituídos por 3 compartimentos:

(a) o compartimento adluminal, onde se encontram as células de Sertoli, as quais formam uma estreita união entre elas e, submersas entre estas células, as células germinativas em diferentes estados de desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes); no lúmen do túbulo aparecem os espermatozóides maduros;

(b) o compartimento basal, que separa o compartimento adluminal de qualquer contato com o sangue (barreira hemato-espermática), estando constituído por uma membrana basal de características conjuntivo-fibrosas. Existem também septos intertubulares e interlobulares constituídos por tecido conectivo;

(c) o compartimento intersticial, tecido que enche os espaços entre os túbulos seminíferos, onde se encontram as células de Leydig ou células intersticiais, produtoras de testosterona; neste compartimento circulam vasos sanguíneos e linfáticos, bem como os nervos do parênquima testicular. Também contém células de Mast e macrófagos. Estes últimos têm receptores para FSH produzindo lactato e outros metabólitos.

A proporção de tecido intersticial varia nas diferentes espécies, desde 10 a 15% no cão, rato e carneiro, passando por 25-35% no homem até quase 40% no porco e no cavalo. Não existe explicação para essas diferenças mas é interessante que nas espécies que têm maior proporção desse tecido ocorre maior produção de estrógenos.

Os túbulos seminíferos não são penetrados por vasos sanguíneos ou linfáticos, os quais ficam no tecido intersticial. As células espermatogênicas ficam portanto protegidas pela barreira hemato-espermática composta por dois tipos de células, as células de Sertoli e as células mióides, estas últimas também responsáveis pelo movimento peristáltico dos túbulos. A barreira hemato-espermática permite o isolamento imunológico das espermatídes, que por serem células haplóides podem ser consideradas como estranhas ao organismo, evitando assim a formação de anticorpos contra os próprios

espermatozóides.

IV.2.1.1. As células de Sertoli.

As células de Sertoli, descritas originalmente por Enrico Sertoli (1865) na Itália, são o componente não germinativo dos túbulos seminíferos. Elas ocupam o espaço entre a membrana basal e o lúmen, envolvendo as células germinativas em inúmeros grupos. Algumas características morfológicas dessas células, em relação com sua função são as seguintes:

(a) contém numerosos lisossomos e vacuolas autofágicas que participam na fagocitose e digestão das células germinativas degeneradas;

(b) possuem grandes quantidades de retículo endoplasmático liso, que revela atividade secretória de esteróides;

(c) apresentam alterações morfológicas ao longo do túbulo revelando a sua participação na formação do ciclo espermatogênico;

(d) existem uniões especializadas entre as células de Sertoli vizinhas que mantêm a integridade estrutural do túbulo seminífero e constitui o componente epitelial da barreira hemato-espermática, substâncias presentes no compartimento basal só podem ir aos compartimentos adluminal e luminal passando através das células de Sertoli.

Entre as funções das células de Sertoli estão as seguintes:

(a) Manutenção da barreira hemato-espermática e da secreção do fluido tubular. O fluido do túbulo seminífero é diferente do fluido da rete testis, que por sua vez é diferente do sangue e da linfa testicular. O fluido tubular contém mais proteínas e potássio que o da rete testis e ambos contêm menos proteína, porém mais potássio que o plasma sanguíneo. A produção de fluidos é hormônio-dependente.

(b) Secreção de mais de 100 proteínas. As células de Sertoli são sensíveis a FSH e a testosterona e secretam, entre outras, a proteína transportadora de andrógenos (ABP), a qual é estruturalmente similar à SHBG (globulina transportadora de hormônios sexuais), que é produzida no fígado. Oitenta por cento da secreção de ABP vai para o lúmen e 20% para o plasma sanguíneo. Esta proteína está imunologicamente relacionada com a globulina transportadora de estradiol. A principal função da ABP é o transporte extracelular de testosterona, para manter altos teores desse hormônio nos túbulos seminíferos e no epidídimo, visto que a concentração sanguínea

de testosterona é insuficiente para manter sua função nessas regiões. Outras proteínas secretadas pelas células de Sertoli incluem a transferrina e a ceruloplasmina, proteínas transportadoras de ferro e cobre, respectivamente, minerais necessários para o desenvolvimento das células germinativas. A produção destas proteínas é estimulada por FSH, testosterona e retinol.

(c) Secreção de ativadores de plasminogênio, enzimas cuja atividade é estimulada por FSH, estando envolvidas na reestruturação tistular e na migração celular, facilitando a liberação das espermátides maduras e a migração das células germinativas do compartimento basal para o compartimento adluminal.

(d) Secreção de hormônios, a maioria tendo efeitos autócrinos ou parácrinos, tais como a inibina e alguns esteróides. Embora as células de Sertoli produzam poucos andrógenos e contribuem muito pouco para o *pool* de andrógenos sanguíneos, alguns são importantes na função dos túbulos seminíferos, a rete testis e o epidídimo.

A regulação das células de Sertoli é realizada principalmente por FSH e testosterona. O FSH atua através de cAMP e Ca^{2+} . O receptor de FSH é uma glicoproteína com peso molecular de 146 kD. Existe controle do tipo *down regulation* nos receptores, isto é, quantidades elevadas de FSH induzem a internalização e degradação dos seus receptores. O FSH regula a secreção de proteínas nas células de Sertoli, bem como o metabolismo energético, pois estimula a captação de glicose, a produção de lactato e a atividade da glicogênio fosforilase. Também, o FSH estimula a síntese de glicoproteínas de superfície e tem profundo efeito na proliferação das próprias células de Sertoli. Os efeitos da testosterona são similares aos do FSH. Por outro lado, a testosterona inibe o efeito da inibina sobre o FSH. O principal efeito da testosterona é sobre a síntese de proteínas. O FSH e a testosterona atuam sinergicamente para induzir a síntese de receptores de FSH nas células de Sertoli.

As vitaminas A, D e E são estimulatórias da atividade das células de Sertoli. Deficiências de vitamina A causam diminuição da fertilidade ao ponto de causar azoospermia. A vitamina E influi na secreção de ABP.

IV.2.1.2. Síntese de testosterona.

As células intersticiais ou de Leydig, localizadas fora dos túbulos seminíferos, estão

sob controle da LH e secretam os andrógenos, dos quais o mais importante é a testosterona e seu produto biologicamente mais ativo, a 5-dihidrotestosterona (DHT). A biossíntese da testosterona é realizada no retículo endoplasmático da célula de Leydig. A conversão a DHT é realizada nos órgãos-alvo da testosterona (próstata, pele, folículos pilosos, cérebro) pela 5α -redutase, que requer NADPH como coenzima. Existem várias isoenzimas da 5α -redutase que variam dependendo do órgão-alvo. A afinidade do receptor androgênico é maior pela DHT do que pela testosterona.

A fonte primária dos andrógenos é o depósito de colesterol existente nas gotas lipídicas do citoplasma das células de Leydig. A origem do colesterol é principalmente da própria célula e em menor proporção do colesterol plasmático. O colesterol armazenado em forma de éster é hidrolisado pela enzima colesterol-éster hidrolase, estimulada pelo LH.

A via de síntese dos andrógenos envolve a conversão de colesterol até testosterona. A via inicia com a conversão de colesterol em pregnenolona, que acontece na mitocôndria. Esta reação é realizada por enzimas do grupo dos citocromos P450, que têm função hidroxilase e liase. A enzima utiliza O_2 unindo um átomo de oxigênio a um C para formar o grupo hidroxila (mediante monoxigenação) e formando H_2O com o outro átomo de oxigênio e os hidrogênios fornecidos pela coenzima $\text{NADPH} + \text{H}^+$. O citocromo P450 aplica grupos hidroxila nos C de números 20 e 22 da cadeia lateral do colesterol, para posteriormente romper a cadeia (efeito liase) entre os C hidroxilados. Todas as anteriores reações são feitas pela mesma enzima em 3 passos.

A pregnenolona entra depois aos microsomos para continuar a via. A partir da pregnenolona duas vias são possíveis para chegar até androstenediona: a via da progesterona (via Δ^4) e a via da de-hidroepiandrosterona (DHEA) (Δ^5). A preferência da via depende da espécie e do tecido. No caso da via Δ^4 atua a enzima desidrogenase-isomerase que converte o grupo hidroxila do anel A em grupo ceto, ao passo que transfere a dupla ligação do C5 para o C4 (Δ^4) gerando progesterona (P_4). No caso da via Δ^5 atua o citocromo P450 com função hidroxilase no C17 α e função liase, rompendo a cadeia entre o C17 e o C20, para formar DHEA.

No seguinte passo, as enzimas se alternam, de forma que na via Δ^4 atua o citocromo P450

sobre a progesterona para dar androstenediona, enquanto que na via Δ^5 atua a desidrogenase-isomerase sobre a DHEA para dar também androstenediona. A androstenediona pode sofrer interconversão a testosterona mediante a 17β -desidrogenase com participação de NAD^+ .

IV.2.1.3. Regulação da síntese de testosterona.

O controle mais importante da síntese de andrógenos no testículo é feito pelo LH, existindo uma regulação *feedback* negativa. O LH se une a seu receptor nas células de Leydig, sendo que cada célula tem cerca de 20.000 receptores. Experimentalmente foi observado que os receptores do LH também unem o hormônio hCG. O receptor para LH é uma glicoproteína de 180 kD, composta por 2 subunidades protéicas idênticas de 90 kD.

O receptor de LH está acoplado à enzima adenilciclase mediante um sistema GTP estimulatório. A união do receptor a uma unidade de GTP ativa a adenilciclase, que sintetiza cAMP a partir de ATP. O cAMP se une à subunidade regulatória de uma proteína-quinase para ativá-la. A única ação possível da proteína-quinase na célula de Leydig é a fosforilação da enzima colesterol-éster hidrolase que desta forma é ativada para liberar colesterol, o qual é direcionado para a mitocôndria através de microfilamentos. O aumento de colesterol causa estímulo da via esteroidogênica através da clivagem da cadeia lateral do colesterol.

O cAMP é metabolizado por uma fosfodiesterase e aquele que não se une imediatamente à proteína-quinase é inativado, de forma que a duração da resposta ao LH pode ser controlada pela própria célula. O LH também provoca aumento na síntese de proteínas específicas que têm a ver com a atividade de clivagem do colesterol que se observa com a ação do LH.

Outros segundos mensageiros do LH, além do cAMP, são cogitados, entre eles o Ca^{2+} e os derivados do fosfatidil-inositol bifosfato. Já os andrógenos atuam sobre suas células-alvo através de receptores intracelulares, modificando a velocidade de transcrição de genes.

A regulação hipotalâmica da secreção de andrógenos está determinada pela secreção de GnRH. Fatores externos, como a luz e ou estímulos olfatórios (feromônios) ou visuais, podem aumentar a secreção de GnRH via sistema

nervoso central, mediante neuro-receptores que incluem a dopamina, a norepinefrina e a serotonina. A função secretora das células de Leydig é estimulada pela prolactina, favorecendo a síntese de receptores para LH (efeito oposto ao da fêmea) e possivelmente melhorando a atividade enzimática da síntese de testosterona a partir de colesterol. O FSH também parece favorecer a presença de receptores para LH nas células de Leydig.

O stress ocasiona aumento da secreção de ACTH, o qual inibe a secreção de LH no macho, e portanto de testosterona, desfavorecendo a espermatogênese e a libido. Os glicocorticóides secretados pela ação do ACTH também parecem ter ação inibitória direta sobre a secreção das gonadotropinas.

Existe uma relação entre a atividade reprodutiva do macho e o funcionamento tireoidiano. Em machos hipotireoideos, seja por deficiência de iodo ou por ingestão de substâncias bociogênicas, é observada depressão da libido e da espermatogênese.

Outros fatores que podem afetar a síntese de testosterona incluem os seguintes:

- (a) GnRH hipotalâmico ou um homólogo testicular que estimula a produção de testosterona nas células de Leydig. Este fator não atua mediante cAMP, sendo considerado como a base da interação local entre as células de Sertoli e as células de Leydig.
- (b) Prostaglandinas. A PGE_2 estimula a síntese de testosterona nas células de Leydig, ao passo que $\text{PGF}_{2\alpha}$ inibe a síntese de esteróides em resposta a LH.
- (c) Fluxo sanguíneo. A taxa de secreção de testosterona está relacionada diretamente com o fluxo sanguíneo da artéria espermática.
- (d) Sistema nervoso. A adrenalina diminui a concentração de testosterona plasmática, talvez por diminuir o fluxo sanguíneo ao testículo. Por outro lado, a própria adrenalina estimula a secreção de testosterona no testículo, quando se considera constante o volume de sangue.
- (e) Controle *down regulation*, considerado como um controle da secreção de testosterona, mediante a diminuição do número de receptores para LH, quando ocorrem aumentos importantes desse hormônio. O excesso de LH provoca internalização dos receptores. Existem dúvidas sobre a utilização desse mecanismo nas condições fisiológicas.

(f) Estrógenos. A síntese de testosterona parece ter também um controle parácrino pois os

estrógenos sintetizados pelas células de Sertoli inibem a síntese de testosterona nas células de Leydig por inibir a enzima que cliva o colesterol, o citocromo P450.

IV.2.1.4. Principais ações dos andrógenos.

(a) Diferenciação sexual. A diferenciação da gônada por efeito do antígeno codificado pelo gene *sry* (fator de determinação de testículo) causa o início de produção de testosterona, a qual promove a diferenciação dos dutos internos (vaso deferente, vesículas seminais, epidídimo) a partir dos dutos de Wolff. As células de Sertoli, por sua vez, produzem o hormônio anti-mülleriano (AMH) que inibe o desenvolvimento dos túbulos paramesonéfricos, os quais originam o útero e os ovidutos na fêmea. A DHT promove a diferenciação da uretra, a próstata e os genitais externos. A diferenciação sexual ocorre aos 30 dias da gestação nos suínos e nos felinos, aos 35 dias nos ovinos e aos 45 dias nos bovinos.

(b) Espermatogênese, junto com FSH.

(c) Desenvolvimento e manutenção dos órgãos sexuais secundários. Também os andrógenos são responsáveis pelo desenvolvimento de estruturas ornamentais nos machos de algumas espécies, tais como a crista, a pigmentação sexual, o crescimento de pêlo e chifres e o maior tamanho da musculatura esquelética.

(d) Comportamento de combatividade e dominância no rebanho.

(e) Efeitos anabólicos e promotores do crescimento esquelético e muscular.

(f) Estímulo da libido, a ereção e a ejaculação.

(g) Outros efeitos metabólicos incluem a redistribuição da gordura corporal, a maior concentração de eritrócitos e a maior taxa metabólica.

As células de Leydig também podem sintetizar estrógenos a partir da aromatização dos andrógenos, tendo altos valores no cavalo e no porco. As células de Sertoli também podem sintetizar estrógenos, especialmente antes da puberdade. Os níveis plasmáticos de testosterona são maiores no touro e no carneiro (6 ng/ml) do que em cavalo, bode e cão (2,2 ng/ml).

IV.2.2. A bolsa escrotal.

Na maioria das espécies, os testículos estão fora do abdômen na bolsa escrotal, a qual é subinguinal no touro, o carneiro e o cavalo, e perineal no porco. Nas aves, os testículos têm localização intra-abdominal. A posição dos

testículos é vertical nos ruminantes, no gato e no homem, horizontal no cavalo e oblíqua no cão e no porco. O escroto é pendular no carneiro, no touro e no homem e não pendular no porco, cavalo, rato, coelho e nos carnívoros.

Os testículos descem da cavidade abdominal para a bolsa escrotal pelo *gubernaculum testis* antes do nascimento na maioria das espécies. A época de descida dos testículos varia com a espécie. Geralmente o descenso ocorre durante a gestação, exceto no cavalo, no qual desce duas semanas antes ou depois do nascimento. Quando os testículos não descem, ocorre o criptorquidismo, que pode ser uni ou bilateral, devido a causas genéticas, sendo mais frequente em equinos, suínos e humanos. Os animais criptórquidos são inférteis ou subférteis, por causa da temperatura imprópria para a espermatogênese na cavidade abdominal. A libido, que é dependente da esteroidogênese, não é afetada pela criptorquidia e pode até estar aumentada.

O escroto está ausente no tatu, no elefante, nos golfinhos e nas baleias. Nessas espécies a espermatogênese é normal apesar dos testículos estarem na cavidade abdominal.

O escroto facilita a manutenção da temperatura dos testículos em 5-6°C abaixo da temperatura corporal. A termo-regulação do testículo é necessária para manter a temperatura adequada para a espermatogênese, sendo controlada por vários eventos: (a) o plexo pampiniforme, o qual resfria o sangue arterial que chega ao testículo; (b) os músculos cremâster que, junto com a túnica muscular dartos da bolsa escrotal, podem elevar os testículos no frio ou descê-los no calor; e (c) as inúmeras glândulas sudoríparas da pele escrotal.

A artéria testicular é extensamente enrolada, especialmente fora do cordão inguinal. Nos ruminantes e no porco 5 m de artéria podem estar estreitamente enrolados em 10 cm dentro do cordão espermático. As veias abandonam o testículo perto do pólo dorsal para formar o plexo pampiniforme (o nome se deve a sua forma de enredadeira de videira). O plexo rodeia a artéria enrolada, podendo haver anastomoses artério-venosas que fazem com que aproximadamente 40% do sangue da artéria retorne ao sistema venoso sem passar pelo testículo.

No cordão espermático, o duto deferente associado com a artéria e as veias correm em invólucro peritoneal separado do músculo

cremáster, arranjo que quase elimina o pulso da artéria que vai pelo cordão com pouquíssima diferença de pressão. Simultaneamente, o cordão atua para causar um eficiente intercâmbio de calor em contracorrente, esfriando o sangue arterial com o sangue venoso que vem da temperatura escrotal e aquecendo o sangue venoso com o sangue da artéria que vem com a temperatura corporal.

Duas hipóteses tentam explicar a necessidade de uma menor temperatura nos testículos para a normal espermatogênese: (a) a taxa de mutações espontâneas nas células germinativas é menor; (b) previne espermatogênese em épocas diferentes àquelas do apareamento.

Em humanos é comum a condição de varizes nas veias do plexo pampiniforme (varicocele) provavelmente por falha no funcionamento das válvulas da veia principal, que faz com que o sangue venoso retorne ao plexo e passe à circulação arterial através das anastomoses. O conceito de associar varicocele com baixa fertilidade parece não ter fundamento.

IV.2.3. As vias espermáticas.

As vias espermáticas são condutos com funções de armazenamento, maturação e transporte do material seminal desde os túbulos seminíferos até a uretra. Compreendem a rete testis, os dutos eferentes, o epidídimo e o ducto deferente.

A rete testis é uma complicada rede tubular com canais intercomunicados que permite o transporte dos espermatozoides e fluidos em direção ao epidídimo. O ponto de união entre a rete testis e o epidídimo é feito mediante os dutos eferentes, os quais têm dois tipos de células, as principais e as ciliadas. Suas funções incluem transporte de espermatozoides, secreção de substâncias e absorção de fluidos.

O epidídimo é um tubo simples altamente convoluto de considerável comprimento que se dobra sobre si mesmo. Colado à superfície do testículo, se estende do pólo anterior ao posterior deste órgão, mantendo-se firmemente unido à túnica albugínea mediante tecido conectivo. O epidídimo leva os espermatozoides dos dutos eferentes para os dutos deferentes. O epidídimo consta de 3 partes: (a) caput ou cabeça, no pólo superior do testículo, (b) corpo, que beira lateralmente o testículo e (c) cauda, no pólo inferior. Uma proposta alternativa divide o epidídimo em regiões inicial, média e terminal.

As duas classificações não necessariamente coincidem.

O epidídimo tem funções secretórias que visam manter a viabilidade do espermatozoide durante o armazenamento. O epitélio ciliado do epidídimo e a capacidade contrátil de sua parede permitem o transporte dos espermatozoides. Outra função do epidídimo é a maturação dos espermatozoides, processo que inclui mudanças morfo-bioquímicas a fim de capacitar os espermatozoides para a fecundação. Os segmentos inicial e médio estão comprometidos com a maturação espermática, enquanto que o segmento terminal tem maior capacidade de armazenamento. A cabeça e o corpo do epidídimo têm capacidade para absorver fluidos. A passagem dos espermatozoides pelo epidídimo dura de 10 a 12 dias.

Da cauda do epidídimo surge o ducto deferente, que entra na cavidade abdominal dentro do cordão espermático e desemboca no colículo seminal da uretra pélvica (âmpula). O ducto deferente tem uma parede muscular grossa que faz muito nítido o cordão, tendo um comprimento aproximado de 25 cm no humano e de 6 cm no rato. No homem, o ducto deferente termina no ducto ejaculador, antes de desembocar na uretra. A uretra, conduto final da secreção espermática, é uma via comum com a excreção urinária e possui uma porção pélvica e outra peneana. Com um complexo epitélio, o ducto deferente tem funções absorptivas e secretórias e está dividido em três seções: proximal, localizada no escroto, distal, na região inguinal, e terminal, na pelvis abdominal.

A âmpula, quando presente, é uma porção engrossada do ducto deferente com vesículas cheias de fluidos, sendo particularmente grande no cavalo (25 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro). No touro tem 10 x 1,5 cm e no carneiro 7 x 0,6 cm.

O cordão espermático inclui: (a) a artéria espermática; (b) as veias espermáticas, que formam o plexo pampiniforme; (c) os nervos espermáticos; (d) o ducto deferente; (e) os vasos linfáticos; (f) a túnica vaginal parietal; e (g) os músculos cremáster externo e interno.

IV.2.4. O pênis.

O órgão copulatório ou pênis está constituído de corpos cavernosos, estendendo-se desde seu sítio de inserção na arcada isquiática até um pouco antes do umbigo. O comprimento total é de 100 cm no touro, 50 cm no cavalo, 55

cm no porco e 40 cm no carneiro. O pênis esta composto da raiz, o corpo e a glândula. Os corpos cavernoso e esponjoso, partes do corpo do pênis, são os elementos responsáveis pela ereção. No touro, o maior comprimento do pênis é devido à flexura sigmóide, localizada na região retro-escrotal. O glândula tem uma grande variação morfológica nas diferentes espécies, sendo mais diferenciado no cavalo e no carneiro. O pênis do cão e outros carnívoros está provido de um osso sessamóide, que lhe permite a penetração ainda sem estar completamente ereto.

O pênis tem duas funções, quais sejam, conduzir a urina através da uretra inferior e inseminar as fêmeas, para o qual algum grau de ereção é necessário. Os dois eventos são mutuamente excludentes porque a tumescência impede a micção e o esfíncter interno da bexiga se contrai durante a ejaculação.

A dimensão média do pênis para a espécie não guarda relação com o tamanho corporal: por exemplo, o gorila, a maior espécie dos primatas, tem um pênis pequeno (aproximadamente 3 cm ereto), enquanto que o do chimpanzé pigmeu tem 8 cm ou mais de comprimento em ereção. O crescimento do pênis é dependente de andrógenos, bem como de GH.

A ereção está determinada por dois eventos: (a) a dilatação das artérias que irrigam os corpos cavernosos do pênis, quando ocorre o estímulo sexual; essa dilatação é favorecida pelo lento retorno venoso ocasionado pela disposição das válvulas das veias peneanas; e (b) a contração dos músculos isquiocavernoso e bulboesponjoso que comprime a veia dorsal do pênis contra o arco isquiático, tornando mais lento o retorno venoso. A saída do pênis nos ruminantes é permitida pelo músculo isquiocavernoso. A ejaculação está acompanhada da contração dos músculos esqueléticos inervados pelos nervos sacros.

IV.2.5. As glândulas acessórias.

As glândulas acessórias são órgãos túbulo-alveolares cuja secreção desemboca na uretra misturando-se com os espermatozoides no momento da ejaculação, para formar o sêmen e fornecer o fluido necessário para o transporte e a nutrição dos espermatozoides. Compreendem as vesículas seminais (glândulas vesiculares), a próstata, as glândulas bulbo-uretrais (glândulas de Cowper) e as glândulas uretrais (glândulas de Littre).

De todos os órgãos reprodutivos

masculinos, as glândulas acessórias são as que têm maior variação entre as diferentes espécies em termos de anatomia, biologia e função. Não somente varia o tipo e a forma da glândula, mas o volume, as características físicas e o conteúdo bioquímico de suas secreções. Existe considerável variação entre as espécies de mamíferos em relação ao número de glândulas acessórias. A única glândula acessória presente em todos os mamíferos é a próstata. Excetuando carnívoros e cetáceos, os demais mamíferos possuem glândulas bulbo-uretrais. O rato possui todas as principais glândulas acessórias, tendo ainda umas glândulas entre a pele prepucial, as glândulas prepuciais, que drenam no saco prepucial.

As vesículas seminais, em número par, não existem no cão e nem no gato. São assim chamadas devido ao conceito inicial errado de que eram reservatórios de espermatozoides. Possuem tecido compacto arranjado em múltiplos lóbulos e com um sistema ramificado de dutos.

A próstata é uma glândula ímpar túbulo-alveolar difusa presente em todos os mamíferos. Foi assim chamada devido a sua localização anterior à bexiga e às vesículas seminais. Sua morfologia varia muito entre as espécies, sendo de tamanho reduzido nos ruminantes e de maior tamanho no cavalo, o cão e o homem. O corpo da próstata rodeia a uretra, enquanto que a parte disseminada se estende embaixo da uretra pélvica. No homem pesa aproximadamente 20 g e descarrega na uretra mediante 15 a 30 dutos.

A hiperplasia prostática benigna, frequente no homem e no cão está restrita à região pré-prostática. A incidência chega a 80% da população em indivíduos de raça branca (EUA), sendo que 25% dos casos requerem de cirurgia. Esta hiperplasia é a 2ª causa de cirurgia nos homens nos Estados Unidos. O câncer ataca menos pessoas mas mesmo assim é a 2ª causa de morte por câncer nesse país.

As glândulas bulbo-uretrais ou glândulas de Cowper são tubulares, multi-lobulares ou túbulo-alveolares. Sua secreção é mucosa e estão localizadas em número par lateralmente à uretra pélvica. Não estão presentes no cão, enquanto que no porco são de grande tamanho e são responsáveis pela secreção gelatinosa da última parte do plasma seminal.

As glândulas uretrais são mais evidentes no homem e no porco. Sua secreção é de tipo mucoso e se abrem na porção cavernosa da uretra

no homem.

A diferenciação embrionária das glândulas acessórias bem como seu crescimento são dependentes dos andrógenos. As glândulas acessórias possuem um epitélio secretor, cuja superfície aumenta com as vilosidades. As secreções da próstata, das glândulas bulbo-uretrais e das vesículas seminais formam a maioria do plasma seminal, o qual contém também componentes da rete testis, bem como fluídos do epidídimo.

O sêmen da maioria dos mamíferos é relativamente diluído devido à grande proporção de plasma seminal. O volume varia entre as diferentes espécies, sendo maior no varrão (250 ml), animal que secreta copiosa quantidade de plasma seminal, principalmente das glândulas bulbo-uretrais, antes da emissão seminal verdadeira, a fim de lubrificar o pênis e a vagina e, adicionalmente, servir como fonte de feromônios, que têm a função de atrair a fêmea. Em aves, a pequena quantidade de plasma seminal é emitida pelos túbulos seminíferos e os vasos deferentes. O volume de sêmen no cavalo é de 70 ml, no cachorro de 9 ml, no touro de 4 ml, no homem de 3 ml e no carneiro de 1 ml.

A principal substância do plasma seminal é a água, o que lhe confere a sua principal função hidrodinâmica para garantir que o sêmen seja efetivamente ejaculado no canal genital feminino. O plasma seminal é responsável por quase 99% do sêmen. O sêmen é depositado na vagina superior em espécies de cervix grande (vaca,

mulher) ou no lúmen uterino (rata, camundongo). Das centenas de milhões de espermatozoides que são depositados no ejaculado, a maior parte não atravessa o cervix e poucos milhares atingem o óvulo na âmpula do oviduto, onde se realiza a fertilização. Praticamente nenhum dos componentes do plasma seminal atinge o oviduto, pois as concentrações das substâncias ficam diluídas nas secreções uterinas e do oviduto. Isto significa que é virtualmente improvável que alguma biomolécula do plasma seminal participe do processo de fertilização.

Existe muita variação na composição química do plasma seminal (Tabela IV-1). Apesar da alta quantidade de substâncias, pouco se sabe sobre as funções específicas de cada um de seus componentes. É pouco provável que todas tenham importância reprodutiva, assim como as inúmeras substâncias do plasma sanguíneo não necessariamente têm significância fisiológica para as células sanguíneas. A alta concentração de frutose fornece energia para o metabolismo do espermatozoide. As proteínas servem para a sobrevivência do espermatozoide graças a sua função tampão para neutralizar o pH ácido das secreções vaginais (por volta de 5,0). As prostaglandinas do plasma seminal podem contribuir para facilitar o transporte dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino. Outros componentes incluem poliaminas (espermina, espermidina), zinco em altas quantidades (150 µg/ml) e enzimas (proteases, fosfatase ácida). No plasma seminal humano, o

Tabela IV-1. Concentração de algumas substâncias no plasma seminal.

Parâmetro	Cão	Carneiro	Varrão	Touro	Homem
Volume (ml)	2-15	0,7-2	150-500	2-10	2-6
Concentração espermática (10^6 /ml)	60-300	2000-5000	25-300	300-2000	50-150
Frutose (mM)	0,03	8-37	0,5	17-56	2-33
Glicose (mM)			0,06-0,3		0,4
Sorbitol (mM)	0,05	1,4-6,6	0,4	0,6-7,5	0,6
Proteína (mg/ml)	24		30	55	35-50
Bicarbonato (mM)	2,9	7		7	8
Fosfato (mM)	0,3	2,5	0,4	2,8	
Citrato (mM)		16-42	2,6-10,4	18-52	5,2-73
Sódio (mM)	72-180	77	125-252	65-161	43-112
Potássio (mM)	8	23	17-46	13-97	14-28
Cálcio (mM)	0,2-1,2	1,6-2,3	1,5-4,6	6-15	5-7
Magnésio (mM)	0,15-1,5	2,4	2,5-24	3,3	1,2-5
Cloreto (mM)	152	51	85-105	42-110	28-56

principal ânion é o citrato, enquanto que no cão é o cloreto.

Existem também consideráveis variações na composição do plasma seminal entre indivíduos da mesma espécie e dentro do mesmo indivíduo em sucessivos ejaculados, refletindo diferenças sazonais. Na eletroejaculação, a composição do plasma seminal está influenciada pela contribuição de determinada glândula acessória, dependendo da posição dos eletrodos.

Os espermatozoides são capazes de fertilizar sem ter que entrar em contato com secreções das glândulas acessórias. Entretanto, as secreções seminais otimizam as condições de motilidade, sobrevivência e transporte dos espermatozoides, tanto no trato reprodutivo masculino, quanto no feminino.

IV.3. Espermatogênese.

A espermatogênese é a sequência de eventos citológicos que resulta na formação de espermatozoides a partir das células germinativas, processo que se realiza no epitélio dos túbulos seminíferos, depois da puberdade. Nos reprodutores estacionais, a espermatogênese está interrompida durante as estações de inatividade reprodutiva.

A espermatogênese envolve a replicação das células germinativas e a série de mudanças morfo-bioquímicas que levam à produção de espermatozoides. Os mais importantes eventos na espermatogênese são: (a) a renovação de células germinativas por mitose, (b) a redução do número de cromossomos por meiose, e (c) a transformação de uma célula convencional em uma complexa estrutura mótil (espermatozoide) durante uma metamorfose (espermio gênese).

As células germinativas são as espermatogônias que, após a puberdade, se diferenciam em função de sua morfologia nuclear em três tipos: A, B e In (intermediária). A partir da linha primordial de espermatogônias são originadas, por multiplicação mitótica, duas linhas, uma ativa (A_1) e outra de reserva (A_0). As espermatogônias de reserva (A_0) permanecem latentes e servem para substituir células no evento em que se precise, isto é, quando ocorre danificação testicular por irradiação, tóxicos, inflamação ou infecções.

As espermatogônias ativas (A_1) se multiplicam por mitose para dar sucessivamente as espermatogônias A_2 , A_3 , A_4 , In e B. As diferentes populações de espermatogônias permanecem ligadas através de pontes

intracelulares de 2 a 3 μm de largura, separadas das células de Sertoli por espaços intracelulares de 0,2 μm .

Das espermatogônias B ($2n$) são originados por meiose os espermatócitos primários (1^{a} divisão meiótica) e os espermatócitos secundários (2^{a} divisão meiótica), os quais perdem contato com a membrana basal do epitélio seminífero e sofrem modificações morfo-bioquímicas para gerar as espermátides (n). O processo, até este ponto, é conhecido como espermatocitogênese. Na meiose acontece recombinação homóloga (*crossing over*) entre os cromossomos dos espermatócitos.

Posteriormente, cada espermátide por transformação origina um espermatozoide, no processo conhecido como espermiogênese, no qual ocorrem os seguintes eventos:

- (a) o núcleo da espermátide origina a cabeça do espermatozoide, que contém também o acrossomo, formado a partir do aparelho de Golgi; o acrossomo contém grande variedade de enzimas lisossomais, importantes na penetração da zona pelúcida do óvulo;
- (2) mudanças do núcleo, tais como o deslocamento do centro para a periferia, condensação da cromatina e redução do volume nuclear, simultaneamente com mudanças dramáticas na cabeça do espermatozoide;
- (3) um dos centríolos origina o centro cinético do espermatozoide, ao passo que o outro centríolo forma a cauda, evento de alta complexidade, que compreende: a formação do filamento axial, da peça intermediária, da peça principal e da bainha mitocondrial. O filamento axial é uma estrutura similar aos cílios e flagelos com um axonema de 9 túbulos pares periféricos e um par de túbulos centrais, todos formados por proteínas contráteis chamadas tubulina e dineína, que são similares a actina e miosina, unidas por pontes de nexina;

Os espermatozoides ainda imaturos (espermátides) são liberados à luz do túbulo pela atividade contrátil das células mioepiteliais dos túbulos seminíferos no processo conhecido como espermição. No processo ficam os chamados “corpos residuais” no citoplasma das células de Sertoli, remanescentes do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático, sendo depois fagocitados pelas próprias células de Sertoli.

A espermatogênese é garantida pelo ambiente único existente no epitélio seminífero entre as células de Sertoli, que formam a barreira hemato-espermática. As espermatogônias foram identificadas por von Ebner (1871) e o termo foi

aplicado por von La Valette St. George (1876), pesquisador que também deu os nomes de espermátócito e espermátide.

O controle da espermatogênese é feito pela FSH e pela testosterona. A ABP produzida nas células de Sertoli leva a testosterona até o local da espermatogênese. As células de Sertoli secretam também a inibina, proteína de 32 kD com duas cadeias polipeptídicas, que tem função regulatória sobre a secreção de FSH, mediante mecanismo *feedback* negativo.

A viabilidade dos espermatozóides varia conforme a espécie, sendo menor no porco (12 a 16 horas) e muito maior nas aves. Os espermatozóides do galo são viáveis no oviduto da galinha até 35 dias. No bovino e no ovino duram 24 a 48 horas e no cavalo aproximadamente 5 dias. Por sua vez, o óvulo tem curta viabilidade na maioria das espécies (8 a 12 horas).

IV.3.1. Ciclo espermatogênico.

Os ciclos espermatogênicos ou ciclos do epitélio seminífero são associações celulares da espermatogênese que aparecem ao longo dos túbulos seminíferos. Quando as associações celulares se repetem é estabelecido um ciclo seminífero. Podem existir várias associações celulares distintas dependendo da espécie. Assim, nos bovinos são 12 associações celulares, no homem 6 e no rato 14. Cada associação tem tipos distintos de células germinativas em vários estágios, determinados basicamente por diferenças morfológicas.

A duração de um ciclo seminífero é o tempo transcorrido entre aparecimentos sucessivos da mesma associação celular. No bovino, são necessários 4,5 ciclos seminíferos para obter a forma madura do espermatozóide. Como cada ciclo demora para ser completado 13,5 dias no touro, a espermatogênese nesta espécie dure 61 dias. Os diferentes ciclos que estão transcorrendo nos diferentes espaços do túbulo, são identificáveis como estágios sequenciais do ciclo, isto é, um espaço do túbulo com um estágio do ciclo é adjacente com os estados que o antecedem ou lhe seguem. Aquele espaço do túbulo que compreende uma sequência completa do ciclo é conhecido como “onda espermatogênica”. Em um só túbulo podem existir até 15 ondas espermatogênicas completas. A sequência da ordem dos estágios do ciclo pode ser quebrada por reversão, o que se conhece como “modulação”.

Os túbulos seminíferos possuem dois extremos que se abrem na rete testis e, por alguma razão não explicada, os sucessivos estágios do ciclo espermatogênico estão arranjados em ordem descendente ao longo do túbulo começando na rete testis. As duas ondas se encontram em um ponto chamado “sítio de reversão”.

IV.4. O espermatozóide.

No século XVII, Ham e Leeuwenhoek descreveram os espermatozóides, considerando-os como “animalículos” que possuíam todos os componentes de um ser adulto que só precisariam crescer durante a gestação. Spallanzani, no século XVIII, demonstrou que era necessária a união do espermatozóide com o óvulo para obter um novo ser. O nome de *espermatozóide* é atribuído a von Baer (1827).

O espermatozóide esta composto de 4 partes, quais sejam, a cabeça, o colo, a peça intermediária e a cauda. É uma célula especializada cuja única função é fertilizar o óvulo, para o qual utiliza os movimentos autônomos de sua cauda.

A cabeça do espermatozóide tem forma oval na maioria dos mamíferos e alongada nas aves, estando constituída quase em sua totalidade pelo núcleo, que contém metade do genoma de uma célula somática (n). A cabeça está rodeada por um complexo de membranas que inclui as membranas plasmática e do aparelho de Golgi, formando uma estrutura diferenciada conhecida como *acrossomo*, em cujo interior existem enzimas como a hialuronidase, a acrossina e outras hidrolases (neuraminidase, fosfatase ácida, fosfolipase A, arilsulfatase, β -N-acetilglucosaminidase). Estas enzimas hidrolisam os mucopolissacarídeos da zona pelúcida e o *cumulus oophorus* do óvulo no momento da fertilização, após da reação do acrossomo. O acrossomo cobre os 2/3 anteriores da cabeça do espermatozóide, enquanto que outra estrutura membranal, a cápsula pós-acrossômica, cobre o 1/3 posterior.

O colo do espermatozóide é a porção que une a cabeça e a peça intermediária. Contém a gota citoplasmática, escasso resíduo de citoplasma, e o centríolo proximal, considerado como o centro cinético do espermatozóide, isto é, a unidade que regula os movimentos autônomos.

A peça intermediária é a estrutura que garante a motilidade do espermatozóide graças aos filamentos de tubulina-dineína, proteínas

contráteis cuja disposição é similar à dos cílios e flagelos observada em alguns microorganismos, isto é, 2 microtúbulos centrais rodeados de 9 microtúbulos periféricos (estrutura 9+2). Os filamentos do espermatozóide, porém, possuem mais 9 fibras densas externas (estrutura 9+9+2). A porção filamentosa da peça intermediária e da cauda são conhecidas como *axonema*. A peça intermediária também possui abundantes mitocôndrias que garantem a produção de energia necessária para a contração do axonema. O centríolo distal forma o anel de Jensen, local que marca o limite da peça intermediária e a cauda.

A cauda do espermatozóide está composta de duas peças, a principal, que ocupa a maior parte da cauda, e a terminal, no extremo final. A peça principal possui filamentos em estrutura 9+2, os quais estão recobertos por uma bainha fibrosa, que confere estabilidade ao axonema da cauda. A peça terminal também possui os filamentos mas sem a bainha fibrosa, estando só recobertos pela membrana plasmática. Graças às contrações da peça intermediária e da cauda (aproximadamente 10 por segundo), o espermatozóide pode avançar progressivamente a uma velocidade de 100 $\mu\text{m/s}$.

IV.4.1. Metabolismo do espermatozóide.

O espermatozóide é a única célula do organismo que possui duas características especiais, quais sejam, a de ter capacidade de movimentos rápidos e de fertilizar. Para poder cumprir com estas funções, o espermatozóide deve ter características bioquímicas especiais.

A frutose é o principal açúcar do sêmen e o espermatozóide tem capacidade para realizar fructólise anaeróbica e produzir lactato e energia. O espermatozóide também aceita glicose como substrato energético, porém a frutose está em maior quantidade no sêmen (250 mg/dl, comparado com 10 mg/dl de glicose), provavelmente para evitar que outras células possam competir pelo substrato energético com os espermatozoides. A taxa de consumo de O_2 do espermatozóide aumenta quando entra em contato com os fluidos genitais femininos, os quais são ricos em bicarbonato. No espermatozóide aumenta a oxidação de lactato a piruvato e a entrada de acetil-CoA no ciclo de Krebs, para aumentar a produção de energia. A transferência de O_2 do sangue para o lúmen uterino é suficiente para criar uma tensão de O_2 que mantém o metabolismo aeróbico do espermatozóide, especialmente durante o estro.

A maior parte dos lipídios do espermatozóide são fosfolipídios, principalmente lecitina (fosfatidil-colina) e plasmalogênios como o fosfatidil-colina. Existe maior proporção de plasmalogênios no touro e no carneiro do que nas outras espécies. Quando há déficit dos substratos energéticos imediatos (frutose, lactato), os ácidos graxos dos plasmalogênios atuam como substratos da respiração do espermatozóide. Existem menos fosfolipídios no espermatozóide ejaculado do que no espermatozóide testicular, o que leva a crer que o conteúdo desses compostos diminui quando o espermatozóide passa da cabeça para a cauda do epidídimo, fato possivelmente relacionado com a maturação espermática.

Os fosfolipídios participam de vários eventos metabólicos do espermatozóide, tais como as mudanças químicas associadas com a maturação, o processo de capacitação espermática e a preservação da membrana plasmática, embora não se conheçam em muitos casos os mecanismos de ação. A suscetibilidade dos espermatozoides ao choque frio parece estar relacionada com a composição dos fosfolipídios. Assim, os espermatozoides de touro, carneiro e porco, são todos altamente sensíveis ao choque térmico. Estas espécies contêm fosfolipídios com baixa relação de ácidos graxos saturados/insaturados e com menor conteúdo de colesterol, portanto com a membrana plasmática menos fluida que em outras espécies menos vulneráveis a este respeito, como coelho, cão, galo e humano.

A diminuição da atividade espermática medida pela motilidade e o consumo de O_2 , parece estar associada a dois eventos: (a) hidrólise dos fosfolipídios com produção de liso-plasmalogênios, os quais são tóxicos para o espermatozóide, e (b) peroxidação dos fosfolipídios, produzindo ácidos graxos peroxidados, altamente espermicidas. A peroxidação é devida a um processo normal de envelhecimento, no qual ocorre danificação estrutural do acrossomo e vazamento de enzimas hidrolíticas.

As membranas do acrossomo, externa e interna, se fusionam em múltiplos pontos quando ocorre a reação do acrossomo, evento que acontece após a capacitação espermática. Na reação do acrossomo ocorre o aparecimento de uma camada de pequenas vesículas com dispersão da matriz acrossômica e exposição da membrana acrossômica interna. Várias das enzimas do acrossomo são proteases tipo tripsina

(serina-proteases) que clivam ligações peptídicas onde houver arginina ou lisina, sendo também inibidas pelos inibidores de tripsina.

As mudanças morfo-bioquímicas que ocorrem antes da reação do acrossomo e conferem maior motilidade ao espermatozóide, são consideradas como capacitação espermática. Este parece ser um processo de seleção dos melhores espermatozoides capazes de fertilizar o óvulo. A mudanças envolvem a capacidade respiratória, a motilidade e a composição da membrana do acrossomo. Durante o armazenamento dos espermatozoides no epidídimo, ocorre uma decapacitação, talvez mediada por inibidores enzimáticos, que mantêm os espermatozoides em estado “latente” até a ejaculação. Quando o espermatozóide entra em contato com as secreções do trato genital feminino, é ativado processo de capacitação, cuja duração varia conforme a espécie, sendo em média de 4 a 6 horas. Os estrógenos parecem estimular a capacitação espermática, enquanto que a progesterona a inibe.

O movimento flagelar constitui a maior demanda energética do espermatozóide, pois para a sua locomoção ele deve superar a ineficiência mecânica do flagelo, a resistência oferecida pelas secreções viscosas do trato e a resistência gerada pela aglomeração dos outros espermatozoides. O ATP gerado nas mitocôndrias da peça intermediária se difunde ao longo da cauda, mediante um tipo de difusão molecular. Os microtúbulos do axonema estão compostos pela tubulina, proteína dimérica de 110 kD com 2 subunidades, α e β , associadas a GTP e a dineína, proteína que constitui os braços das microfibrilas axonêmicas, com características de ATPase Ca-Mg-dependente. Existe também uma proteína que une os pares de microtúbulos do axonema, a nexina, cuja função não está completamente esclarecida. Os movimentos progressivos do

espermatozóide são de tipo ondulatório de trás para frente ao longo do flagelo empurrando o espermatozóide para adiante. Os movimentos correspondem a um deslocamento dos filamentos, isto é, as fibrilas do axonema não alteram seu comprimento, mas se deslocam umas sobre as outras, sem encurtamento. Durante os movimentos, os braços da dineína, em cada par de túbulos formam uma ponte transitória com o par adjacente, envolvendo sucessivas uniões e desuniões facilitadas pela hidrólise do ATP, similarmente ao que ocorre com a troponina na contração muscular.

Existe uma relação entre o nível de cAMP no espermatozóide e a motilidade, o que envolve vários eventos: (a) geração de cAMP a partir de ATP pela adenilciclase; (b) fosforilação de proteínas específicas na membrana plasmática (regulação da troca iônica) e nos microtúbulos (controle da função da tubulina); (c) transfosforilação entre o ATP livre e o GDP unido à tubulina; e (d) defosforilação do ATP para formar ADP, reação catalisada pela dineína ATPase. Em geral, os agentes que aumentam a motilidade do espermatozóide, aumentam os níveis de cAMP.

IV.5. Referências bibliográficas.

- De Kretser, D.M., Kerr, J.B. The cytology of testis. In: Knobil, E., Neill, J. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988. pp 837-932.
- Winter, S.J. Inhibin is released together with testosterone by humans testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70, 548-550. 1990.
- Dadoune, J.P., Demoulin, A. Structure and functions of the testis. In: *Reproduction in mammals and man*. Ed. by C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Paris: Ellipses. 1993.

V. ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA

V.1. Endocrinologia da puberdade.

A puberdade na fêmea pode representar tanto o primeiro cio, quanto a primeira ovulação, eventos que geralmente não chegam juntos. A rigor, a puberdade é definida como a época em que a fêmea está em capacidade fertilizante, o que compreende tanto o aspecto comportamental (cio) como de formação de gametas e de capacidade de manter e desenvolver o embrião e o feto até o parto. A primeira ovulação costuma ser “silenciosa”, isto é, sem sintomas de cio. Somente a segunda ou terceira ovulações vêm acompanhadas de sinais evidentes de estro.

O início da puberdade vem precedido por um pico de LH, seguido de uma pequena elevação da progesterona circulante. Um 2º pico de LH marca a apresentação da 1ª ovulação, que é silenciosa. É só no 3º pico de LH que se caracteriza a puberdade completa, ou seja, sintomas de cio junto com ovulação.

Durante o período da pré-puberdade ocorrem pulsos de LH com amplitude similar às observadas na puberdade, porém com frequência bem menor (2-3 h). Durante a puberdade ocorre uma pronunciada diminuição da sensibilidade de inibição dos esteróides às gonadotropinas, rompendo o forte *feedback* negativo entre estradiol e LH. Este é o fundamento da hipótese gonadostática para explicar o início da puberdade, a qual sugere que o eixo hipotálamo-pituitário-ovariano estaria já maduro desde antes da puberdade, porém sem funcionar de forma adulta devido ao mencionado efeito *feedback*. A hipótese gonadostática está sustentada nas seguintes considerações:

(a) O mecanismo de secreção de LH em resposta à ação estimulatória exógena de estradiol é observado desde antes da puberdade. Esta resposta aumenta com a idade, o que supõe que a falta de uma produção permanente de estradiol é o que impede uma secreção de LH no período da pré-puberdade;

(b) O ovário tem a capacidade de produzir níveis foliculares de estradiol em resposta a pulsos horários de LH desde antes da puberdade, o que é coerente com o fato de que o ovário possui folículos terciários, portanto está relativamente maduro desde antes da puberdade. Isto foi provado em ovelhas ao injetar PMSG/hCG na pré-puberdade obtendo indução da ovulação com formação de corpo lúteo. Portanto, a falta de produção de estradiol não seria devido à imaturidade do ovário, mas à falta de estímulo gonadotrópico;

(c) Existe potencial de produzir picos de LH com alta frequência desde antes da puberdade. Entretanto, a frequência é pouca, não por insuficiente desenvolvimento pituitário, mas porque o sistema é muito sensível à ação inibitória do estradiol;

(d) A inibição da secreção de LH em resposta a estradiol diminui no período da puberdade permitindo a secreção da gonadotropina e, conseqüentemente, estimulando o ovário para funcionar de forma adulta.

A inibição da secreção de LH por parte do estradiol antes da puberdade pode estar mediada por neurotransmissores como dopamina ou opióides. Essa inibição diminuiria quando se aproxima a puberdade. A progesterona de origem ovárica secretada antes da puberdade, embora em baixos níveis, pode também estar afetando o padrão de secreção de LH.

O mecanismo controlador da secreção de LH inclui um efeito *feedback* inibitório de asa curta sobre sua própria secreção determinado pela secreção pulsátil de GnRH hipotalâmico. Portanto, cada pulso de LH está associado com um pulso de GnRH. Assim, o hipotálamo pode ser visto como a via final que comanda os vários estágios da atividade reprodutiva. O ritmo gerador de pulsos de GnRH está afetado pelo estradiol de forma que durante períodos de alta sensibilidade *feedback*, a atividade do gerador está diminuída.

Depois da puberdade ocorrem várias mudanças no controle da secreção de LH. O sistema hipotálamo-hipofisiário diminui sua capacidade para ser inibido por estradiol. O novo esteróide inibitório passa a ser a progesterona e o novo mecanismo que determina os intervalos entre os ciclos ovulatórios é a duração do corpo lúteo. O aumento de progesterona durante a fase luteal diminui a frequência dos pulsos de LH, inibindo o desenvolvimento dos folículos pré-ovulatórios. Com a regressão do corpo lúteo e a queda nos níveis de progesterona, a frequência de pulsos de LH aumenta e começa a fase folicular.

A possível explicação dos cios silenciosos no início da puberdade está no fato de que a progesterona tem um papel importante como “iniciador” da ação estrogênica sobre o comportamento sexual. A sequência para a indução do estro seria a seguinte: aumento de progesterona, diminuição de progesterona e aumento de estradiol. Antes da 1ª ovulação não há formação de corpo lúteo e, portanto, não se

produz progesterona. A fase luteal subsequente é muito curta e não produz suficiente progesterona, de forma que o estradiol circulante não consegue fazer expressar o comportamento sexual do estro. Finalmente, após a exposição do cérebro a altas concentrações de progesterona durante a 1ª fase luteal normal, correspondente à 2ª ovulação, o cio pode ocorrer com os níveis de estradiol circulantes durante a 3ª fase folicular (3ª ovulação). Contudo, os primeiros cios podem ser curtos e pouco expressivos.

Na ovelha, a fertilidade pós-puberal é baixa, quando comparada com outras espécies devido a falhas na fertilização e alta mortalidade embrionária, eventos atribuídos à falta de sincronia estro-ovulação nos primeiros ciclos. A maioria das raças de ovelhas chegam à puberdade aos 6 meses de idade, mas a primeira gestação não acontece antes dos 8 a 10 meses de idade.

Em novilhas, a 1ª ovulação é seguida de um ciclo estral curto de 7 a 8 dias e a 2ª ovulação por um ciclo estral normal (21 dias). Existe um período de estabilização da função reprodutiva após o início da puberdade. A diferença entre puberdade e capacidade fertilizante se expressa nas diferenças de idade entre o início da puberdade em novilhas (14-17 meses) e a idade ao 1º serviço (24-28 meses). As raças mais pesadas, como o Pardo Suíço e as raças zebuínas são menos precoces que as raças mais leves, como a Jersey.

O nível nutricional baixo aumenta a idade na qual se atinge a puberdade, talvez por afetar a pulsatilidade do LH. Em novilhas, é desejável um peso de 350 kg para o 1º serviço, o que pode implicar em uma alimentação consistente com ganhos de 700 g/dia ou mais a fim de conseguir o primeiro parto com 2 anos de idade. O mecanismo do efeito retardante da subnutrição sobre a época da puberdade não está esclarecido. Muitas perguntas surgem, tais como quais seriam os sinais que inibem a atividade reprodutiva na subnutrição? quando e como podem ser monitorados? trata-se de hormônios metabólicos (insulina, GH, hormônios tireoidianos) ou de produtos de vias metabólicas? os sensores são hipotalâmicos ou extra-hipotalâmicos? como se comunicam esses sensores com o gerador de pulsos de GnRH para modificar sua atividade? De qualquer maneira, seja qual for o mecanismo, tais sinais devem provocar aumento da sensibilidade ao *feedback* negativo do estradiol causando inibição da secreção de GnRH e produzindo insuficiente LH para desenvolver os

folicúlos.

O ambiente social é outro fator que afeta o início da puberdade. Porcas em grupo acompanhadas de um cachão chegam à puberdade antes das que estão isoladas. O efeito é também observado em vacas, ovelhas e éguas. O mecanismo pode ser através dos feromônios da urina do macho que estimulariam o sistema *feedback* desencadeante da puberdade. Nas ovelhas, que sofrem estacionalidade reprodutiva, o mês de nascimento afeta a idade à puberdade, a qual só chega durante a época reprodutiva. As cordeiras nascidas no inverno ou na primavera atingirão a puberdade no mesmo período do ano, ou seja no outono-inverno. Contudo, as últimas serão mais novas e mais pesadas que as primeiras na época de acasalamento.

Finalmente, temperaturas extremas ou stress inespecífico também são causantes de retardo ao início da puberdade.

V.2. Órgãos reprodutivos da fêmea.

Os órgãos reprodutivos da fêmea compreendem os ovários, os ovidutos, o útero, a vagina e a genitália externa.

V.2.1. Os ovários como órgãos endócrinos.

As funções do ovário são produzir ovócitos (gametogênese) e produzir esteróides sexuais femininos (esteroidogênese). A unidade estrutural e funcional do ovário que garante essas funções é o folículo ovárico.

Os folículos contêm em seu interior as células germinativas ou ovócitos. Com cada ciclo estral, vários folículos crescem e se desenvolvem, sendo que somente um folículo, nas espécies uníparas, ou alguns deles, nas espécies múltiparas, serão ovulados. Os folículos são responsáveis pela produção de estrógenos e o corpo lúteo pela produção de progesterona. O ovário também é responsável pela produção de hormônios peptídicos, tais como a inibina, o fator de inibição de maturação do ovócito, a relaxina e a gonadocrinina.

Os dois ovários não funcionam de igual maneira. Em ovelhas e cabras, 55 a 60% das ovulações ocorrem no ovário direito, enquanto que na vaca este valor chega a 60-65%. Na égua e na porca, o ovário esquerdo é mais ativo, produzindo 55 a 60% dos ovócitos.

Diferentemente dos testículos, os ovários permanecem na cavidade abdominal. A forma do ovário varia em função da espécie e da fase do

ciclo estral. O ovário nas espécies multíparas como a porca, a cadela e a gata, tem vários folículos ou corpos lúteos grandes, dando a aparência de um cacho de uvas, enquanto que nas espécies uníparas, como a vaca, a ovelha e a égua, o ovário é ovóide.

A estrutura do ovário compreende um córtex externo e uma medula interna. No córtex está localizado o epitélio que recobre o ovário e contém uma camada única de células cubóides ou colunares baixas, chamada incorretamente de epitélio germinativo. Esta camada recobre a superfície do ovário completamente, exceto na égua na qual o epitélio se limita à fossa da ovulação. Abaixo do epitélio, está a túnica albugínea, tecido conectivo fibroso e depois a grande massa de folículos pré-formados durante a vida embrionária da fêmea, que se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento.

O epitélio superficial do ovário penetra na túnica albugínea formando cordões no córtex ovárico. Entretanto, esses cordões não contribuem à formação dos ovócitos, idéia que originou o nome de epitélio germinativo, embora contribuam com células da granulosa para os folículos em crescimento.

A medula do ovário está formada por tecido conectivo contendo os vasos sanguíneos e linfáticos e os nervos. É diferente do estroma ovárico, o qual tem células capazes de sofrer alterações durante a vida reprodutiva da fêmea, podendo originar as células da teca interna e as células intersticiais. Entremeadado com o estroma existem ainda fibras musculares lisas que são importantes na contração do folículo de De Graaf durante a ovulação.

O desenvolvimento dos folículos pode ser avaliado em função do seu tamanho, o número de camadas de células granulosas, o desenvolvimento das tecas, a posição do ovócito dentro do *cumulus oophorus* e o tamanho do antro folicular. Em função desses fatores, os folículos podem ser classificados em:

- (a) Folículos primários ou primordiais, que são ovócitos envolvidos por uma única camada de células foliculares planas ou cubóides, rodeadas de tecido intersticial;
- (b) Folículos secundários, nos quais o número de células foliculares aumenta e passam a ser chamadas de células granulosas, com aparência

irregular poliédrica;

(c) Folículos terciários ou vesiculares, quando as células granulosas começam a secretar o líquido folicular que se acumula nos espaços intercelulares, formando um antro. Nesse ponto, os capilares do estroma invadem a camada fibrosa de células que rodeia o folículo e formam uma camada vascular chamada de teca interna. Contudo, as células granulosas dentro do folículo estão privadas de suprimento sanguíneo pela membrana basal. A zona pelúcida que contorna o ovócito está rodeada por uma massa sólida de células granulosas radiais que formam a *corona radiata*.

(d) Folículo de De Graaf ou folículo maduro, no qual as células da granulosa aumentam de tamanho, o antro aumenta em função da maior secreção de líquido folicular e o ovócito é pressionado pelo líquido para um extremo do folículo. O ovócito agora é rodeado de mais células foliculares e forma o *cumulus oophorus*. As células deste folículo se diferenciam portanto nas células granulosas, sob a membrana basal, e as células das tecas interna e externa. O ovócito apresenta duas membranas distintas, a membrana vitelina ou membrana plasmática, e a zona pelúcida, membrana homogênea composta de proteínas suscetíveis de serem dissolvidas por enzimas proteolíticas.

V.2.2. Ovidutos.

Os ovidutos, em número par, estão suspensos pela mesosalpinge. O comprimento do oviduto varia nas diferentes espécies, sempre sofrendo diversos graus de circunvolução. Funcionalmente o oviduto pode ser dividido em 4 segmentos: (a) as fimbrias, (b) o infundíbulo ou abertura abdominal, próximo ao ovário, (c) a âmpula, porção mais dilatada que compreende cerca da metade do oviduto, e (d) o istmo, porção proximal que liga com o útero.

O oviduto é o local onde ocorre a fertilização das gametas. As fêmeas transportam os óvulos desde a superfície do ovário para o infundíbulo, ocorrendo a fertilização na âmpula, onde o zigoto sofre os primeiros estágios de clivagem. Os embriões ainda ficam por alguns dias no oviduto antes de chegarem ao útero para a sua implantação.

O epitélio e o fluido do oviduto confluem para garantir a função de transporte e sobrevivência dos gametas masculino e feminino. A mucosa do epitélio tubárico possui células ciliadas, cujos movimentos são afetados hormonalmente, sendo maior a atividade logo após a ovulação. O número de cílios, que é maior no infundíbulo, diminui no segmento entre a ampula e o istmo. Outro tipo de células chamadas de secretoras são mais abundantes nesse último segmento. Os cílios batem em direção ao útero e sua atividade, junto com as contrações tubáricas, mantém os óvulos no oviduto em permanente rotação, efeito necessário para a aproximação espermatozóide-óvulo e para impedir a implantação tubárica. A perda dos cílios pode ocorrer como consequência de infecções no trato genital, o que pode levar à acumulação de fluidos no oviduto e salpingite.

A atividade das células secretoras também está sob controle hormonal. A secreção é máxima na época da ovulação, enquanto que na fase luteínica ocorre armazenamento mas não secreção de substâncias. O fluido tubárico contém proteínas, a maioria extraídas do sangue mas algumas produzidas pelo próprio oviduto. Entre outras proteínas estão a transferrina e a pré-albumina.

O complexo padrão de contractilidade do oviduto está sobre controle hormonal. As fibras musculares lisas longitudinais e circulares presentes em sua parede possuem receptores para os esteróides ováricos e algumas prostaglandinas. A frequência e a amplitude das contrações variam com a fase do ciclo estral, de forma que antes da ovulação são suaves e com a ovulação tornam-se mais vigorosas. As prostaglandinas E_1 e E_2 causam aumento do tônus muscular das fibras longitudinais, enquanto que a prostaglandina $F_{2\alpha}$ tem efeito relaxante.

V.2.3. Útero.

Nas espécies domésticas, o útero está composto de dois cornos, um corpo e um cérvix. As proporções de cada parte, bem como a forma e a disposição variam em função da espécie (Tabela V-1). O útero é bicornual na porca e bipartido (septo separando os cornos) na vaca, na ovelha e na égua.

A parede interna uterina possui uma mucosa interna (endométrio) seguida de uma camada muscular (miométrio) e mais externamente uma camada peritoneal (perimétrio). Existem anastomoses entre os sistemas arteriais útero-ováricos, de forma que a artéria ovariana contribui ao suprimento uterino. Na vaca, a artéria uterina contribui ao suprimento ovárico ipsi-lateral.

As modificações morfo-bioquímicas do endométrio preparam o útero para receber o blastocisto. O endométrio é uma estrutura glandular e conectiva. A sua espessura e vascularização variam com o ciclo estral e a gestação, sob influência hormonal. Existem algumas células ciliadas no epitélio uterino, porém em menor número que no oviduto.

A superfície interna do endométrio dos ruminantes apresenta projeções não glandulares chamadas carúnculas, com tecido conectivo rico em vasos sanguíneos. Na vaca são encontradas de 70 a 120 carúnculas de 15 mm de diâmetro, que durante a gestação podem crescer até atingir 10 cm de diâmetro. Na gestação, inúmeras vilosidades de córion placentário (cotilédones) invadem as carúnculas através de criptas formadas no tecido caruncular. O conjunto de carúnculas e cotilédones é conhecido como placentoma.

As glândulas endometriais são de epitélio simples, formando ramificações delineadas por epitélio tubular que se abre no lúmen uterino. O crescimento e secreção das glândulas

Tabela V-1. Comprimento (cm) de segmentos do trato genital feminino em algumas espécies domésticas.

Segmento	Vaca	Ovelha	Porca	Égua
Corno uterino	35-40	10-12	40-65	15-25
Corpo uterino	2-4	1-2	5	15-20
Cérvix uterino	8-10	4-10	10	7-8
Diâmetro do cérvix	3-4	2-3	2-3	3,5-4
Vagina	25-30	10-14	10-15	20-35
Vestíbulo	10-12	2,5-3	6-8	10-12

endometriais são estimuladas pela progesterona. Na época do cio, as glândulas são baixas, cubóides e com pouca secreção, enquanto que na fase luteal são altas e numerosas, com abundante secreção. As glândulas estão distribuídas por todo o endométrio, exceto nas carúnculas, sendo maior seu número nos cornos uterinos em relação com o corpo uterino.

Na vaca pode acontecer uma pronunciada dilatação capilar do endométrio durante o metaestro, às vezes com algum sangramento, porém sem desprendimento do epitélio endometrial, como é o caso dos primatas, nos quais o sangramento é profuso. O volume e a composição bioquímica do fluido uterino mostram variações durante o ciclo estral. Na ovelha ocorre maior secreção no útero que no oviduto durante o cio, enquanto que na fase luteínica a situação se inverte.

Entre os componentes do fluido uterino estão diferentes tipos de proteínas próprias e, principalmente, de origem sanguínea. A sua composição varia com a fase do ciclo. A função do fluido uterino é dupla: ele garante ambiente favorável para a capacitação espermática ao tempo que fornece nutrientes para o desenvolvimento do embrião até a sua implantação no endométrio, o que acontece depois de 30 dias, época em que ocorre grande diferenciação embrionária.

O crescimento do útero e o aumento nas secreções e no metabolismo uterinos são estimulados por estrógenos, ocorrendo também hiperemia, bem como aumento da glicólise e da captação de aminoácidos. Os efeitos da progesterona no útero estão mais relacionados com o aumento da síntese de ácidos nucleicos e proteínas.

O miométrio possui dois estratos musculares lisos, um circular interno mais espesso e outro longitudinal externo mais fino. Contém também uma camada vascular e de tecido conectivo. As contrações do miométrio durante o cio são direcionadas para o oviduto, desde o corpo uterino, enquanto que no metaestro as contrações se originam na junção útero-tubárica, movimentando-se em direção ao cérvix. O estrógeno é responsável pelas contrações do miométrio no início do cio. Após a ovulação e antes do blastocisto ou o óvulo chegarem no útero, ocorre aquiescência do miométrio, permanecendo assim durante a gestação ou durante a fase luteal.

As funções do útero podem ser resumidas

assim:

(a) Transporte e capacitação dos espermatozoides durante seu percurso até o oviduto preparando-os para a fertilização, mediante a contração do miométrio e as secreções uterinas;

(b) Controle da função luteal, mediante mecanismos luteolíticos causados pela prostaglandina $F_{2\alpha}$, produzida pelas células endometriais e transportada pela veia uterina, passando por um trajeto veno-arterial que envolve a artéria ovárica, para o corpo lúteo ipsi-lateral onde provoca a regressão luteal;

(3) Favorecimento do desenvolvimento inicial do embrião, a sua implantação e o crescimento do feto durante a gestação.

No útero gestante, vários mecanismos confluem para produzir um efeito anti-luteolítico e evitar que o corpo lúteo regreda. A utilização terapêutica da $PGF_{2\alpha}$ causa encurtamento da fase luteal do ciclo e indução do estro em 48 a 72 h após administração parenteral. A utilização de dispositivos intra-uterinos (DIUs) como elementos anticoncepcionais está fundamentada em que corpos estranhos no útero causam duplo efeito de regressão precoce do corpo lúteo e inibição do transporte espermático e da implantação.

V.2.4. Cérvix.

O cérvix é uma parte do útero que se projeta caudalmente na vagina. Possui uma espessa parede com luz muito estreita. Em geral, tem proeminências que nos ruminantes têm forma transversa com saliências fixas chamadas anéis (4-5). Na porca, os anéis se dispõem em forma de saca-rolha, adaptando-se à morfologia do pênis do varrão. Na égua, o cérvix tem dobras ou pregas que se projetam para dentro da vagina. Normalmente o cérvix permanece fechado, exceto no cio e no parto.

O cérvix secreta um muco viscoso que contém mucina (glicoproteínas) além de enzimas específicas como glucuronidase, amilase, fosforilase, esterase e fosfatases. O muco cervical pode acumular fluidos e restos celulares de todo o trato genital. O cérvix não possui glândulas.

Dois tipos de células são diferenciadas no epitélio do cérvix, as ciliadas e secretoras não ciliadas. A mucosa forma inúmeras criptas primárias e secundárias que aumentam a superfície secretora e dão aparência de enmaranhado ao muco. As criptas são mais desenvolvidas na vaca que em outras espécies. O muco apresenta cristalização em forma de

samambaia, particularmente nos períodos de estro e proestro, sendo mais evidente na vaca. A forma dos cristais é devida ao formato altamente ramificado da mucosa cervical, unido à composição específica do muco na época do cio, particularmente na proporção de cálcio e outros minerais. A secreção do muco cervical é estimulada pelos estrógenos e inibida pela progesterona. As mudanças do muco cervical durante o estro tem como função permitir a penetração dos espermatozoides. No cio ocorre aumento na quantidade e na cristalização do cio, bem como aumento do pH e diminuição da viscosidade e do conteúdo celular. Na fase luteal, as características se invertem.

O tamanho do cérvix aumenta com a gestação e com o número de partos. Durante a gestação o muco cervical é muito viscoso, espesso e não cristaliza, servindo como barreira contra o trânsito de espermatozoides e possíveis infecções. No parto, o tampão fica liquefato e o cérvix se dilata para permitir a passagem do feto.

As funções do cérvix podem ser resumidas a seguir em:

- (a) Transporte espermático mediante o muco cervical para o interior do útero; o muco guia os espermatozoides ao longo de “linhas de força”;
- (b) Reservatório de espermatozoides nas criptas cervicais;
- (c) Participação na seleção dos espermatozoides;
- (d) Proteção do útero contra infecções.

V.2.5. Vagina.

A vagina possui uma camada muscular pouco desenvolvida e o epitélio apresenta células escamosas, estratificadas e sem glândulas. A morfologia do epitélio varia durante o ciclo estral por influência dos hormônios sexuais, ocorrendo crescimento epitelial durante o estro com descamação no metaestro e diminuição da altura celular e presença de leucócitos durante o diestro. Na vaca, as mudanças do epitélio vaginal são pouco aparentes devido talvez aos baixos níveis de estrógenos circulantes (10-20 pM). Na cadela e os roedores as mudanças no epitélio vaginal são marcantes e são utilizadas para diagnosticar o estado reprodutivo da fêmea.

A vaca, diferentemente de outras espécies, possui glândulas na porção cranial da vagina próxima ao cérvix. Embora sem glândulas, a vagina secreta transudatos que se misturam ao muco cervical e às secreções endometriais. Durante o cio, aumenta a vascularização das paredes vaginais e o fluido vaginal se torna mais

fino. Nesta época, um odor específico no trato genital das fêmeas pode estar relacionado com a secreção de feromônios.

As funções da vagina podem ser resumidas em:

- (a) Órgão copulatório, que serve como depósito de sêmen;
- (b) Proteção dos espermatozoides durante seu transporte ao cérvix; para tanto, como o pH ácido da vagina não é favorável aos espermatozoides, é produzido um sistema tampão por interação do muco cervical, o plasma seminal e o próprio fluido vaginal;
- (c) Proteção contra infecções graças a seu meio bioquímico e microbiológico; durante a fase luteal aparecem células plasmáticas em maior número que produzem IgA e IgG;
- (d) Excreção das secreções cervicais, endometriais e tubáricas;
- (e) Parte do canal do parto.

V.2.6. Genitália externa

Constituída pelo vestíbulo, os lábios maiores e menores e o clitóris. O início do vestíbulo é no orifício uretral externo, onde em muitas espécies está localizado o hímen. Existem algumas glândulas vestibulares, como as glândulas de Bartholin, que durante o cio têm uma secreção viscosa, bem como outras glândulas tubulares e sebáceas. Os lábios estão compostos de tecido elástico com depósitos de gordura e estrutura externa similar à pele. O clitóris, estrutura equivalente ao pênis, aparece na comissura ventral do vestíbulo, estando mais desenvolvido na égua e na porca que nos ruminantes. Está composto de tecido erétil, coberto por tecido escamoso estratificado suprido de terminações nervosas.

V.3. Ciclo ovárico.

O ovário, similarmente à gônada masculina tem duas funções, atuando como órgão endócrino, para produzir os esteróides sexuais estrógenos e progesterona, bem como alguns hormônios protéicos, e também produz de forma cíclica os gametas femininos os quais são formados de maneira similar em todos os animais domésticos.

A unidade funcional do ovário que permite as funções de gametogênese e esteroidogênese é o folículo ovárico. Diferentemente do macho, os processos reprodutivos da fêmea são cíclicos e biologicamente mais complexos, de forma que são liberados muito menos gametas em cada

ovulação, comparado com o número de gametas que libera o macho em cada ejaculação. Quando termina a participação reprodutiva do macho com o depósito de sêmen nos genitais da fêmea, a participação desta apenas começa para contribuir com a gestação e o desenvolvimento do feto, eventos bastante desgastantes e demandantes de energia. Depois, contribui com o parto e com a amamentação do recém-nascido.

Durante a vida da fêmea são observados vários tipos de folículos:

- (a) Folículos primários ou primordiais, consistentes em ovócitos rodeados por uma camada única de células epiteliais da granulosa; nesta etapa não há células da teca e seu desenvolvimento total se alcança com o nascimento;
- (b) Folículos em crescimento, rodeados por duas ou mais camadas de células, porém sem antro ou cavidade; todas as células da granulosa estão localizadas na lâmina basal do folículo e em volta do ovócito; nesse estágio pode ser vista a zona pelúcida que rodeia o ovócito;
- (c) Folículos de Graaf ou vesiculares, nos quais é observado o antro com facilidade; o folículo sobressai da superfície do ovário e na medida em que fica maior, a camada granulosa se iguala, exceto no *cumulus oophorus*, onde se localiza o ovócito em volta de um “ninho” de células da granulosa.

O diâmetro do ovócito da vaca está em torno de 80 a 120 μm e está rodeado da zona pelúcida. Duas camadas de células são diferenciadas, as células da teca interna e as da teca externa. As células da teca externa são de tipo mióide com fibrócitos, contendo actina e miosina e participam da contractilidade do folículo no momento da ovulação. As células da teca interna são fibrócitos e células epitelióides que se diferenciam na medida em que amadurece o folículo. Na teca interna existe uma rede vascular capilar. As células da granulosa, mais internas no folículo, estão separadas das células tecaais por uma membrana basal, ficando em contato com o ovócito e formando o *cumulus oophorus*. O fluido folicular enche o antro e desloca excentricamente o ovócito;

- (d) Folículos atrésicos, que são os folículos que não ovulam e sofrem degeneração e atresia; a atresia pode ocorrer em qualquer etapa do desenvolvimento folicular. São desconhecidos os mecanismos que controlam a atresia folicular, mas é possível a participação dos andrógenos ováricos nesse processo. Calcula-se que em 10

anos de vida, uma vaca que produza 1 bezerro/ano deve haver ovulado 30 a 50 óvulos. O resto deles sofre atresia.

O número de folículos desenvolvidos em cada ciclo estral depende da espécie e de fatores nutricionais, ambientais e genéticos. Nas espécies uníparas, como a vaca ou a égua, existe um folículo que se desenvolve mais rapidamente que os outros para obter uma única ovulação. Os folículos restantes chegam até a fase terciária e depois regredem para sofrer atresia. Já em espécies múltiparas, como a porca ou a cadela, 10-25 folículos amadurecem em cada ciclo estral. A ovelha é uma espécie intermediária em que 1 a 3 folículos podem amadurecer, dependendo da raça, a idade, a alimentação e a época do ano. Nas porcas há um grande efeito nutricional, especialmente de nutrientes energéticos, sobre o nível de ovulação. Em esta espécie costuma ser realizada uma suplementação energética nos 5-6 dias prévios à ovulação (*flushing*).

V.3.1. Ovogênese.

O número de ovócitos com os quais a fêmea nasce depende do nível de FSH embrionário. A ovogênese ou transformação das ovogônias em ovócitos, é completada antes do nascimento ou pouco tempo depois em todos os mamíferos domésticos (Tabela V-2). As ovogônias se multiplicam por mitose depois da diferenciação sexual durante a fase embrionária-fetal até formar os ovócitos primários, que estão destinados a sofrer divisão por meiose. Depois do nascimento, os ovócitos crescem ampliando seu citoplasma e desenvolvendo uma membrana, a zona pelúcida, simultaneamente com a proliferação de células epiteliais adjacentes, as futuras células granulosas.

Atingida a puberdade, os folículos se desenvolvem para a fase de folículo com antro e o ovócito atinge a maturidade. O núcleo, que havia entrado na prófase da 1ª divisão meiótica se prepara para sofrer divisões redutivas. No momento de finalizar a prófase I, o tecido conectivo que rodeia o folículo é organizado nas tecas, uma externa de células de estroma e uma interna de células pseudoepiteliais e capilares. Esta última contribui na secreção de esteróides. O crescimento continua, o antro cresce e as células epiteliais em volta do ovócito aumentam. As células epiteliais que rodeiam o antro formam as células granulosas que, junto com as células da teca interna, secretam o fluido folicular rico em estrógenos.

Antes da ovulação, o ovócito primário ($2n$) entra na 2ª divisão meiótica. Na 1ª divisão as células filhas com conteúdo cromossômico $2n$ estão representadas pelos ovócitos secundários e os primeiros corpos polares com pouco citoplasma. A 2ª divisão só é completada após a fertilização e os ovócitos secundários formam o óvulo com conteúdo cromossômico n e o 2º corpo polar. Os corpos polares ficam no espaço perivitelino, entre o óvulo e a zona pelúcida, e mais tarde sofrem degeneração.

O processo de ovogênese é diferente da espermatogênese no sentido de que no primeiro um ovócito primário origina um óvulo e dois corpos polares, enquanto que no segundo um espermatócito primário origina 4 espermatozoides.

Os folículos atrésicos podem chegar no máximo até metáfase II e degeneram. A manutenção do ovócito em estágio dictiado (prófase I) ocorre pela inibição da meiose por um fator inibitório produzido nas células granulosas. As gonadotropinas suprimem a produção desse fator inibitório da meiose.

O número de folículos diminui depois do nascimento permanecendo os ovócitos no estado de prófase da primeira meiose (fase de paquíteno) por longo tempo (anos). O número médio de folículos nas vacas é de 150.000 no momento do nascimento. Este número diminui até a puberdade, de forma que a vaca adulta tem cerca de 60.000 folículos. No transcurso da vida, o número de folículos vai diminuindo ao ponto que em uma vaca velha podem ser encontrados cerca

de 1.000 folículos.

O ovário da ovelha pode conter até 86.000 folículos primordiais. Os ovários da cadela recém nascida contêm cerca de 700.000 ovócitos, os quais diminuem para 250.000 na puberdade, para 33.000 aos 5 anos de idade e para 500 aos 10 anos. No ovário da gata se desenvolvem folículos em cada estação reprodutiva, os quais secretam estrógenos, mas a ovulação só ocorre se houver acasalamento 24 a 50 h depois, portanto o número de folículos que ovulam na gata é dependente do número de acasalamentos.

O número de folículos viáveis e portanto a fertilidade dependem estreitamente do número inicial de células primordiais, ou seja do nível de FSH materno na época de formação do embrião. O crescimento do folículo até o estágio de formação de antro independe das gonadotropinas. Entretanto, o folículo vesicular cresce e se desenvolve sob a influência de LH e de FSH. O FSH é o principal responsável pela formação do antro, estimulando a mitose das células granulosas e a secreção de fluido folicular. O FSH induz a sensibilidade das células granulosas para o LH, mediante a estimulação da síntese de receptores para LH, o que prepara a luteinização das células granulosas em resposta à onda pré-ovulatória de LH. O próprio folículo maduro é responsável pela ovulação pois secreta estradiol, hormônio que provoca o pico pré-ovulatório de LH, o que resulta na ovulação e no desenvolvimento do corpo lúteo.

Tabela V-2. Estágios de desenvolvimento na ovogênese.

Fase	Características	Período
Mitose	Migração de células germinativas à área genital ($2n$)	5-35 dias do embrião
	Ovogônia (multiplicação, $2n$)	45-110 dias do embrião
Primeira meiose	Ovócito primário ($4n$): • profase I: folículo primário • metáfase I: folículo com antro • anáfase I: folículo maduro • telófase I	nascimento a adulto puberdade: estro
Segunda meiose	Ovócito secundário ($2n$): • profase II: extrusão do 1º corpo polar ($2n$) • anáfase II • telófase II: óvulo (n), Extrusão do 2º corpo polar (n) União de pronúcleos ($2n$)	ovulação fertilização embrião

V.3.2. Ovulação.

A ovulação ocorre, na maioria das espécies, durante o estro, geralmente no final, exceto na cadela que ocorre no 3º a 4º dia do estro (o estro dura 10 dias na cadela). Na vaca, a ovulação ocorre 12 a 16 h depois do início do estro. Casos de ovulação no diestro e durante a gestação são observados em éguas e, raramente, em vacas.

Os fatores que determinam o folículo que vai ovular são desconhecidos. O folículo eleito recebe maior fluxo capilar, efeito influenciado pelo LH. A ovulação pode ocorrer em qualquer ponto do ovário, exceto na égua que ocorre numa área conhecida como "fossa da ovulação", onde fica concentrado o epitélio germinativo. A ovulação ocorre aleatoriamente em qualquer um dos ovários, mas geralmente ocorre de forma alternada.

Na medida que a ovulação se aproxima, o folículo ovulatório é projetado na superfície do ovário aumentando a sua vascularização, exceto numa área central onde ocorrerá a ruptura do folículo. A dissociação das células do *cumulus oophorus* liberta o ovócito e a meiose recomeça cerca de 3 horas após a onda de LH, terminando 1 hora antes da ovulação, quando o 1º corpo polar é extrudido e o ovócito secundário é formado.

As células do *cumulus* secretam glicoproteínas que rodeiam o ovócito e a *corona radiata*. Ocorrendo a ruptura, a massa viscosa facilita a captação do ovócito pelas fimbrias infundibulares do oviduto. As células granulosas dissociadas do folículo sofrem invasão das células da teca interna e dos vasos sanguíneos.

A ação do LH e do FSH é responsável pela dissociação das células do *cumulus*, ao mesmo tempo que estimula a secreção de esteróides ováricos. A progesterona estimula a ação da enzima collagenase na parede folicular e o estradiol aumenta o edema da teca. As prostaglandinas, secretadas pelas células granulosas, também têm efeito sobre a dissolução da parede folicular participando da ruptura do folículo ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e da transformação das células granulosas em células luteínicas (PGE_2). Também ativam o plasminogênio para dar plasmina, a qual está envolvida na migração celular (PGE_2) e estimulam as contrações ovarianas, as quais facilitam a ruptura folicular ($\text{PGF}_{2\alpha}$).

V.3.3. Ciclo estral.

O ciclo estral é definido como a sequência

de eventos endócrinos, morfológicos e comportamentais que ocorrem entre dois estros sucessivos. O estro ou cio é definido como período de receptividade sexual da fêmea e sua duração varia dependendo da espécie desde horas até dias (Tabela V-3). O dia de início do estro costuma ser designado como o dia 0 do ciclo. Conforme a periodicidade dos ciclos estrais, as espécies se classificam em monoéstricas, como é o caso da cadela e da gata, que apresentam dois ciclos/ano e em poliéstricas, como a vaca e a porca, que apresentam ciclos durante o ano todo ou durante a estação reprodutiva nos países que possuem estações definidas, caso da ovelha, da cabra e da égua. Nas regiões tropicais as espécies estacionais se tornam contínuas.

O ciclo estral dura, em média, 21 dias na vaca, égua, cabra e porca e 17 dias na ovelha. A cadela, que tem dois ciclos/ano, tem uma fase luteal que dura 75 dias e longos períodos de anestro após a regressão do corpo lúteo de 4 a 5 meses. A gata e a coelha têm ovulação induzida, isto é, somente ocorre ovulação e portanto formação de corpo lúteo, se houver acasalamento. Se não houver, os folículos se desenvolvem por 15 a 20 dias e depois regredem em 5-7 dias. Se ocorrer acasalamento não fértil se desenvolve um corpo lúteo que pode durar 35 dias (pseudoprenhez).

O ciclo estral resulta da interação coordenada de 4 tecidos: sistema nervoso central, hipotálamo-hipófise, ovário e útero. A comunicação entre esses órgãos ocorre principalmente mediante 6 hormônios: GnRH (do hipotálamo), LH e FSH (da hipófise), estradiol e progesterona (do ovário) e prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ (do útero).

Três esteróides são produzidos pelo ovário durante o ciclo estral: progesterona, estradiol e androstenediona. A progesterona é secretada exclusivamente pelo corpo lúteo, o estradiol pelos folículos e a androstenediona é produzida pelo corpo lúteo, pelos folículos e pelo estroma ovárico.

Na década de 1950s, Edgar e Ronaldson, usando métodos fluorométricos, registraram a tendência dos níveis de progesterona ovárica durante o ciclo estral da ovelha. Ocorre aumento gradual do dia 1 ao dia 7, concentração constante até o dia 14 e queda precipitada após o dia 14. Naquela época a técnica não era suficientemente sensível para detectar progesterona plasmática, o que somente aconteceu com o radioimunoanálise (RIA) na década de 1960s.

O crescimento e a maturação dos folículos ováricos nos mamíferos dependem da ação sinérgica das gonadotropinas hipofisiárias FSH e LH. Ambas gonadotropinas participam também da síntese de estrógenos. O FSH da pituitária anterior estimula o desenvolvimento dos folículos vesiculares e estimula as células da granulosa para produzir estradiol, o qual se acumula no líquido folicular e sai para a corrente circulatória.

V.3.3.1. Estro

O comportamento estral está caracterizado pela atitude da fêmea de ficar estática quando é montada pelo macho. Durante esse período podem ocorrer várias cópulas. A rigor, essa atitude é o final de uma sequência de interações comportamentais entre o macho e a fêmea. O período do estro dura de 8 a 18 h na vaca e 24 a 48 h na ovelha, mas ocorrem variações importantes em função da raça; por exemplo, nas raças zebuínas, o estro é mais curto e menos notório, acontecendo principalmente nas horas da noite ou da madrugada. Nas raças de ovelhas com maior taxa de ovulação, a duração do estro pode ser 50% maior que nas raças com menores taxas de ovulação.

A presença contínua do macho causa terminação mais rápida do estro, em vez de prolongá-lo, efeito não ligado ao fato de haver cópula. A apresentação do estro está acoplada com a onda pré-ovulatória de LH, de forma que a ovulação ocorre, em média, 24 a 48 h após iniciado o cio. Tanto a progesterona como o estradiol são requeridos para induzir o cio. O pré-tratamento com progesterona, que sob condições fisiológicas, corresponde à progesterona da fase luteal anterior, reduz não somente a quantidade de estradiol requerida para induzir o comportamento estral, como a latência entre uma administração de estradiol e o início do cio. As baixas concentrações de estradiol nos ruminantes durante o estro (3-10 pg/ml) são suficientes para induzir o cio. Entretanto, se a progesterona e o estradiol estiverem simultaneamente elevadas, ocorre bloqueio do cio. A sequência da ação esteroideal para a indução do cio é, portanto, um período de elevada concentração de progesterona (12 dias) seguido de queda de progesterona e elevação de estradiol por 1-2 dias.

A despeito da informação sobre o controle hormonal do comportamento estral, são desconhecidos os substratos neurais responsáveis por este comportamento. É sabido que a área

posterior ao quiasma óptico é crítica para o comportamento do cio.

V.3.3.2. Fase folicular.

A fase folicular costuma ser definida como aquele período desde a regressão do corpo lúteo até a ovulação. Dura, em média, 2 dias na ovelha e 4-5 dias na vaca, na porca e na égua. Entretanto, durante a fase luteal destas espécies existe crescimento de folículos apesar da natureza inibitória da progesterona, principal hormônio secretado pelo corpo lúteo durante esta fase, de forma que as fases luteal e folicular se sobrepõem. Nesses animais ocorre uma segunda onda de FSH 20-30 horas após a onda pré-ovulatória de LH e FSH. A onda pós-ovulatória de FSH desenvolve e seleciona os folículos a crescer e ovular no ciclo posterior. Em ovelhas, a magnitude da onda de FSH pós-ovulatória está relacionada com o número de folículos com antro presentes no ciclo seguinte. Está estimado que o período de desenvolvimento de folículos com antro até a ovulação na ovelha seja de 17 a 34 dias.

Nos primatas não ocorre sobreposição das fases folicular e luteal, estando as fases bem definidas. Nesses animais o FSH aumenta no final da fase luteínica, durante a menstruação, provocando o desenvolvimento de folículos, um dos quais deverá ovular duas semanas mais tarde e o resto sofrerá atresia.

Apesar do crescimento folicular durante a fase luteal nos grandes animais, a ovulação somente ocorre na fase folicular. Na égua ocasionalmente ocorrem ovulações na fase luteal. Quando o corpo lúteo regride, os folículos crescem rapidamente por estímulo das gonadotropinas, as quais são secretadas na hipófise depois que deixou de acontecer a inibição exercida pela progesterona.

O estradiol produz as mudanças típicas do estro no trato genital e no comportamento permitindo a receptividade sexual. Os estrógenos também melhoram o efeito estimulador do FSH e provocam a liberação de FSH/LH, necessária para a ovulação. Os níveis elevados de estrógenos inibem a liberação de FSH e estimulam a liberação de LH. Níveis baixos de estrógenos, junto com níveis elevados de progesterona, inibem a liberação das duas gonadotropinas. Na maioria das espécies, o pico pré-ovulatório de gonadotropinas ocorre aproximadamente 24 h antes da ovulação e geralmente é de curta duração (8-10 h na vaca).

Na égua, que constitui uma exceção, se liberam grandes quantidades de LH durante 8-9 dias ocorrendo a ovulação no terceiro dia do estro.

A concentração periférica de estradiol na vaca e na ovelha é muito baixa (1-10 pg/ml), difícil de detectar. Contudo, são níveis suficientes para provocar todos os efeitos fisiológicos mencionados. O maior aumento de estradiol ocorre durante a fase folicular (2-3 dias), com pico no estro. O estradiol começa a aumentar como consequência da queda da progesterona após a luteólise, tendo incrementos de 5 a 10 vezes em 2 a 3 dias. A maior parte desse estradiol provém do folículo destinado a ovular. Alguns trabalhos mencionam picos secundários de estradiol, fora do estro, no 4º dia do ciclo. De fato ocorre alguma secreção de estradiol durante a fase luteal, porém a concentrações muito baixas e sem padrão aparente. A androstenediona tem uma secreção paralela com o estradiol.

As mudanças nas concentrações de LH são os principais determinantes da secreção de estradiol no folículo pré-ovulatório. Ao longo da fase folicular, as concentrações de LH são paralelas com as de estradiol, ao passo que os níveis de FSH são constantes ou podem até diminuir nesse período. Na ovelha, é considerado que o FSH tenha um papel mais permissivo, enquanto que o LH é determinante na secreção de estradiol. Portanto, a hipótese mais aceita é que o aumento na secreção episódica de LH após a luteólise, seja a causa do aumento do estradiol pré-ovulatório.

Além do LH e o FSH, a progesterona pode modular a secreção de estradiol. Primeiro, porque inibindo a secreção tônica de LH, a progesterona indiretamente inibe a secreção de estradiol. Segundo, a progesterona influi diretamente na resposta do folículo ao LH, de forma que na fase

luteal, a secreção de estradiol é bem menor que na fase folicular.

Existem receptores nas células da teca interna e da granulosa que controlam a ação das gonadotropinas. As ações do FSH estão restritas às células da granulosa enquanto que a LH possui receptores nos dois tipos de células foliculares, bem como nas células intersticiais e nas células do corpo lúteo. As duas gonadotropinas atuam através da ativação da enzima adenilciclase na membrana plasmática, a qual forma cAMP a partir de ATP. A ação do cAMP promove as mudanças metabólicas que caracterizam a ação gonadotrópica, normalmente através da fosforilação de proteína-quinases. O FSH estimula a atividade do complexo aromatase para produzir estradiol a partir de andrógenos. Entretanto, devido à limitação das células da granulosa na quantidade de andrógenos, pois têm baixos níveis das enzimas que sintetizam andrógenos (17-hidroxilases e $C_{17,20}$ -liases) estes devem ser fornecidos pelas células da teca interna, graças à estimulação do LH. A ação do LH, considerado o primeiro fator regulador da esteroidogênese, sobre as células da teca interna, junto com a ação do FSH sobre as células da granulosa, configuram a teoria “duas células-duas gonadotropinas” da secreção de estrógenos.

V.3.3.3. Fase luteal

O corpo lúteo maduro, característico da fase luteal, é arredondado com um diâmetro de 20 a 25 mm e 5 g de peso na vaca. Metade da massa do corpo lúteo pode sobressair da superfície do ovário, sendo mais notório em vacas *Bos taurus* do que em *Bos indicus*. A cor amarela do corpo lúteo é devida aos carotenos. O ovário da égua possui uma fossa da ovulação, onde são liberados os óvulos e seu corpo lúteo

Tabela V-3. Padrões reprodutivos de fêmeas de várias espécies domésticas.

Espécie	Puberdade (meses)	Duração do ciclo estral (dias)	Duração do estro (dias)	Duração da gestação (dias)
Vaca	12	21	0,5	280
Ovelha	6-8	17	1,5	150
Cabra	4-8	21	1-3	150
Égua	18-20	22	7	330
Porca	5-10	21	2-3	114
Cadela	6-12	2-3 ciclos/ano	7-9	58-63
Gata	7-12	2-3 ciclos/ano	4-10	63

não sobressai muito do ovário.

O corpo lúteo é um órgão endócrino temporário que funciona durante o diestro nos animais ciclantes ou durante a gestação. O corpo lúteo secreta progesterona, hormônio responsável pela preparação do útero para a manutenção da gestação. Os níveis de progesterona plasmática são virtualmente indetectáveis logo depois da ovulação, mas começam a aumentar gradualmente a partir do 3º dia do ciclo mantendo-se elevados durante 12 dias na maioria das espécies (Tabela V-4). Os altos níveis de progesterona mantêm baixos os níveis de gonadotropinas. Acabando a vida do corpo lúteo, os níveis de progesterona voltam a cair a níveis indetectáveis. Em ovelhas, a concentração máxima de progesterona costuma ser maior nas raças com maiores taxas ovulatórias. A secreção da progesterona é episódica sem correlação com outros hormônios, diferentemente do estradiol cujos aumentos são precedidos de pulsos de LH.

Os eventos hormonais que ocorrem em um ciclo estral influem na duração da fase luteal do ciclo seguinte. Assim, a elevada concentração de progesterona antes da fase folicular e da ovulação, garante a normal duração da fase luteal seguinte. O mecanismo para que ocorra este evento não está claro, porém parece que a progesterona sincroniza o desenvolvimento folicular com a onda de LH, de forma que somente os folículos maduros podem ovular.

Depois da ovulação, o corpo lúteo é formado a partir das células granulosas do folículo ovulado por efeito das gonadotropinas. Na maioria das espécies atua o LH, mas em algumas como na ovelha e nos roedores, pode também participar a prolactina. As células da teca interna e da granulosa sofrem mudanças morfo-bioquímicas no processo chamado luteinização, como consequência do aumento de LH no período pré-ovulatório. Se não houver gestação, o corpo lúteo regride e um novo ciclo estral recomeça.

Antes da ovulação ocorre hipertrofia das células granulosas e ativação nuclear. Depois da ovulação, a membrana basal é dissolvida e os vasos sanguíneos da teca interna invadem a cavidade do folículo rompido. As células granulosas com suficientes receptores para LH estão em condições de sofrer luteinização, o que implica incremento nos níveis de cAMP. As células da granulosa, agora chamadas de células luteais, aumentam a quantidade de retículo endoplasmático liso, de mitocôndrias e de

receptores para LH, ocorrendo síntese da enzima 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase- $\Delta^{4,5}$ isomerase que permite o início da produção de progesterona.

O aumento de receptores para LH obedece a um estímulo sinérgico de FSH e estrógenos. Por uma parte, o estradiol-17 β estimula a síntese de seus próprios receptores e dos receptores para FSH e por outro lado, o FSH aumenta os receptores para ele mesmo e para LH nas células previamente sensibilizadas pelo estradiol. Entretanto, o próprio LH regula a secreção de progesterona pois atua sobre as células sensibilizadas por estradiol/FSH reduzindo o número de receptores para estradiol, FSH e LH e incrementando o número de receptores de prolactina, a qual tem efeito inibitório sobre a esteroidogênese.

A função do corpo lúteo está regulada por três sistemas de órgãos:

(a) Hipófise que secreta LH, responsável pela regulação primária da secreção de progesterona, como principal fator luteotrópico. As concentrações de LH e de progesterona estão inversamente relacionadas durante o ciclo. Assim, quando a progesterona está em seu nível máximo, o LH está no nadir.

(b) Útero que produz o fator luteolítico prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}), exceto em primatas. Este fator atua local e não sistemicamente, como foi comprovado com a histerectomia unilateral, que prolonga a função luteal no ovário ipsilateral, mas não no contralateral. Várias evidências concorrem para considerar a PGF_{2 α} como fator luteolítico na ovelha: (i) a administração de PGF_{2 α} produz luteólise, (ii) a PGF_{2 α} pode ser sintetizada e secretada no endométrio, (iii) a PGF_{2 α} é detectável na veia uterina no momento da luteólise, (iv) a PGF_{2 α} pode ser transferida da veia uterina para a artéria ovárica, de forma que não precisa entrar na circulação periférica, (v) os tratamentos que induzem a luteólise, aumentam a secreção de PGF_{2 α} , (vi) o bloqueio da síntese de PGF_{2 α} por indometacina inibe a luteólise.

(c) O conceptus, que tem efeito luteotrópico.

A luteólise ocorre sempre que não houver um embrião viável no útero no dia 12 do ciclo na ovelha e a porca, o dia 14 na égua e o dia 16 na vaca. Na cadela, o corpo lúteo tem uma duração de 50 a 70 dias, sem importar se está ou não gestante. A luteólise é o evento responsável pela duração do ciclo estral. O útero da vaca, a ovelha, a cabra, a égua e a porca, produz PGF_{2 α} ,

hormônio causante da luteólise. Na cadela, na gata e na mulher, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ não parece estar envolvida na luteólise. A determinação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ plasmática é difícil devido a sua curta meia-vida e a que as plaquetas a sintetizam nas amostras de sangue coletadas. Por isto, se analisa seu metabólito mais estável, o 15-ceto-13,14-dihidro $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM).

A regressão do corpo lúteo ocorre umas 48 h depois da liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ do útero. É possível que a queda nos níveis de progesterona, junto com a presença de estrógenos de origem folicular sejam os fatores que iniciam a liberação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os estrógenos também são responsáveis pela síntese dos receptores endometriais de ocitocina. Na ovelha, a ocitocina de origem ovárica (corpo lúteo) inicia a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial.

Vários mecanismos têm sido postulados para explicar a ação luteolítica da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Desde vasoconstrição das artérias útero-ováricas e interferência na via biossintética da progesterona até inibição do receptor de LH nas células luteais. Na vaca e na ovelha, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada sai pela veia uterina e é transferida por um mecanismo de contracorrente para a artéria ovárica graças às estreitas relações anatômicas entre esses dois vasos sanguíneos. Na égua e na porca, no entanto, a via de controle uterino sobre a função luteal é sistêmica, devido a que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ nessas espécies não é completamente degradada nos pulmões, como ocorre na vaca e na ovelha. A atividade luteolítica da $\text{PGF}_{2\alpha}$ tem sido utilizada terapeuticamente para sincronizar estros em vacas, ovelhas, éguas e cabras.

A secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ está controlada por três hormônios ovarianos: progesterona, estradiol e ocitocina. A progesterona estimula a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, o que foi demonstrado em ovelhas

injetando progesterona logo no início do ciclo e obtendo diminuição da duração do corpo lúteo de 12,3 dias para 8 dias. Ou seja, a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que normalmente ocorre no dia 11 a 12 do ciclo nas ovelhas e no dia 16 a 17 nas vacas, reflete os altos níveis de progesterona nos primeiros dias da fase luteal do ciclo estral.

O estradiol também causa luteólise, via aumento da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Contudo, este efeito requer da exposição prévia do útero a progesterona. O estradiol diretamente estimula a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e aumenta a sensibilidade do útero para a ação da ocitocina. A ocitocina, por sua vez, também estimula a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ do útero. Entretanto, a ação da ocitocina está fortemente influenciada pelos esteróides ováricos uma vez que requer tratamento prévio de estradiol, sendo que a resposta é maior se o pré-tratamento inclui também a progesterona. Dai que a ação estimulatória da ocitocina sobre a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ seja mais efetiva durante a fase folicular e menor na fase luteal. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ também pode estimular a liberação de ocitocina do corpo lúteo por mecanismo *feedback* positivo para garantir a luteólise completa.

Ainda persiste a controvérsia para estabelecer a relação do controle da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no início da luteólise. O aumento de estradiol não seria tão importante pois ele acontece após iniciada a luteólise e não antes, ao passo que a ocitocina teria tão somente um efeito permissivo. Portanto, a hipótese mais provável é deduzida por exclusão, isto é, a progesterona aparece como o principal estímulo para o aumento da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os níveis de progesterona nos primeiros dias do ciclo “programariam” o útero para liberar $\text{PGF}_{2\alpha}$ 7 a 8 dias depois. Assim que a luteólise começa, o estradiol e a ocitocina atuam como sistemas redundantes que precipitariam a regressão do corpo lúteo.

Tabela V-4. Níveis plasmáticos de progesterona (ng/ml) em fêmeas de várias espécies domésticas.

Espécie	Fase Folicular	Fase Luteal
Vaca	0,40	6,6
Porca	0,50	12,0
Ovelha	0,25	3,7
Égua	0,40	7,7-9,5
Cadela	<1,0	23,0
Gata	<1,0	24,6-25,8

V.4. Anestro estacional ou temporário.

O anestro está caracterizado pela inatividade sexual. É normal no animal pré-púbere e nos animais velhos, bem como em animais gestantes. Nas espécies monoestricas como a cadela, ocorre um período de anestro interestral normal, embora com secreção de gonadotropinas, desenvolvimento folicular e secreção de estrógenos, porém sem conduta estral. Também ocorre anestro normal em espécies de reprodução estacional durante a estação não reprodutiva. Depois do parto e por períodos muito variáveis,

ocorre anestro lactacional na maioria das espécies. O anestro pode ocorrer em forma patológica por uma série de causas que incluem deficiências nutricionais, desequilíbrios endócrinos, transtornos do ovário ou do útero e infecções.

As ovulações “silenciosas” não devem ser confundidos com anestro. Nessa circunstância, as mudanças fisiológicas ovarianas e endócrinas ocorrem, embora sem manifestações de cio. No processo podem estar envolvidas várias causas, como subnutrição, baixa secreção hormonal ou estresse.

As ovelhas e as cabras são estacionais, tendo épocas de anestro nas quais se tornam hipersensíveis ao *feedback* negativo do estradiol sobre o LH, como ocorre na época pré-puberal. O fenômeno está determinado pelo fotoperíodo, tendo a época de anestro nas estações em que o número de horas-luz aumenta e a época reprodutiva quando o fotoperíodo diminui. No caso das éguas o fenômeno é inverso.

No momento de entrar em anestro, a fase folicular não se completa devido à deficiência nos pulsos de LH necessários para o desenvolvimento dos folículos. Consequentemente não é secretado suficiente estradiol para ativar a secreção de gonadotropinas e induzir o estro.

O reinício da atividade reprodutiva depois do anestro estacional é parecido com a puberdade no sentido de que ambos são transições de estados anovulatórios para estado cíclico. O conceito de “puberdade recorrente” pode ser aplicado não somente aos reprodutores estacionais mas a todas aquelas condições fisiológicas nas quais a fertilidade é retomada após períodos de anovulação, como no anestro lactacional.

O fotoperíodo é o principal fator que influi no ritmo anual de reprodução. As vias através das quais o fotoperíodo atua incluem foto-receptores da retina, trato retino-hipotalâmico, núcleo supraquiasmático, gânglios nervosos cervicais superiores, glândula pineal e melatonina. A melatonina é uma indolamina derivada da serotonina que se secreta durante a escuridão. O ritmo circadiano de melatonina sincroniza o ritmo circanual de reprodução das ovelhas adultas para regular o desenvolvimento folicular via um ritmo circal de pulsos de LH.

Embora não se conheça o alvo de ação da melatonina, o conceito é que o padrão de

secreção de melatonina causa aumento ou diminuição da sensibilidade do gerador de pulsos de GnRH ao *feedback* negativo de estradiol para alterar a frequência de secreção de LH. Existem, contudo, diferenças inter-espécies e inter-raças a este mecanismo. Assim, a raça Merino de ovelhas tem atividade reprodutiva contínua ao longo do ano, as éguas têm um padrão de estacionalidade reprodutiva oposto ao das ovelhas e as vacas e os suínos são pouco sensíveis ao efeito do fotoperíodo.

V.5. Referências bibliográficas.

- Alonso, J.C., García, L., et al. Niveles de progesterona sérica en algunos momentos del ciclo estral y su relación con la inseminación artificial fecundante en ganado Holstein. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 19, 161-166. 1988.
- Driancourt, M.A., Gougeon, A., et al. Ovarian function. In: *Reproduction in mammals and man*. C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H. Hunter. (eds). Paris: Ellipses. 1993.
- Foote, R.H. Review: Dairy cattle reproductive physiology research and management - Past progress and future prospects. *J. Dairy Sci.* 79, 980-990. 1996.
- Galina, C.S., Arhur, G.H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 1. Puberty and age at first calving. *Anim. Breed. Abstr.* 57, 583-590. 1989.
- Galina, C.S., Arhur, G.H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 4. Oestrus cycles. *Anim. Breed. Abstr.* 58, 697-707. 1990.
- Galina, C., Orihuela A., Rubio, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in zebu cattle. *Anim. Reprod.* 42, 465-470. 1996.
- Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M. et al. Selection of the dominant follicle in cattle (minireview). *Biol. Reprod.* 55, 1187-1194. 1996.
- Leymarie, P., Martal, J. The corpus luteum from cycle to gestation. In: *Reproduction in mammals and man*. C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H. Hunter. (eds). Paris: Ellipses. 1993.
- Odde, K.G., Holland, M.D. Synchronization of estrus in cattle. In: *Factors affecting calf crop*. M.J. Fields & R.S. Sand (eds.). Boca Raton: CRC Press. 1994, pp. 251-261.

VI. ENDOCRINOLOGIA DA GESTAÇÃO E DO PARTO

VI.1. Endocrinologia da gestação.

VI.1.1. A fertilização.

A gestação é um estado fisiológico da fêmea mamífera no qual se realiza o desenvolvimento de um novo ser. Compreende o período entre a fertilização e o parto. A fertilização nos mamíferos representa o início de uma nova vida. Para ser realizado é preciso que tanto o espermatozóide quanto o óvulo estejam maduros e se encontrem de forma sincronizada no momento certo de maturação. A fertilização, na maioria das espécies, ocorre no oviduto. Vários eventos endócrinos, que incluem interações entre o conceptus e a mãe, garantem o transporte do embrião até o útero.

VI.1.1.1. Capacitação do espermatozóide.

Nos mamíferos, os espermatozóides recém produzidos pelo testículo não tem capacidade fertilizante. Eles ganham essa capacidade durante sua passagem pelo epidídimo, no processo conhecido como maturação espermática. A rigor, os espermatozóides só atingem seu potencial fertilizante quando chegam na cauda do epidídimo.

Uma importante mudança que ocorre durante a maturação espermática no epidídimo é sua habilidade para locomover-se com movimentos ativos e progressivos. Mas é sem dúvida a membrana plasmática o local onde ocorrem as maiores mudanças durante a maturação.

Mudanças químicas na membrana conferem à cabeça do espermatozóide a habilidade para aderir-se à zona pelúcida. A membrana plasmática dos espermatozóides recém produzidos pelo testículo está coberta de macromoléculas (antígenos), os quais são removidos ou modificados durante a maturação no epidídimo, ao tempo que novas macromoléculas, de origem do epidídimo, são adsorvidas ou integradas na membrana espermática. Entre estas macromoléculas estão glicoproteínas, cuja alteração ocorre por enzimas reguladoras da glicosilação, como a galactosil-transferase e a sialil-transferase.

Os lipídios da membrana espermática também sofrem alterações químicas e físicas no epidídimo, especialmente devido a mudanças na proporção de colesterol e dos tipos de fosfolipídios. As mudanças na membrana ocorrem ao longo da superfície do espermatozóide, desde a cabeça até a cauda.

Os espermatozóides maduros no epidídimo,

contudo, não têm ainda garantida a capacidade fertilizante. Eles devem permanecer um tempo no trato genital feminino para ganhar essa capacidade. Ali sofrem uma série de mudanças no processo conhecido como capacitação. A capacitação espermática foi descoberta por Chang e Austin em 1952 e, ainda hoje, existe a dúvida de que seja um processo necessário para a fertilização, em razão de que espermatozóides sem entrar no trato genital feminino, mantidos em meios artificiais, podem fertilizar óvulos. Essa dúvida seria aceitável se a capacitação fosse definida como um processo que tem lugar unicamente no trato genital feminino. Deve ser considerado que os meios artificiais em que esses espermatozóides foram mantidos podem imitar o estímulo da capacitação que ocorre naturalmente.

Por outro lado, se a capacitação não fosse necessária, os espermatozóides recém ejaculados teriam capacidade fertilizante imediata, o que não é o caso. Os espermatozóides requerem de um tempo entre a inseminação e a fertilização, tempo que pode variar nas diferentes espécies entre menos de 1 hora a várias horas.

Não se sabe ainda com certeza o que é exatamente a capacitação, porém o certo é que uma parte importante dela consiste na remoção e/ou alteração de algumas das substâncias que foram adsorvidas ou integradas na membrana do espermatozóide durante a maturação no epidídimo e durante o contato com o plasma seminal. A capacitação sensibiliza a membrana espermática, expondo sítios receptores que permitem ao espermatozóide interagir especificamente com receptores do óvulo ou com substâncias que rodeiam o óvulo.

A capacitação prepara o espermatozóide para sofrer a chamada “reação do acrossomo”. Alguns autores sugerem que a reação do acrossomo deve ser considerada parte da capacitação. Entretanto, o mais correto seria considerá-los como dois processos separados. A capacitação incluiria a série de mudanças que permitem que a reação do acrossomo possa acontecer. A reação do acrossomo é um evento que ocorre em todos os animais, enquanto que a capacitação é exclusiva dos mamíferos. A capacitação e a maturação espermáticas podem constituir processos de adaptação evolutiva dos mamíferos, nos quais acontece fertilização interna.

Nas espécies em que o sêmen é depositado na vagina (vaca, mulher) a capacitação pode começar durante a passagem do espermatozóide

pelo cérvix. Nas espécies em que o sêmen é depositado diretamente no útero (porca, roedores) a capacitação ocorre no oviduto. Falta esclarecimento sobre os fatores que determinam a capacitação no trato genital feminino, mas têm sido propostas algumas substâncias participantes, como catecolaminas, glicosaminoglicanos, taurina, bem como as enzimas β -amilase, β -glucuronidase, anidrase carbônica e arilsulfatase, entre outras. A capacitação pode ser realizada *in vitro*, conforme foi demonstrado por Yanagimachi e Chang em 1963, utilizando meios específicos.

Entre as mudanças observadas nos espermatozoides durante a capacitação podem ser consideradas as seguintes:

- (a) aumento da atividade da adenilciclase, que leva a aumento do nível de cAMP e, portanto, da atividade de proteína-quinases, as quais produzem mudanças nas propriedades da membrana, notadamente na permeabilidade iônica, processo ligado ao início e à manutenção da motilidade;
- (b) aumento no metabolismo, especialmente da atividade glicolítica e o do consumo de O_2 ; mudanças na membrana, talvez por fosforilação, facilitam a captação de substratos energéticos pelo espermatozoide;
- (c) mudanças na concentração de íons intracelulares; a reação do acrossomo é iniciada por um fluxo maciço de íons Ca^{2+} através da membrana plasmática;
- (d) na membrana plasmática ocorre o maior número de mudanças já que está diretamente exposta ao meio, assim, são removidos ou alterados antígenos (glicoproteínas periféricas) presentes não somente na cabeça mas também na cauda do espermatozoide; são liberadas e absorvidas substâncias do meio; muda a composição dos fosfolípidios de membrana, evento representado pela presença de fosfatidil-inositol (ausente nos espermatozoides frescos), metilação de fosfolípidios (conversão de fosfatidil-etanolamina em fosfatidil-colina) e diminuição da quantidade de colesterol;
- (e) surpreendentemente, a estrutura do acrossomo, na maioria das espécies, não sofre modificações evidentes durante a capacitação.

VI.1.1.2. Reação do acrossomo.

O acrossomo é uma estrutura em forma de capuz, rodeada de membranas que cobre a parte superior da cabeça do espermatozoide. Sua forma e tamanho variam consideravelmente entre as

espécies, mas sua estrutura básica é a mesma. O acrossomo é considerado como uma estrutura análoga aos lisossomos ou aos grânulos zimógenos do pâncreas, contendo enzimas hidrolíticas. Destas enzimas, a primeira a ser relatada foi a hialuronidase. Depois foram identificadas acrosina, proteinase, esterase, neuraminidase, fosfatase, collagenase, β -galactosidase, fosfolipase C, e outras até completar pelo menos 20 enzimas.

Os ovócitos de muitos animais estão rodeados de cobertas glicoprotéicas, que devem ser atravessadas pelo espermatozoide para chegar até a membrana plasmática do óvulo (vitelo). Além da zona pelúcida, coberta glicoprotéica que rodeia os ovócitos mamíferos, existe ainda o *cumulus oophorus*, composto por células e por uma matriz, cujo componente principal é o ácido hialurônico. O espermatozoide dissolve a cobertura produzindo um “buraco”, através do qual nada até seu objetivo. A dissolução dessa cobertura é realizada por ação das enzimas proteolíticas e pela interação hidrofóbica intermolecular (dissolução estequiométrica).

O acrossomo pode ser auto-digerido quando o espermatozoide está moribundo, o que constitui uma reação acrossômica falsa, que deve ser diferenciada da reação acrossômica verdadeira que ocorre em espermatozoides vivos. A reação do acrossomo envolve múltiplas fusões entre a membrana acrossômica externa e a membrana plasmática do espermatozoide. Essas fusões permitem a saída do conteúdo do acrossomo através das frestas membranais. Existe muita variação entre as espécies quanto a duração da reação do acrossomo. Por estudos *in vitro*, foi calculado que a reação deve durar de 2 a 15 minutos.

Os indutores naturais da reação do acrossomo parecem ser substâncias presentes no *cumulus oophorus* e/ou na zona pelúcida. Algumas glicoproteínas da zona (ZP3) se unem à membrana plasmática do espermatozoide sobre o capuz acrossômico causando mudanças conformacionais que permitiriam um aumento temporário da permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} extracelular.

A membrana plasmática do espermatozoide deve ter receptores que iniciam dois processos paralelos: (a) um processo não dependente de Ca^{2+} que aumenta o pH intracelular mediante a entrada de íons Na^+ e a saída de H^+ , e (b) um processo Ca^{2+} -dependente que causa a despolarização da membrana. Ambos

processos resultariam na abertura de canais que permitiriam o ingresso maciço de íons Ca^{2+} , fato que induziria a fusão das membranas plasmática e acrossômica, terminando com a exocitose do conteúdo acrossômico. Entretanto, o fluxo de Ca^{2+} não é suficiente para precipitar a reação, sendo provável que quase todos os componentes das membranas plasmática e acrossômica, bem como íons a ambos lados da membrana, estejam envolvidos direta ou indiretamente na reação.

VI.1.1.3. Fusão das gametas.

Os óvulos de todos os mamíferos contêm a zona pelúcida. Em alguns ungulados (vaca, ovelha) o *cumulus oophorus* pode ser descolado depois da ovulação, deixando a zona pelúcida como única coberta do óvulo. A composição básica da zona pelúcida é de glicoproteínas sulfatadas, tendo uma proporção aproximada de 71% de proteínas, 19% de hexoses, 2,7% de ácido siálico e 2,4% de sulfatos. Existem pelo menos 3 famílias de glicoproteínas da zona pelúcida, ZP1, ZP2 e ZP3, cujos pesos moleculares variam consideravelmente conforme a espécie.

Anteriormente se pensava que muitos espermatozóides rodeavam o óvulo para dispersar o *cumulus* e assim um deles poderia penetrar. Na realidade isto não acontece, pois muito poucos espermatozóides são encontrados em volta do *cumulus* durante a fertilização.

Conforme Austin demonstrou pela primeira vez, os espermatozóides devem estar capacitados para penetrar o *cumulus*. Os espermatozóides não capacitados podem ficar aderidos à superfície do *cumulus*, porém são incapazes de penetrar. Por outra parte, os espermatozóides capacitados devem ter o acrossomo intacto no momento de penetrar o *cumulus*, pois se a reação do acrossomo acontecer antes, eles ficam grudados na superfície do *cumulus* sem avançar.

Os espermatozóides com capacidade fertilizante se ligam à superfície da zona pelúcida antes de penetrar, mediante a interação entre moléculas da zona e da superfície espermática (glicoproteínas ZP2 e ZP3). Somente os espermatozóides com o acrossomo intacto se ligam à superfície da zona, ou seja, os receptores estão localizados na membrana plasmática que rodeia o acrossomo, devendo haver mais de um tipo de receptor na superfície espermática.

Sem dúvida devem existir também receptores para elementos da zona no

espermatozóide que sofre a reação do acrossomo, porém esta ligação não deve ser muito forte para evitar que os espermatozóides fiquem estacionados na zona pelúcida. O espermatozóide deve completar a reação do acrossomo antes de terminar de penetrar a zona.

Existem duas hipóteses para explicar a passagem dos espermatozóides pela zona pelúcida:

(a) uma hipótese mecânica, que estabelece que as enzimas acrossômicas teriam a única função de iniciar a reação do acrossomo, não tendo nada a ver com a penetração do espermatozóide através da zona. O espermatozóide atravessa a zona batendo vigorosamente a cauda, movimento essencial para a penetração, ajudado por movimentos laterais e antero-posteriores da cabeça. O único propósito da reação acrossômica seria expor a membrana interna do acrossomo (*perforatorium*); pareceria que o espermatozóide “corta” a zona em vez de dissolvê-la;

(b) uma hipótese enzimática, onde cada passo da penetração espermática seria mediado por enzimas. A hialuronidase serve para facilitar a passagem pelo *cumulus*, ao passo que outras enzimas atuam na adesão do espermatozóide na zona. A acrosina hidrolisa glicoproteínas para amaciar a zona. A hialuronidase facilita mas não é essencial para a penetração do espermatozóide através do *cumulus*, servindo apenas como lubrificante, uma vez que atua sobre o ácido hialurônico.

As evidências indicam que o mais provável é que os espermatozóides usem tanto os meios mecânicos como enzimáticos para penetrar a zona, já que o espermatozóide deve estar mótil para avançar, porém a motilidade forte não é suficiente, sendo que as enzimas devem abrir caminho para os espermatozóides avançarem. A passagem do espermatozóide através da zona é muito rápida, por volta de alguns minutos.

Após passar pela zona, o espermatozóide deve cruzar o espaço perivitelino, ficar grudado no vitelo e gradualmente incorporar-se a ele. A porção da membrana plasmática localizada acima do segmento equatorial do espermatozóide se une com a membrana plasmática do óvulo somente após concluir a reação do acrossomo, sendo que o espermatozóide intacto não pode ligar-se ao vitelo. A membrana espermática se torna parte da membrana plasmática do óvulo durante a fertilização, estabelecendo uma fusão.

Após a fusão com o espermatozóide, o óvulo até então quiescente, inicia uma série de

eventos bioquímicos e morfológicos que levam à formação de um novo ser. Essa ativação está evidenciada pela exocitose dos grânulos corticais (GC) e a retomada da meiose. O núcleo do óvulo, que estava na metáfase da 2ª meiose antes da fertilização, reassume a meiose após a fusão. O pronúcleo feminino e o pronúcleo masculino ficam próximos um do outro, desintegram seus envelopes nucleares e misturam seus cromossomos, evento que pode ser considerado como o fim da fertilização e o início do desenvolvimento embrionário. O intervalo entre a fusão e o início da 1ª clivagem pode ser de até 12 horas nos mamíferos.

Para que ocorra a ativação do óvulo deve haver uma liberação explosiva de Ca^{2+} dos depósitos intracelulares do retículo endoplasmático a fim de provocar intercâmbio Na^+/K^+ através da membrana plasmática do óvulo, o que causa um aumento do pH intracelular. Esse aumento no pH remove proteínas inibitórias do citoplasma, o que resulta na ativação irreversível do metabolismo do óvulo, em especial das vias oxidativas, do metabolismo lipídico e da síntese de proteínas e de DNA.

As propriedades da zona pelúcida mudam drasticamente após a fertilização para evitar a penetração de mais espermatozóides ou polispermia. Esta mudança se conhece como a *reação da zona*.

Os GC são grânulos pequenos e esféricos, rodeados por membranas, que se encontram sob a membrana plasmática do óvulo (córtex) não fertilizado dos mamíferos. A exocitose dos grânulos começa próximo do ponto de fusão dos gametas e se propaga rapidamente como uma onda. A exocitose vem precedida da liberação intracelular de Ca^{2+} . Os GC contêm enzimas hidrolíticas e componentes sacarídicos que alteram as características físico-químicas da zona pelúcida, de forma a torná-la refratária à penetração de mais espermatozóides.

A *reação da zona* é devida à hidrólise da glicoproteína ZP3, principal proteína de ligação do espermatozóide na zona, por ação das enzimas proteinase e glucosidase, provenientes dos GC. Como resultado, os espermatozóides não têm mais pontos de ligação com a zona e são incapazes de penetrá-la. Este processo não é o único que bloqueia a polispermia. A membrana vitelina também pode rejeitar os espermatozóides em excesso, mediante um processo chamado de bloqueio vitelino, cujo mecanismo não está bem

entendido. O mecanismo observado no ouriço-do-mar é por aumento súbito do potencial de membrana logo depois da fusão. Não se sabe se nos mamíferos opera o mesmo mecanismo.

Uma demora na exocitose dos GC que cause portanto um atraso na reação da zona, pode levar a polispermia. Este evento pode acontecer em óvulos prematuros ou muito velhos. Fisiologicamente alguns GC podem ser liberados alguns minutos antes da fusão para modificar levemente as propriedades da zona pelúcida de forma a causar que somente os espermatozóides mais vigorosos possam penetrar o óvulo, como um mecanismo de proteção contra a polispermia.

VI.1.2. A implantação: o estabelecimento da gestação.

Após a fertilização, o embrião permanece por um tempo próximo da união âmpulo-istmica do oviduto antes de entrar no útero. O útero deve estar em condições de receber o embrião, o que somente acontece quando se encontra sob influência da progesterona. Depois da fertilização, o embrião alcança o útero em um período que varia dependendo da espécie, geralmente relacionado com o desenvolvimento do corpo lúteo funcional. A média nos mamíferos é de 3 a 4 dias pós-fertilização, sendo de 2,5 a 3,5 dias na porca, 3 a 4 dias na vaca, 2 a 4 dias na ovelha, 4 a 5 dias na cadela e 6 dias na égua. Nesta última espécie, o óvulo só é transportado ao útero se fertilizado, o que sugere que o embrião promove seu próprio transporte ao útero, possivelmente mediante a ação de estrógenos de origem embrionária. Este evento constitui o sinal de reconhecimento de gestação mais precoce que se conheça. No transporte do zigoto ao útero estão envolvidos, além dos estrógenos, outros hormônios, como a progesterona e as prostaglandinas F.

Tendo aproximadamente uma divisão mitótica por dia, o zigoto da vaca chega ao útero no 5º dia de gestação com 16 a 32 células (estágio de mórula), mantendo ainda sua capacidade totipotencial, isto é, nesta etapa podem ser obtidos vários indivíduos geneticamente idênticos mediante a separação das blastômeras (células embrionárias). Nesse estágio, o embrião ainda está rodeado da zona pelúcida.

No dia 6 a 7 nos bovinos, começa a diferenciação do embrião, evidenciada pela formação da massa celular interna e do blastocelo, uma cavidade interna (estágio de

blástula). Nesse ponto, a zona pelúcida é perdida e a massa celular interna é rodeada pelo trofoblasto, o qual demarca os limites externos do blastocisto, nome dado ao embrião neste estágio, ficando em contato com as secreções uterinas.

A massa celular interna originará o corpo do embrião. A partir de sua região ventral origina-se o endodermo ou intestino primitivo, que rodeia a cavidade do blastocisto, e a partir de seu eixo longitudinal uma estrutura proeminente constitui o disco embrionário. Da parte posterior do trofoblasto é formado o mesodermo, o qual se organiza em várias camadas. Da camada lateral ou mesodermo somático, que acompanha o trofoblasto, é formado o córion e da camada medial ou mesodermo esplâncnico, que acompanha o endodermo, é formada a esplancnopleura. Do córion surge o amnios, membrana que rodeia o embrião e que posteriormente servirá de limite da cavidade amniótica, cujo líquido está em contato direto com o embrião. O saco vitelino e a alantóides surgem como invaginações ventrais do intestino. O saco vitelino cresce pouco e sofre regressão, mas o alantóides cresce até alcançar o córion e formar o alantocórion, parte embrionária da futura placenta.

A implantação do embrião nos mamíferos é um evento gradual que se inicia próximo a seu lugar de contato com o útero e que se estende perifericamente. O primeiro contato embrião-útero ocorre por volta do 10º dia da gestação na ovelha, interagindo de forma evidente após o dia 14. Depois da aposição entre eles, vem a fase de adesão com intervenção de glicoproteínas de membrana, seguida da interdigitação entre o trofoblasto, neste ponto chamado de trofectodermo, e o endométrio. O sucesso da implantação depende dos estrógenos de origem trofoblástica.

O ambiente uterino fornece os nutrientes e o meio físico-químico adequados para o desenvolvimento do embrião desde sua chegada no útero até sua implantação. As mudanças que ocorrem nas secreções uterinas são hormônio-dependentes e constituem a base da sincronia entre o embrião e o útero.

Foi encontrada maior concentração de íons (K^+ , HPO_4^{2-} , Zn^{2+} , Ca^{2+}) nas vacas repetidoras de serviços no dia 7 pós-inseminação do que em vacas normais. Estas mudanças podem estar relacionadas com maiores níveis de estradiol encontrados também nas vacas repetidoras nesse período. Também tem sido observada maior

concentração de proteínas totais no útero de vacas normais do que em repetidoras cerca do 7º dia pós-serviço, sem ter uma aparente explicação. É sabido que a concentração de proteínas totais no útero aumenta quando se aproxima o momento da implantação, e que se observam mudanças qualitativas nas proteínas uterinas durante o período da pré-implantação. As proteínas específicas da gestação representam um importante elo na interação embrião-endométrio, tendo papel no reconhecimento materno da gestação.

O embrião mamífero passa os primeiros 3-4 dias no oviduto rodeado de compostos de origem sérica materna, cuja secreção está regulada pelo equilíbrio estradiol/progesterona. Estes esteróides também regulam o transporte do embrião até o útero. Quando o embrião chega no útero, por volta do dia 6 pós-fertilização, a sua sobrevivência depende da prolongação do corpo lúteo. As pesquisas nesse sentido estão voltadas para a identificação da natureza dos sinais de origem embrionária destinados a manter o corpo lúteo. O sinal não parece obedecer a uma interação célula-célula pois o momento de reconhecimento da gestação, que no bovino é por volta do dia 16 de gestação, antecede ao fenômeno de adesão e implantação, o qual se inicia cerca do dia 18-22 no bovino. Tampouco é provável que seja via neural levando em conta que não foi identificada até agora uma interconexão local útero-ovário adjacente. O mais provável é que exista um sinal embrionário de natureza química, que pode ser luteotrófico e/ou anti-luteolítico. Até agora os candidatos são estrógenos, prostaglandinas, histamina, ácido carbônico e proteínas específicas de origem embrionária.

Os estrógenos são luteotróficos na porca e são produzidos pelo blastocisto antes da implantação, no momento do reconhecimento da gestação. A quantidade de estrógenos produzidos pela vaca no momento do reconhecimento da gestação é muito menor comparada com a porca, parecendo ter maior papel na regulação do fluxo sanguíneo uterino do que no reconhecimento materno.

Os conceptus bovinos de 13-16 dias produzem progesterona, testosterona e estradiol, sendo que as concentrações deste último aumentam entre os dias 14-18 de gestação, o que deve ter algum significado biológico.

Em todos os animais domésticos a progesterona é essencial para o estabelecimento e

a manutenção da gestação. Devido a este papel indispensável, muitos pesquisadores estudaram a relação da concentração de progesterona com a taxa de concepção. Os resultados documentados sobre o efeito do nível de progesterona no ciclo anterior ao serviço sobre a taxa de concepção são inconsistentes. Alguns trabalhos encontram uma relação positiva, enquanto que outros não encontram relação alguma.

A literatura que relaciona os níveis de progesterona na fase luteal com a taxa de gestação, mostra também contradição. Se considera que não há evidência de um efeito luteotrófico dos níveis de progesterona até antes do dia 16 pós-serviço, momento no qual se aprecia uma real diferença nos níveis de progesterona entre vacas gestantes e não gestantes. Estudos do efeito da suplementação de progesterona sobre a taxa de gestação, mostram diferença significativa entre as vacas controle e as suplementadas tão somente quando os dados são tomados em conjunto (Tabela VI-1) e quando se trata de vacas com problemas de baixas taxas de concepção.

A gonadotropina coriônica humana (hCG) tem sido usada como alternativa à suplementação de progesterona como luteotrófico durante a fase luteal ou no período da luteólise cíclica. Os resultados mostram aumentos significativos nos níveis de progesterona como consequência de um incremento no número de corpos lúteos acessórios. Todavia, os resultados sobre a taxa de concepção não mostraram aumento significativo (58% vs 64,5%, para vacas controle e tratadas, respectivamente; Diskin e Sreenan, 1986). Dos anteriores estudos pode-se inferir que não existe uma clara relação específica entre os níveis de progesterona e a sobrevivência embrionária.

Sendo que a prostaglandina $\text{PGF}_{2\alpha}$ é o fator luteolítico nos bovinos, pressupõe-se que o

sinal produzido pelo embrião inibe ou reduz a secreção deste hormônio como mecanismo para manter a função do corpo lúteo durante a gestação. É provável que o efeito do embrião seja através da inibição da concentração de receptores de ocitocina no útero, efeito que impede a interação da ocitocina de origem ovárica com o estradiol para a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina. A diminuição de receptores ocitocínicos no útero seria pelo efeito bloqueador que a progesterona exerce sobre a biossíntese de receptores de estradiol, os quais são necessários para a biossíntese dos receptores de ocitocina. Na porca foi demonstrado um re-direcionamento da $\text{PGF}_{2\alpha}$ do sangue para o lúmen uterino por ação dos estrógenos.

Simultaneamente com o efeito anti-luteolítico originado pelo embrião em nível uterino, parece ocorrer também um efeito luteotrófico em nível luteal. Alguns autores propõem que o aumento na produção de PGE_2 de origem embrionária e/ou endometrial, seria responsável pela proteção do corpo lúteo contra a ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Similarmente à $\text{PGF}_{2\alpha}$, a PGE_2 poderia ser transportada localmente do útero ao ovário via contra-corrente para exercer seu efeito luteotrófico.

Nos últimos anos tem sido realizadas numerosas pesquisas para identificar as proteínas específicas produzidas pelo embrião e suas possíveis funções biológicas. A α -fetoproteína é uma proteína sérica específica do embrião mamífero que começa a ser sintetizada muito antes da adesão do conceptus e que parece ficar sequestrada em quantidade considerável no lúmen uterino. Sua função não está esclarecida e tem sido relacionada como substância imunossupressora.

O fator inicial da gestação (EPF) foi detectado no soro bovino e de outras espécies cerca do dia 8 pós-inseminação. Parece estar composto por 2 componentes separados, o EPF-A, produzido pelo oviduto durante o ciclo estral e a gestação e o EPF-B, produzido pelo ovário unicamente durante a gestação. Sua função tem sido relacionada com efeitos imunossupressores.

Alguns trabalhos fazendo infusões uterinas de conceptus causaram prolongação da função luteal, aparentemente por uma ação anti-luteolítica, uma vez que não houve estimulação da síntese de progesterona, mas inibição da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

As principais proteínas sintetizadas pelo

Tabela VI-1. Taxa de gestação (%) em vacas tratadas com progesterona.

Tratamento	Controle	Tratada
500 mg dia 0	5	35
100 mg dias 4-5	17	47
50 mg dias 3-34	33	44
200 mg dias 3-34	26	39
Total ($p < 0,05$)	23	42,5

Fonte: Diskin e Sreenan (1986)

embrião bovino de 16-24 dias são de baixo peso molecular e de ponto isoelétrico (pI) ácido. Uma dessas proteínas anti-luteolíticas foi inicialmente chamada de trofoblastina na ovelha, e mais tarde de proteína trofoblástica ovina I (oTP-1). A administração uterina de oTP-1 consegue estender a função luteal em ovelhas cíclicas. A oTP-1 aparece entre os dias 12 a 24 da gestação na ovelha e tem peso molecular de 20 kD e pI de 5,3. No bovino, foram caracterizadas duas moléculas similares à oTP, recebendo o nome de bTP. A hipótese do mecanismo de ação das proteínas trofoblásticas pode envolver a inibição da biossíntese dos receptores de ocitocina ou de estradiol ou bem a estimulação da biossíntese de PGE₂ endometrial.

As pesquisas continuam no sentido de caracterizar os fatores que influem no reconhecimento materno da gestação e para estabelecer seus mecanismos de ação, bem como para esclarecer os eventos na sincronia embrião-ambiente uterino e suas consequências sobre a sobrevivência embrionária. Algumas das incógnitas a serem ainda resolvidas são: (a) como e quando os genes embrionários se expressam e até que ponto a expressão depende do ambiente uterino; (b) como é regulada a transcrição dos genes que codificam para as substâncias encarregadas de manter o corpo lúteo de gestação; (c) qual a natureza dos mecanismos pelos quais o sistema imune materno tolera o aloenxerto fetal; (d) quais são os fatores genéticos envolvidos na morte embrionária “natural”.

VI.1.3. Sobrevivência embrionária.

A morte embrionária é referida como a perda do embrião ocorrida durante o período compreendido entre a fertilização e o final do estado de diferenciação. Este último limite, no bovino, está por volta do dia 45 de gestação. Nos bovinos, bem como na maioria das espécies, existem duas causas principais de perdas reprodutivas no início da gestação: a falha na fertilização e a morte embrionária. Se considera que a morte embrionária seria a causa mais importante destas perdas, tendo uma incidência de pelo menos 30%. Estudos recuperando embriões em várias etapas depois do serviço, revelaram que as mortes embrionárias ocorridas entre os dias 8 a 18 pós-serviço correspondem a 75-80% do total. Como a maioria das perdas ocorrem antes do dia 18, a sequência normal dos eventos luteolíticos não é afetada e o estro

retorna em 18 a 25 dias, configurando o quadro das vacas repetidoras (*repeat breeders*), definidas como aquelas vacas que não conseguem ficar gestantes depois de 3 ou mais serviços consecutivos, sem causa aparente. Para alguns autores o período crítico em que ocorre a maior parte das mortes embrionárias nas vacas repetidoras, é quando o embrião entra ao útero, isto é, aproximadamente aos 6 dias pós-serviço.

Como causas da morte embrionária são mencionados fatores endocrinológicos, genéticos, nutricionais, fisiológicos, imunológicos e ambientais, sendo muito difícil a identificação do mais relevante. Por outra parte, é reconhecido que existe um nível basal ou natural de morte embrionária, cujas causas são desconhecidas. Fatores como alta temperatura e/ou alta umidade, subnutrição, excesso ou deficiência de peso ou algumas doenças, exacerbariam a morte embrionária acima de seus níveis basais. Alguns autores consideram que grande parte das mortes embrionárias são inevitáveis e que devem ser vistas como um método natural de eliminar genótipos indesejáveis. Entretanto, a maioria da literatura científica concorda em que as causas genéticas da morte embrionária respondem somente por até 5% dos casos.

A assincronia embrião-útero é mencionada como a maior causa das mortes embrionárias na transferência de embriões. Vários estudos sugerem que esta assincronia poderia ocorrer também espontaneamente, ou seja, na fertilização normal. Não está claro até que ponto o próprio embrião, o ambiente uterino ou as interações entre eles, são responsáveis pelos casos de morte embrionária. A sobrevivência do embrião parece depender, em primeiro lugar, de seu próprio desenvolvimento intrínseco programado, isto é, da expressão de seu genoma e, secundariamente, de sua habilidade para se comunicar com a mãe, ou seja, para efetivar o reconhecimento materno da gestação.

Entre os mais importantes fatores que podem exacerbar a morte embrionária estão a subnutrição e o stress calórico. Existem muitos trabalhos que mostram uma relação positiva entre o nível nutricional e a eficiência reprodutiva, embora poucos determinam os efeitos específicos do nível nutricional sobre a taxa de sobrevivência embrionária. A subnutrição reduz os níveis plasmáticos de progesterona sérica e diminui a proporção de embriões normais. Entretanto, não se observa um efeito direto sobre a mortalidade embrionária entre os dias 8 a 18 pós-serviço. A

taxa de fertilização não parece ser afetada pelo stress nutricional, o que sugere que a diminuição na taxa de gestação que ocorre nos casos de subnutrição é devida primariamente a morte embrionária.

Idealmente, devem ser evitados extremos na condição corporal e o nível nutricional para melhorar as taxas de gestação. Um nível adequado de alimentação, especialmente em animais com baixa condição corporal, deve ser mantido pelo menos até completar o período de implantação do embrião. A taxa de gestação também pode diminuir em casos de sobrealimentação, especialmente em ambientes quentes.

A diminuição da taxa de concepção sob condições climáticas adversas está bem documentada. Na vacas é observado um declínio da taxa de concepção nos meses mais quentes e úmidos do ano. O efeito negativo sobre a taxa de concepção é observado tanto por altas temperaturas ambientais no dia seguinte ao serviço quanto por excesso de irradiação solar no dia do serviço. As mudanças climáticas afetam diretamente o microambiente uterino, o qual é crítico para o desenvolvimento do embrião. Considera-se que um aumento em 0,5°C na temperatura média do útero no dia do serviço ou um dia depois, está associado com diminuição da taxa de concepção em 10%.

Os efeitos climáticos são mais pronunciados nas vacas lactantes, sendo mais drástico nas vacas de maior produção, devido à dificuldade na termo-regulação desses animais. O stress calórico no início da gestação reduz significativamente o peso do conceptus e aumenta a proporção de embriões anormais nas novilhas. O stress calórico no dia 17 da gestação reduz a secreção de proteínas do conceptus, particularmente a bTTP-1 e aumenta a secreção de prostaglandinas endometriais, o que leva a crer que a infertilidade associada com stress térmico seja causada por alterações nos sinais embrionários de manutenção da gestação.

VI.1.4. Desenvolvimento da gestação.

O útero gestante dos ruminantes está localizado no lado direito do abdome, pois o lado esquerdo está ocupado pelo rúmen. O corno uterino não grávido na vaca permanece relativamente pequeno, embora seja ocupado pelas membranas fetais do corno gestante. Cerca de 95% dos fetos bovinos têm apresentação anterior no sétimo mês de gestação. A

apresentação posterior nesta espécie aumenta a incidência de distocias.

Do ponto de vista do número de fetos, as fêmeas podem ser classificadas em:

- (a) *Uníparas*, como a vaca e a égua, que normalmente liberam um óvulo e desenvolvem um feto só; estas espécies estão caracterizadas por possuir um cérvix bem desenvolvido. Embora as ovelhas e as cabras sejam classificadas como animais uníparos, a alta incidência de gestações gemelares nessas espécies (45-70%) sugere usar o termo bíparo; a incidência de gestações gemelares está influenciada pelo estado nutricional e o potencial genético, sendo maior nas fêmeas pluríparas do que nas primíparas;
- (b) *Multíparas*, como a porca, a cadela e a gata, as quais estão caracterizadas por possuir um cérvix pouco desenvolvido; geralmente liberam 3-15 óvulos e desenvolvem um número de fetos que varia conforme a espécie, a idade e a raça. A cadela, que libera entre 2 a 10 óvulos, é a espécie que tem a maior variação por raça. Nestas espécies a incidência de morte embrionária precoce é alta (20-40%).

As fêmeas que nunca ficaram gestantes são conhecidas como nulíparas, as que já tiveram mais de dois partos como pluríparas e as que estão gestantes pela primeira vez são chamadas primíparas.

A duração da vida reprodutiva nas diferentes espécies, quando não há problemas de tipo nutricional ou patológico que afetem o sistema reprodutivo, é mostrada na Tabela VI-2. As vacas que não ficam gestantes até os 4-5 anos de idade, dificilmente conseguem ficar gestantes depois e frequentemente desenvolvem cistos ovarianos e transtornos endometriais,

Tabela VI-2. Duração da vida reprodutiva (anos) em animais domésticos.

Espécie	Vida reprodutiva
Vaca leiteira	8-10
Vaca de corte	10-12
Touro	10-14
Égua	18-22
Ovelha/Cabra	6-10
Porca	6-8
Cadela/Gata	8-12

diferentemente das ovelhas, as quais podem conceber sem problema, mesmo depois de bastante tempo sem ter serviços.

A duração da gestação está determinada geneticamente, mas pode estar influenciada por vários fatores, entre os quais os seguintes:

- (a) sexo do feto; quando o feto é macho, a gestação se prolonga em 1 a 3 dias;
- (b) número de fetos; a gestação dura menos quando há mais fetos;
- (c) raça; nas vacas zebú a gestação dura mais do que nas vacas européias;
- (d) nível nutricional; a subnutrição diminui o tempo de gestação;
- (e) stress; os extremos de temperatura ambiental ou qualquer outro stress podem causar parto prematuro;
- (f) idade da mãe; a gestação é mais prolongada em fêmeas mais velhas.

Os períodos de gestação para as diferentes espécies animais aparecem na Tabela VI-3.

A gestação pode ser dividida em duas fases:

(a) *Período Embrionário*, que vai desde a fertilização até o término do processo de implantação (dia 45 na vaca, 34 na ovelha, 60 na égua). Durante este período ocorre a diferenciação celular, podendo ser subdividido em duas etapas: (i) etapa de embrião inicial (10-12 dias) que compreende até o desenvolvimento das membranas primitivas do zigoto, depois que o blastocisto perde a zona pelúcida e ficam evidenciadas a massa celular interna e o trofoblasto; (ii) etapa de organogênese, na qual o trofoblasto cresce rapidamente e ocorre o reconhecimento materno da gestação, terminando com o processo da implantação. Durante esta última etapa são formados os tecidos, órgãos e sistemas de forma que o embrião toma o aspecto característico da espécie.

(b) *Período Fetal*, que vai desde o final do período embrionário até o parto. As mudanças neste período são de crescimento do feto. As carúnculas e os cotilédones se desenvolvem para dar nutrição ao feto, cujo crescimento corresponde a uma curva de tipo geométrico, sendo o maior incremento no último terço da gestação.

As membranas que envolvem o feto estão compostas por:

- (a) o saco vitelino primitivo, presente tão somente no período embrionário inicial;
- (b) o amnios, que aparece a partir do dia 13-16 na

vaca;

(c) o alantóides, presente a partir do dia 15-21 na vaca;

(d) o trofoblasto ou córion, que se une ao alantóides para formar o alantocóron; esta última membrana é a mais importante pois tem a função de implantar-se no endométrio e de secretar enzimas e hormônios, constituindo a placenta fetal.

No final da gestação, os volumes médios dos líquidos amniótico e alantóico são, respectivamente, os seguintes (em ml): vaca 5500 e 9500, ovelha 500 e 1000, égua 4500 e 12000, porca 100 e 150.

VI.1.5. Endocrinologia da gestação.

O desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo funcional é condição para o término da gestação. A progesterona secretada pelo corpo lúteo induz a secreção, por parte das glândulas endometriais, dos nutrientes básicos para o crescimento do conceptus até a terminação do processo de implantação. A progesterona também reduz o tônus uterino e a contratilidade do miométrio, para permitir a expansão, a adesão e a implantação do conceptus.

Os primeiros dias do ciclo estral são hormonalmente iguais aos primeiros dias da gestação, isto é, o ambiente uterino é igual até esse momento, independentemente da existência do conceptus ou não. Dois dias antes de ocorrer a luteólise, porém, o embrião viável presente no

Tabela VI-3. Duração da gestação em varias espécies de animais domésticos.

Espécie	Duração da gestação (dias)
<i>Bos taurus</i>	280-285
<i>Bos indicus</i>	292
Ovelha/Cabra	145-150
Porca	115
Égua	335-340
Burra	348-377
Mula	355
Gata	56-63
Cadela	60-66
Coelha	30
Cobaia	60
Rata	22
Camundongo	23
Hamster	16

útero deve emitir sinais que permitam a manutenção da funcionalidade do corpo lúteo para o normal desenvolvimento da unidade materno-fetal, processo conhecido como reconhecimento materno da gestação.

VI.1.5.1. Hormônios da gestação na vaca.

Os blastocistos bovinos de 13-16 dias produzem progesterona, testosterona e estradiol-17 β . Nos dias 16-24 produzem uma glicoproteína de alto peso molecular (720 kd) e outras proteínas menores (24-40 kd), que podem estar relacionadas com o reconhecimento materno da gestação. Também nos dias 16-19 os blastocistos produzem PGF_{2 α} e PGE₂, presentes no fluido uterino.

Na vaca, são observados níveis plasmáticos de progesterona de 6-10 ng/ml desde o dia 14 da gestação até o parto. Também estão presentes os estrógenos, principalmente estrona sulfato (E₁-SO₄) no fluido alantóico bovino.

O nível dos estrógenos aumenta gradativamente desde 30-60 pg/ml antes do dia 60, até aproximadamente 500 pg/ml no dia 100. Por volta do dia 150 ocorre uma elevação maior alcançando 3000 pg/ml. Depois, o nível é variável tornando a aumentar cerca do dia 240 e mantendo este nível até o parto. A conjugação dos estrógenos placentários com sulfato, reduz sua atividade biológica.

Não está completamente elucidado o significado dos picos estrogênicos no início da gestação, fato que pode estar relacionado com a apresentação morte embrionária precoce.

Os estrógenos na vaca têm ação luteolítica quando administrados no dia 13 do ciclo estral por causar elevação de PGF_{2 α} . O conceptus altera o padrão de secreção da PGF_{2 α} do endométrio no sentido de inibir a secreção pulsátil deste hormônio no início da gestação.

A glândula adrenal e a placenta bovinas podem sintetizar progesterona e são capazes de manter a gestação a partir do dia 200. A elevada concentração de progesterona e estrógenos placentários durante a gestação inibe a secreção de LH, evitando posteriores ovulações.

Os valores de LH durante a gestação são de 0,7 a 1,0 ng/ml. O nível de prolactina plasmática é mantida em 80 ng/ml durante a gestação, mas aumenta 2 semanas antes do parto a picos de até 200-400 ng/ml no momento do parto. A PGF_{2 α} aumenta no plasma materno uma semana antes do parto, tendo um pico antes do parto coincidente com a queda drástica da

progesterona.

VI.1.5.2. Hormônios da gestação na ovelha.

É encontrada estrona (E₁) na veia útero-ovárica da ovelha durante os dias 13 a 17 do ciclo estral e da gestação, ocorrendo valores mais altos nas ovelhas gestantes. O blastocisto ovino produz proteínas, entre outras a proteína trofoblástica ovina-1 (oTP-1), a qual tem 17 kd e um pI de 5,5. A oTP é secretada entre os dias 12 a 21 da gestação e é a responsável pela manutenção do corpo lúteo da gestação. O corpo lúteo é requerido para a manutenção da gestação na ovelha até o dia 60, a partir do qual a progesterona placentária é suficiente para este efeito.

O conceptus ovino parece provocar uma diminuição da secreção de ocitocina, tanto de origem ovariana como neuro-hipofisiária, e também reduz o número de receptores para ocitocina no endométrio. Esses fatos têm a ver com a diminuição da secreção de PGF_{2 α} do endométrio no início da gestação para evitar a luteólise. O blastocisto ovino produz PGE₂, a qual está possivelmente envolvida na manutenção da gestação por mecanismos luteotróficos.

A concentração de progesterona plasmática nas ovelhas gestantes está por volta de 2-3 ng/ml até o dia 50. Depois do dia 60 de gestação, os níveis de progesterona começam a aumentar, devido à produção deste hormônio por parte da placenta, atingindo níveis entre 12 e 20 ng/ml até o dia 140, a partir do qual começa a diminuir progressivamente até chegar no parto com teores de 1 ng/ml. No terço final da gestação, a ovariectomia não causa aborto na ovelha.

A concentração de estrona (E₁) é baixa entre os dias 20 a 110 da gestação na ovelha (50 pg/ml). Depois, aumentam até 100 a 400 pg/ml para voltar a cair no parto. Os níveis de estradiol (E₂) seguem o mesmo padrão, porém 50% menores que os de E₁.

VI.1.5.3. Hormônios da gestação na porca.

Na porca, o corpo lúteo é essencial para o manutenção da gestação. A ovariectomia causa aborto em 24 a 36 horas. Os níveis plasmáticos de progesterona são de 30-40 ng/ml no dia 12-13 de gestação e diminuem para 10-25 ng/ml até o dia 100, continuando o declínio lentamente até o parto, quando os níveis caem para menos de 1 ng/ml.

Os níveis de estrógenos são baixos até o dia 24 de gestação (20 pg/ml), subindo depois para 100 pg/ml até o dia 90 e a 3000 pg/ml até 10 dias antes do parto. O embrião suíno entra no útero em estágio de 4 células e chega a blastocisto no 5º dia, perdendo a zona pelúcida no dia 6-7, quando começa uma rápida elongação, concomitante com uma alta produção de estrógenos. A alta quantidade de estrógenos produzida pelo embrião suíno é inativada mediante sua conjugação com sulfato, principalmente na forma de estrona-sulfato (E_1-SO_4). Os estrógenos sulfatados podem ser atacados por sulfatases que liberam o sulfato deixando o estrógeno biologicamente ativo. Alguns tecidos que requerem estímulo estrogénico para crescimento, têm atividade da enzima sulfatase, como por exemplo o endométrio.

O conceptus suíno secreta várias proteínas. Inicia o dia 10-12 com um grupo de proteínas de baixo peso molecular (20-25 kd) e baixo ponto isoelétrico ($pI= 5,6-6,2$), seguindo no dia 13-16 com uma proteína maior (35-50 kd) e mais básica ($pI= 8,0$) e com uma glicoproteína de elevado peso molecular (660 kd) que contem 50% de carboidratos. Também secreta $PGF_{2\alpha}$ e PGE_2 , as quais contribuam a manter o meio ambiente uterino adequado para o crescimento fetal.

Diferentemente de outras espécies, o estrógeno na porca não é luteolítico e sim luteotrófico. Embora a $PGF_{2\alpha}$ produzida no endométrio seja luteolítica na porca, a concentração local de estrógenos faz com que essa prostaglandina se mobilize, mediante um mecanismo desconhecido, em direção ao lúmen uterino (direção exócrina) em vez de ir para o estroma e a vasculatura associada (direção endócrina). Também há evidência da ação luteotrófica direta dos estrógenos no corpo lúteo suíno, o que foi provado aplicando uma injeção de dietilestilbestrol no dia 11 do ciclo estral e prolongando a vida do corpo lúteo. Também, porcas tratadas com valerato de estradiol os dias 11-15 do ciclo estral diminuíram os picos de $PGF_{2\alpha}$ entre os dias 12-20.

VI.1.5.4. Hormônios da gestação na égua.

Na égua, os cálices do endométrio iniciam a secreção de gonadotropina coriônica equina (eCG) cerca do dia 40 da gestação. Esse hormônio induz o crescimento de folículos que posteriormente se luteinizam para formar corpos lúteos acessórios, os quais são ativos até o dia

180 da gestação. A secreção de eCG declina por volta do dia 120 da gestação. Na segunda metade da gestação a biossíntese de progesterona é por conta da placenta e menos dos ovários.

VI.1.6. Hormônios de origem placentária e seu papel na gestação.

A placenta é um órgão endócrino que secreta vários hormônios, entre os quais estão os seguintes:

(a) prostaglandinas, que afetam o fluxo sanguíneo ao útero devido a seu efeito sobre as arteríolas. As PGE_1 e PGE_2 são vasodilatadoras, enquanto que a $PGF_{2\alpha}$ é vasoconstritora. Os estrógenos estimulam a produção de PGEs e $PGF_{2\alpha}$ e também de noradrenalina, que é vasoconstritora. A interrelação entre PGs, catecolaminas e esteróides sexuais parece regular o fluxo sanguíneo ao útero durante a gestação. As PGs também promovem a proliferação celular mediadas pelo AMP cíclico (cAMP) e estimulam a biossíntese de esteróides.

(b) esteróides, principalmente estrógenos e progesterona, os quais têm efeito estimulatório sobre a biossíntese de proteínas. Os estrógenos também têm efeito estimulatório sobre a irrigação sanguínea ao útero.

(c) lactógeno placentário (somatomamotropina), que tem sido identificado na ovelha (oLP) e na vaca (bLP), sendo produzido pelo placentoma. Tem atividade de prolactina e de somatotropina. O oLP é detectável aos 48-50 dias de gestação, aumentando seus níveis até 400 vezes no dia 140, para depois diminuir antes do parto. Embora não seja detectado no plasma materno no dia 16-17 da gestação, tem sido encontrado nos blastocistos. O bLP tem níveis de 50 ng/ml no sangue periférico antes do dia 160, incrementando seus níveis para 1000 ng/ml desde o dia 200 até o parto. O lactógeno placentário tem sido invocado no estímulo do crescimento embrionário e fetal, no desenvolvimento da glândula mamária e na esteroidogênese no ovário e na placenta. É possível também que tenha efeito luteotrófico cerca do dia 14 de gestação na ovelha. Aparentemente, tanto o LH quanto a prolactina são requeridas para o manutenção do corpo lúteo da gestação. Na ovelha, esta dependência ocorre até o dia 60, a partir do qual esta função é tomada pelo feto, através da oLP.

(d) gonadotropinas coriônicas: até agora identificadas a equina (eCG) e a humana (hCG), a primeira secretada entre os dias 40 a 180 de gestação e a segunda depois do dia 18.

VI.1.7. Secreções uterinas durante a gestação.

Na porca, o útero secreta a uteroferrina, uma glicoproteína produzida por estímulo da progesterona, com peso molecular de 35 kd e pI de 9,7. Possui um núcleo de ferro e tem atividade enzimática de fosfatase. Sua função mais aparente é transportar ferro das glândulas uterinas para o conceptus, durante a biossíntese de hemoglobina.

Outras secreções uterinas são proteínas transportadoras, enzimas hidrolíticas e proteínas reguladoras, tais como inibidores da proteólise. A cor do fluido uterino é atribuído à riboflavina. Na ovelha, foram encontrados dois polipeptídeos básicos de 57 e 59 kd, induzidos por progesterona e com aparentes ações imunossupressoras.

Na vaca, foram achadas pelo menos 9 proteínas não séricas no útero. Duas delas têm atividade de fosfatase ácida e de lactoferrina. A primeira tem um pI= 9,7, igual à uteroferrina suína, e a segunda tem propriedades bacteriostáticas.

Glicose e frutose aparecem no útero com níveis que aumentam com o avanço da gestação. A interconversão entre glicose 6-fosfato e frutose-6-fosfato pela glicose-6-fosfato isomerase parece estar controlada pelos estrógenos. A frutose é preferivelmente metabolizada via pentosas-fosfato para gerar NADPH, necessária nos processos biossintéticos nos tecidos proliferativos. Também aparece ácido ascórbico no fluido uterino, com aparentes efeitos moduladores sobre a síntese de colágeno e de catecolaminas e sobre a absorção e metabolismo do ferro, além de ter efeito de economia das vitaminas A e E por suas propriedades antioxidantes.

VI.1.8. Imunologia da gestação.

A inseminação, a implantação e a placentação representam uma intromissão de material alogênico e antigênico na mãe. A progesterona, como principal hormônio da gestação, tem sido proposta como o fator que diminui a resposta imune da mãe para o embrião em desenvolvimento. Várias teorias são consideradas sobre os mecanismos pelos quais a unidade feto-placentária constitui uma exceção do ponto de vista imunológico. Aparentemente a progesterona deve induzir local e temporariamente a produção de moléculas imunossupressoras.

Do ponto de vista evolutivo, a unidade feto-placentária é uma estrutura que deve permitir: (a) o transporte de substâncias entre a mãe e o feto; (b) a regulação de gradientes osmóticos; (c) a manutenção dos diferentes ambientes internos na mãe e no feto; e (d) a integridade das proteínas membranares de forma a não provocar respostas imunes com efeitos citotóxicos. Idealmente, devem ser produzidas substâncias imunossupressoras na interfase materno-placentária que tenham uma meia-vida muito curta. Em roedores, foi observado que o número de leucócitos no útero é dependente do estado hormonal. Assim, sob efeito estrogênico, há aumento de eosinófilos e neutrófilos, sendo inibido por efeito da progesterona ou de glucocorticóides. Também foi observado aumento no número de monócitos uterinos quando a progesterona cai depois do parto. A progesterona aparentemente inibe a transição de monócitos para macrófagos.

A progesterona teria efeitos similares aos glicocorticóides, embora mais fracos ou com doses maiores. Estudos *in vitro* mostram que a progesterona inibe a ativação dos linfócitos T em quantidades maiores do que as encontradas no plasma, o que sugere um efeito local, sendo este efeito reversível. O mecanismo parece ser por redução da biossíntese de DNA e por bloquear a entrada de nucleotídeos precursores na célula.

A progesterona é a substância com maior possibilidade de exercer efeito imunossupressor durante a gestação por várias razões:

- (a) é um hormônio presente em praticamente todas as espécies;
- (b) é o único hormônio absolutamente essencial para a manutenção da gestação em todas as espécies;
- (c) tem sido demonstrados efeitos imunossupressores das concentrações de progesterona na placenta;
- (d) tem efeitos imunossupressores mais fracos do que o cortisol; e
- (e) é produzida pelas células trofoblásticas, local alvo do sistema imune materno.

Os embriões expressam os antígenos de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) na etapa de pré-implantação. O MHC é referido como a série de genes que codificam para proteínas encontradas nas superfícies celulares de cada indivíduo. São proteínas altamente polimórficas que definem o fenótipo MHC do indivíduo e estão envolvidas no reconhecimento e a resposta

imune a antígenos forâneos. No camundongo, tem sido encontrados 50 genes que codificam para o MHC. A expressão do MHC no embrião pré-implantado reflete seu amadurecimento imunológico, sendo requisito do mecanismo imunossupressor que impede sua rejeição e permite o desenvolvimento do embrião. É possível que a lise celular seja evitada por baixos níveis de complemento no fluido uterino, o que envolve também a presença de substâncias imunossupressoras. No embrião pré-implantado a integridade da zona pelúcida parece ser importante para evitar a rejeição imune materna.

Outra teoria contempla a “mascaragem” dos antígenos de superfície do trofoblasto mediante glicoproteínas sulfatadas ou receptores para transferrina. Também tem sido proposta a produção de agentes imunossupressores fetais que entrariam na circulação materna, como a α -fetoproteína, bem como a produção materna de agentes imunossupressores que atuam na unidade feto-placentária, tais como corticóides e algumas proteínas plasmáticas (“P-Z”, EPF, α_2 -globulinas).

Por outra parte, alguns pesquisadores assinalam que os mecanismos imuno-regulatórios na gestação não são mais que “ruídos imunológicos” sem nenhuma função biológica, teoria sustentada nos seguintes fatos:

- (a) ocorrem gestações alogênicas consistentemente em mães imunocompetentes;
- (b) os pesos e números de fetos são maiores em gestações alogênicas do que em singênicas;
- (c) as gestações alogênicas induzem respostas imunes a antígenos MHC paternos na mãe; e
- (d) não há evidência de diminuição da resposta imune da mãe durante a gestação. De qualquer forma, os mecanismos imuno-regulatórios que operam durante a gestação alogênica e que contribuem ao desenvolvimento normal da unidade feto-placentária, são muito complexos e obedecem a múltiplas explicações.

VI.1.9. Função da unidade feto-placentária.

A placenta é a fusão das membranas fetais com o endométrio que permite a interrelação fisiológica entre a mãe e o feto, estando unida ao embrião por um cordão de vasos sanguíneos. Existem vários tipos de placentação, definidos pelas camadas que as integram. As camadas completas que separam os sangues materna e fetal são 6:

- (a) endotélio dos vasos sanguíneos do

alantocórion

(b) tecido conectivo do alantocórion

(c) trofoblasto (córion)

(d) endométrio

(e) tecido conectivo uterino

(e) endotélio dos vasos sanguíneos maternos

Os tipos de placentação nas diferentes espécies são classificados em função do número de camadas que integram a unidade feto-placentária, assim:

(a) placentação epitélio-corial difusa: espécies que possuem as camadas 1 a 6 (porca e égua);

(b) placentação epitélio-corial cotiledonária ou sindesmo-corial: possuem as camadas 1 a 5 (ovelha, cabra e vaca); esta placentação está caracterizada pelos placentomas, locais de maior área de contato entre feto e mãe, onde os cotilédones fetais se fusionam com as carúnculas, as quais são projeções especiais da mucosa uterina. Os placentomas são as unidades feto-placentárias funcionais. O número de placentomas é de 90-100 na ovelha e de 70-120 na vaca.

(c) placentação endotélio-corial: possuem as camadas 1 a 4 (cadela e gata); e

(d) placentação hemo-corial: possuem as camadas 1 a 3 (primatas).

Em função da perda de tecido materno no momento do parto, a placentação pode ser:

(a) decidual, com perda de tecidos que pode ser moderada (cadela, gata) ou extensa (primatas); e

(b) não decidual, quando não há perda de tecido (porca, égua, ruminantes).

Nas placentas epitélio-coriais os sangues materno e fetal não se misturam. A irrigação sanguínea na placenta é através das artérias e veias uterinas, e no lado fetal pelas artérias e veias umbilicais. A maioria do fluxo sanguíneo uterino (cerca de 80%) vai para os placentomas e em menor proporção (10-20%) para o endométrio e o miométrio. Do lado fetal, o fluxo sanguíneo umbilical está distribuído em 90% para os cotilédones e 10% para o alantocórion. As artérias umbilicais transportam sangue desoxigenado do feto para a placenta, enquanto que as veias umbilicais levam sangue oxigenado na direção oposta.

A principal função da placenta é separar os organismos materno e fetal. Além disso, tem funções substitutivas do trato gastrointestinal, os pulmões, os rins, o fígado e o sistema endócrino, para atender ao feto. Embora os sangues do feto e da mãe não se misturem, as circulações passam muito perto e acontece troca de oxigênio e

nutrientes. A passagem de substâncias pode ser através de difusão passiva, transporte ativo, fagocitose e pinocitose.

A placenta contém enzimas para a glicólise, o ciclo de Krebs e a via das pentoses-fosfato, sendo portanto autônoma para a obtenção de energia. A hemoglobina (Hb) fetal dos ruminantes tem maior afinidade pelo oxigênio do que a Hb adulta. Assim, a curva de dissociação do oxigênio no sangue fetal está deslocada para a esquerda. Na porca, o sangue materno possui elevados valores de 2,3-difosfoglicerato, o qual faz deslocar a curva de dissociação do oxigênio para a direita, isto é, diminui a afinidade O₂-Hb, facilitando assim uma maior disponibilidade de oxigênio no sangue fetal.

As curvas de dissociação do CO₂ mostram que o sangue fetal tem menos afinidade pelo CO₂ do que o sangue materno, favorecendo o fluxo deste gás na direção materna.

A placenta permite o transporte de glicídios, aminoácidos, vitaminas e minerais para o feto, servindo também de local de armazenamento para glicogênio e ferro. A placenta é permeável a água e a eletrólitos. O ferro é mais abundante no feto do que na mãe, devido à alta taxa de eritropoiese; este mineral se armazena no fígado, o baço e a medula óssea fetais. O cálcio e o fósforo entram no feto por transporte ativo. A glicose atravessa a placenta por meio de um transporte facilitado pois sua concentração no sangue fetal é menor do que na materna (25-60% dos valores maternos).

Nos ruminantes a glicose é rapidamente transformada a frutose, a qual constitui 70% do açúcar sanguíneo fetal, sem que esteja esclarecido o sentido metabólico da alta concentração deste monossacarídeo nestas espécies. Os ácidos graxos livres são transportados por difusão simples ou podem ser sintetizados pelo feto a partir de carboidratos e acetato. As proteínas não podem ser transportadas através da placenta, mas os aminoácidos podem passar por transporte ativo. São encontrados maiores concentrações de aminoácidos no sangue fetal, pois o feto tem uma grande atividade sintetizadora de proteínas. As imunoglobulinas podem ser transportadas através da placenta tão somente nas espécies com placenta decidual. Daí a importância do colostro na transferência de imunoglobulinas nas espécies de placenta epitélio-corial.

VI.2. ENDOCRINOLOGIA DO PARTO.

VI.2.1. Mecanismos do parto.

No parto ocorrem eventos fisiológicos que levam à expulsão do feto e da placenta, após terem atingido seu completo desenvolvimento. Antes de começar o parto, os fetos tomam a posição característica de cada espécie dentro do útero, de forma a ter a menor dificuldade possível para sua saída.

Nas espécies uníparas, o feto está localizado durante a gestação com o dorso sobre o piso do útero (posição ventral). Antes do parto, faz uma rotação para cima deixando suas extremidades anteriores e seu rosto orientado para o canal pélvico materno (posição dorsal). A apresentação anterior é mais comum nos ruminantes (70-95%) e nas éguas (99%). Nas porcas, a apresentação pode ser anterior ou posterior (50%).

Na vaca, 60% das gestações se desenvolvem no corno direito. Nesse animal, o peso do útero com o feto e os líquidos no final da gestação está entre 40 a 80 kg e o volume de líquidos chega a 55 l, sendo estes valores menores nas primíparas do que nas pluríparas.

O período anterior ao parto (período prodrômico) está caracterizado pelo relaxamento dos ligamentos pélvicos, o que provoca o levantamento da raiz da cauda e pelo edema na região perineal, na glândula mamária e as vezes no piso abdominal. O edema e as variações nas fibras de colágeno são devidas a altos níveis de estrógenos de origem placentária, bem como à relaxina de origem ovariana.

O período prodrômico pode durar até 3 semanas. Desde o sétimo mês da gestação pode ocorrer uma secreção mucosa que sai pela vagina e que aumenta na medida que o parto fica mais próximo. Poucas horas antes do parto, a secreção fica mais líquida, o animal se torna inquieto, se isola e bate no abdome com as patas. Geralmente, o parto ocorre à noite (67% dos bovinos).

O parto pode ser dividido em três fases:

(a) fase de dilatação, na qual o cérvix fica dilatado e começam as contrações uterinas pela ação da ocitocina. O alantóides sai pela comissura vulvar para depois romper-se; logo depois ocorre a saída e ruptura do amnios para lubrificar o canal genital. Esta fase pode durar entre 2 a 8 horas, tendo menor duração na égua, seguida da ovelha e da vaca e com maior duração na porca. A frequência das contrações uterinas é de 15 minutos.

(b) fase de expulsão do feto, quando aumentam a

frequência e a intensidade das contrações uterinas, graças à ocitocina. A prensa abdominal também ajuda nas contrações (reflexo Fergusson), as quais começam a ocorrer a cada minuto. Esta fase pode durar de 30 minutos a 3 horas, com menor duração na égua e na ovelha e maior na vaca e na porca. Se não houver expulsão do feto após o tempo limite (3 horas) é considerado como atraso no parto ou parto distócico. O cérvix começa a fechar 6 horas após a ruptura alantóidea. A distensão vaginal constitui o estímulo principal para a secreção de ocitocina, a qual é importante durante esta fase.

(c) fase de expulsão da placenta, a qual pode durar até 12 horas após a expulsão do feto. A duração mais comum é entre 2 a 6 horas, durando menos na égua e na porca e mais na vaca e na ovelha. Se não ocorre saída total da placenta depois de 12 horas é considerada retenção placentária, evento observado em 10% dos partos em bovinos, sendo muito rara nos ovinos e nos equinos. Experimentalmente pode ser induzida retenção placentária com corticosteróides. O possível mecanismo da expulsão placentária envolve isquemia do endométrio e posterior descolamento das vilosidades coriônicas. As contrações uterinas também ajudam na expulsão da placenta.

O início do parto está regulado por uma complexa interação de fatores endócrinos, mecânicos e neurais. Entre os mecanismos mais importantes que desencadeiam o parto estão considerados os seguintes:

(a) Amadurecimento fetal, que está em estreita relação com a amadurecimento do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal do feto. Em 1965, Liggins propôs a hipótese de que a ACTH e os glicocorticóides de origem fetal eram os responsáveis pelo desencadeamento do parto. Em 1968, Thoburn mostrou que a concentração de cortisol fetal aumentava enormemente nas duas últimas semanas antes do parto, fato que coincidia com uma queda súbita da progesterona plasmática materna. Estudos complementares mostraram a prolongação da gestação em ovelhas que consumiam a planta *Veratrum californicum*, que tem efeitos teratogênicos e causa atrofia da pituitária fetal, prejudicando a produção de ACTH.

(b) Fatores mecânicos, gerados pelo crescimento fetal provocando a distensão do útero, evento que estimula a secreção de PGF uterina, aumenta a irritabilidade do endométrio e favorece as contrações uterinas. O sistema nervoso central

não é completamente necessário para o desencadeamento do parto, pois a denervação ou bloqueio do sistema não inibe o parto. O fator mecânico é um reflexo neuro-endócrino que também favorece a secreção de ocitocina.

(c) Mecanismos endócrinos materno-fetais, que afetam o complexo luteotrófico (LH, prolactina e lactógeno placentário), o qual é responsável pela manutenção da gestação mediante estímulo sobre o corpo lúteo para a produção permanente de progesterona. O lactógeno placentário (PL) tem funções similares ao LH e à prolactina, atuando como modulador da ação do LH. Aparentemente os corticóides fetais teriam efeito inibitório sobre a biossíntese de PL, diminuindo a secreção de progesterona. A progesterona durante a gestação está exercendo um efeito inibitório sobre a biossíntese de receptores de estradiol em nível do útero e da placenta para proteger esses órgãos dos efeitos estrogênicos. Inibida a secreção de progesterona no corpo lúteo pelo efeito luteolítico dos corticóides, ocorre desbloqueio da inibição que a progesterona exerce sobre a biossíntese de receptores de estradiol no endométrio. O estradiol atua disparando a biossíntese de receptores de ocitocina. A ocitocina de origem ovariana atua provocando a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no endométrio, a qual potencializa o efeito luteolítico. A síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é aumentada pelos altos níveis de estradiol de origem placentária e pelo desbloqueio na biossíntese de receptores de estradiol. Os estrógenos também ajudam na separação da placenta, por provocar o rompimento de lisossomos e a consequente liberação de hidrolases.

Outros efeitos dos estrógenos sobre o útero são o estímulo do crescimento do miométrio e da síntese de actomiosina, aumentando a capacidade contrátil, o favorecimento da repolarização do potencial de membrana do miométrio e, sobre o canal genital, o relaxamento do cérvix e da vagina, ação sinergizada com a relaxina, de origem ovariana. A relaxina, secretada pelo corpo lúteo, aumenta um dia antes do parto para relaxar a sínfise púbica e expandir o canal genital, função sinergizada pelos estrógenos, a prostaglandina e a ocitocina. A secreção da relaxina é estimulada pela $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esta última também exerce *feedback* positivo sobre a ocitocina. Todas essas ações conjuntas levam a estimular a contração uterina. Por outra parte, ocitocina, $\text{PGF}_{2\alpha}$ e estradiol, regulam a concentração de cálcio intracelular e contribuem para a estimulação da

miosina-quinase, enzima que ativa a miosina na fibra muscular uterina.

A progesterona exógena não pode bloquear o parto já desencadeado, aparentemente porque é rapidamente metabolizada a estradiol, graças aos corticóides. A queda dos níveis de progesterona também tem efeitos sobre o útero, pois permite a contração miometrial, que estava bloqueada pela progesterona e permite a ação da ocitocina. A ocitocina atua sempre após estimulação das células pelo estradiol, pois este estimula a síntese de receptores de ocitocina. O mecanismo pelo qual a progesterona bloqueia a contração uterina, continua desconhecido.

A pergunta ainda vigente é: porque os corticóides fetais inibem a produção do lactógeno placentário? Por outra parte, além do efeito sobre o LP, os corticóides também estimulam a conversão de progesterona placentária em estradiol mediante a ativação da enzima 17 α -hidroxilase e o sistema aromatase, o que se traduz em elevação do nível de E₂ e o consequente estímulo da síntese de PGF_{2 α} reforçando os processos de luteólise e de contração uterina.

Os glicocorticóides fetais também têm efeito sobre os alvéolos pulmonares, diminuindo a tensão superficial e facilitando a respiração do neonato.

VI.2.2. Indução do parto.

Induzir o parto resulta útil para agrupar os partos ou para encurtar uma gestação com fetos muito grandes e evitar distócias. Tem sido usados glicocorticóides sintéticos como a dexametasona, PGF_{2 α} , ocitocina, estrógenos e drogas parasimpático-miméticas.

A dexametasona exerce sua ação através da indução da síntese de estrógenos para provocar o parto em vacas, ovelhas, cabras e éguas. Na vaca, o período ideal de indução é uma semana antes do parto normal. Quando o parto se induz depois de que os níveis de estrógenos estão elevados, é melhor utilizar glucocorticóides (10-30 mg im de dexametasona induzem o parto em 72 horas).

O principal problema que é observado com os corticóides, especialmente antes de que os níveis estrogênicos estejam altos, é a retenção placentária (90% dos casos), a qual parece diminuir quando os glicocorticóides se usam associados com estradiol. Na ovelha, raramente ocorre retenção placentária. Nesta espécie, a PGF_{2 α} induz o parto em 32 $\pm$ 14 horas.

A ocitocina só pode ser usada para induzir o parto quando o cérvix já está dilatado; do contrário pode ocorrer ruptura do útero. Seu uso está limitado nas éguas. O dietilestilbestrol causa aborto no primeiro trimestre da gestação, mas no 2º e 3º trimestres sua eficácia diminui.

VI.3. Referências bibliográficas.

- Agarwal, S.P., Agarwal, V.K. & Ahmad, A. Studies on steroid hormones: 3. serum progesterone concentrations in zebu cows during pregnancy. *Indian J. Anim. Sci.* 50 (9): 706-709. 1980.
- Ayalon, N. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54: 483-493. 1978.
- Badinga, L., Collier, R.J., Thatcher, W.W. & Wilcox, C.J. Effect of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *J. Dairy Sci.* 68: 78-85. 1985.
- Bazer, F.W. & First, N.L. Pregnancy and parturition. *J. Anim. Sci.* 57 (suppl.2): 425-460. 1983.
- Diskin, M.G. & Niswender, G.D. Effect of progesterone supplementation on pregnancy and embryo survival in ewes. *J. Anim. Sci.* 67: 1559-1563. 1989.
- Diskin, M.G. & Sreenan, J.M. Progesterone and embryo survival in the cow. In: *Embryonic mortality in farm animals*. (Eds.) J.M. Sreenan, Diskin, M.G. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. 1986.
- Dreiling, C.E., Carman, F.S. & Brown, D.E. Maternal endocrine and fetal metabolic responses to heat stress. *J. Dairy Sci.* 74: 312-327. 1991.
- Eissa, H.M. & O-Belely, M.S. Sequential changes in plasma progesterone, total oestrogens and corticosteroids in the cow throughout pregnancy and around parturition. *Br. Vet. J.* 146: 24-26. 1990.
- Eley, R.M., Thatcher, W.W., Bazer, F.W. & Fields, M.J. Steroid metabolism by the bovine uterine endometrium and conceptus. *Biol. Reprod.* 28: 804-816. 1983.
- Ferrell, C.L. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. growth of tissues of the gravid uterus. *J. Anim. Sci.* 69: 1945-1953. 1991.
- Ferrell, C.L. Maternal and fetal influences on

- uterine and conceptus development in the cow: II. blood flow and nutrient flux. *J. Anim. Sci.* 69: 1954-1965. 1991.
- Ferrell, C.L., Ford, S.P., Prior, R.L. & Christenson, R.K. Blood flow, steroid secretion and nutrient uptake of the gravid bovine uterus and fetus. *J. Anim. Sci.* 56 (3): 656-667. 1983.
- Fleming, S.A., van Camp, S.D. & Chapin, H.M. Serum progesterone determination as an aid for pregnancy diagnosis in goats bred out of season. *Can. Vet. J.* 31: 104-107. 1990.
- García, M., Geisurt, R.D., Zavy, M.T. & Biggers, B.G. Effect of heat stress on conceptus and uterine secretion in the bovine. *Theriogenology* 29: 1075-1082. 1988.
- Gustafsson, H., Larsson, K., Kindahl, H. & Madej, A. Sequential endocrine changes and behaviour during oestrus and metoestrus in repeat breeder and virgin heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 10: 261-273. 1986.
- Hickey, G.J. Pregnancy diagnosis in dairy cattle: present status and future prospects. *Cornell Vet.* 80 (4): 299-302. 1990.
- Kastelic, J.P., Northey, D.L. & Ginther, O.J. Spontaneous embryonic death on days 20 to 40 in heifers. *Theriogenology* 35: 351-363. 1991.
- Kumar, S., Agarwal, S.K. & Prakash, R. A note on factors affecting gestation period in nondescript rural bovines. *Indian Vet. J.* 64: 441-442. 1987.
- Liggins, G.C., Kitterman, J.A. & Forster, C.S. Fetal maturation related to parturition. *Anim. Reprod. Sci.* 2: 193-207. 1979.
- Mirando, M.A., Ott, T.L., Harney, J.P. & Bazer, F.W. oTP-1 inhibits development of endometrial responsiveness to oxytocin in ewes. *Biol. Reprod.* 43: 1070-1078. 1990.
- Pimentel, S.M., Pimentel, C.A., Weston, P.G., Hixon, J.E. & Wagner, W.C. Progesterone secretion by the bovine feto-placental unit and responsiveness of corpora lutea to steroidogenic stimuli at two stages of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 47 (9): 1967-1971. 1986.
- Pope, W.F. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol. Reprod.* 39: 999-1003. 1988.
- Remsen, L.G. & Roussel, J.D. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology* 18 (3): 365-372. 1982.
- Roberts, R.M., Schalue-Francis, T., Francis, H. & Keisler, D. Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. *Theriogenology* 33: 175-183. 1990.
- Ruiz, F.J., Oltenacu, P.A. & Smith, R.D. Evaluation of on-farm milk progesterone tests to determine nonpregnant cows and to prevent insemination errors. *J. Dairy Sci.* 72: 2718-2727. 1989.
- Sasser, R.G. & Ruder, C.A. Detection of early pregnancy in domestic animals. *J. Reprod. Fertil. suppl.* 34: 261-271. 1987.
- Stites, D.P. & Siiteri, P.K. Steroids as immunosuppressants in pregnancy. *Immunol. Rev.* 75: 117-138. 1983.
- Thatcher, W.W., Wilcox, C.J., Collier, R.J., Eley, D.S. & Head, H.H. Bovine conceptus-maternal interactions during the pre-and postpartum periods. *J. Dairy Sci.* 63: 1530-1540. 1980.
- Thornburn, G.D. Physiology and control of parturition: reflections on the past and ideas for the future. *Anim. Reprod. Sci.* 2: 1-27. 1979.
- Weesner, G.D., Norris, T.A., Forrest, D.W. & Harms, P.G. Biological activity of LH in the peripartum cow: least activity at parturition with an increase throughout the postpartum interval. *Biol. Reprod.* 37: 851-858. 1987.

VII. ENDOCRINOLOGIA DO PÓS-PARTO E DA LACTAÇÃO

VII.1. Endocrinologia do pós-parto.

O pós-parto ou puerpério é um estado fisiológico que se inicia com o parto e termina com a involução completa do útero e a reativação cíclica do ovário, ou seja, com a capacidade para ficar gestante novamente. Nas vacas, a duração desta fase é afetada por diversos fatores, entre os quais estão a raça, o tipo de produção (leite ou corte), a idade, o número de partos, o grau de dificuldade no parto, a condição corporal ao parto, o manejo nutricional e reprodutivo durante o pós-parto, a estação climática em que ocorreu o parto, o nível de produção de leite, a amamentação e as doenças puerperais. Nas éguas frequentemente se realizam coberturas precoces após o parto. Nessa espécie o puerpério é equivalente ao período aberto, isto é, o período entre o parto e a seguinte concepção.

VII.1.1. Involução uterina.

Logo após o parto, o útero bovino mede aproximadamente 1 m e pesa cerca de 10 kg, sendo o corno uterino que manteve a gestação consideravelmente maior que o corno oposto. A involução uterina, necessária para o restabelecimento da atividade reprodutiva no pós-parto, está caracterizada pela volta ao tamanho normal do útero, o que depende das contrações uterinas adequadas, a eliminação de infecção bacteriana e a regeneração microscópica do endométrio. Na vaca, a involução uterina macroscópica é completada por volta dos 20-30 dias pós-parto, sendo detectada mediante palpação retal. Nesse momento ocorre aumento do tônus uterino e saída total do lóquios (muco, sangue, restos de membranas e fluídos fetais).

O útero involuído pesa aproximadamente 1 kg e tem um diâmetro de 5 cm. No entanto, o tamanho do útero involuído sempre é um pouco maior do que na gestação anterior, considerando que por cada gestação o útero aumenta 100 g de peso e 1 cm de diâmetro. Nas espécies de placentação difusa, a involução se completa mais rapidamente que nas espécies de placentação cotiledonária. Em 2 a 3 semanas o endométrio da porca e da égua estão regenerados.

A involução microscópica ou recuperação do endométrio, necessária para a preparação de uma nova gestação, é observada na vaca por volta de 35 a 40 dias pós-parto, havendo uma recuperação mais rápida nas vacas primíparas do que nas pluríparas. Em média, a involução uterina total nos ruminantes é completada em 40 a 50 dias após o parto, podendo aumentar por

endometrite. As vacas de corte têm intervalos mais curtos de involução uterina, fato atribuído a um efeito positivo da amamentação sobre a recuperação do útero.

São frequentes as infecções uterinas no pós-parto devido a bactérias (*E. coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *C. pyogenes*, *F. necrophorus*), embora na maior parte dos casos estas podem ser autoeliminadas no processo da involução uterina, graças ao aumento do tônus uterino e a atividade estrogênica dos ovários.

As contrações uterinas após o parto, que garantem a involução uterina, são provocadas pelos elevados níveis de prostaglandina $F_{2\alpha}$, os quais são maiores nas espécies com placentação cotiledonária (ruminantes). A maior concentração de prostaglandina E_2 tem sido associada com involução uterina retardada e aumento de infecções puerperais (Slama et al., 1991). Por outro lado, tem sido encontrada relação inversa entre a concentração de prostaglandina $F_{2\alpha}$ e o intervalo do parto à involução uterina, observando-se também que a administração de prostaglandina $F_{2\alpha}$ acelera a involução uterina (Lindell & Kindahl, 1983). Também existem evidências de que a administração de prostaglandina $F_{2\alpha}$ em vacas diminui a incidência de metrite (Ott e Gustavsson, 1981).

VII.1.2. Reativação da atividade ovariana.

Na maioria das espécies mamíferas ocorre anestro pós-parto durante a maior parte da época da lactação. Entretanto, o desmame, a seleção genética e a alimentação podem superar o efeito inibitório da lactação sobre o reinício da atividade reprodutiva.

O período entre o parto e a seguinte concepção é conhecido como período aberto ou dias abertos. Este período constitui a etapa fisiológica mais crítica para o desempenho reprodutivo das vacas. É uma época de grandes desafios metabólicos, pois corresponde à máxima produção de leite, à involução uterina e ao retorno aos ciclos estrais.

Idealmente, as vacas devem ter como máximo 100 dias abertos para conseguir intervalos entre partos de um ano aproximadamente, situação que é difícil de obter na prática. As principais limitações para conseguir esta meta, estão relacionadas com os seguintes eventos durante o pós-parto: a involução uterina, a reativação ovárica, a eficiência na detecção deaios, a taxa de partos anormais, o equilíbrio energético na alimentação,

a apresentação de transtornos metabólicos e a taxa de fertilidade.

O desempenho reprodutivo durante o pós-parto também pode ser avaliado pelo período de serviço, isto é, o intervalo entre o parto e o primeiro serviço, que deve ser de até 60 dias na vaca. Nas condições tropicais, são observados valores médios para o período de serviço de 160 dias em vacas holandesas no Brasil, no México e em Cuba. Este valor é menor quando se trata de vacas Pardo Suíço (138 dias) na Venezuela (López, 1986). Na Colômbia, em regiões classificadas como de trópico alto, com intervalos de temperatura ambiental entre 2 a 21°C, foram observados valores entre 131 e 169 dias abertos para a raça holandesa (González et al., 1994).

Estudos no Peru com vacas de diferentes cruzamentos e diferentes condições de manejo, mostram que a amamentação, a restrição alimentar e a maior proporção de sangue zebú têm efeitos negativos sobre o intervalo à primeira ovulação (Garcia et al., 1984). Vacas Nelore amamentando tiveram menor taxa de ovulação (11%) do que vacas Nelore em ordenha (84%) a 260 dias pós-parto. A introdução de genes holandeses melhora o comportamento reprodutivo, porém aumenta os problemas de adaptação quando os genes ultrapassam certa proporção de sangue holandês. A melhor proporção de sangue holandês no trabalho mencionado foi 1/2 holandês (80% de ovulação a 58 dias pós-parto) do que 3/4 holandês (55% de ovulação a 123 dias pós-parto).

Em outros países tropicais, são relatados intervalos do parto ao primeiro estro desde 30 dias em vacas Gyr até 106 dias em vacas holandesas e Pardo Suíço. Esta variabilidade reflete as diversas condições que estão afetando a recuperação cíclica pós-parto nas diferentes raças (Galina e Arthur, 1989). É encontrada, porém, uma tendência a mais rápida recuperação nas vacas mestiças *Bos taurus* x *Bos indicus* do que em gado zebú puro e no gado nativo. Na Colômbia, por exemplo, a raça nativa Blancorejinegro (BON), mostrou médias de dias abertos de 92 dias (Gallego, 1988).

A atividade ovariana no pós-parto de vacas leiteiras é iniciada relativamente cedo. É possível encontrar folículos em desenvolvimento desde 10 dias após o parto. Nas raças leiteiras, 40% das vacas ovulam até 15 dias após o parto e 85% até 30 dias, sendo as vacas primíparas mais precoces que as pluríparas. Pode ser estabelecido um período de 24 dias como média do intervalo do

parto à primeira ovulação neste tipo de animal, embora exista uma grande variação individual.

Normalmente o primeiro ciclo estral após o parto é curto, de 10 a 14 dias, e a primeira ovulação geralmente não vem acompanhada de cio evidente, o que se conhece como ovulação silenciosa. Em geral, o primeiro cio evidente no pós-parto de vacas leiteiras ocorre aos 30-40 dias. As manifestações de estro no pós-parto são mais evidentes a medida em que é regularizada a atividade ovariana. As percentagens de vacas com cio evidente são de aproximadamente 23, 36, 66 e 85% para as 1ª, 2ª, 3ª e 4ª ovulações, respectivamente.

A curta duração do primeiro ciclo pós-parto pode ser explicada por alguns dos seguintes eventos: níveis inadequados de LH, falta de progesterona prévia ao ciclo, falha de síntese de receptores de gonadotropinas no ovário, pouca resposta folicular e baixa taxa de ovulação. Uma vaca leiteira normal deve regularizar seus ciclos estrais aos 50 dias pós-parto. Estudos realizados na Inglaterra revelam que pelo menos 23% das vacas são anormais neste sentido (Lamming et al., 1981).

A secreção de LH no pós-parto é inicialmente baixa, começando a aumentar aos 10-20 dias. Já a secreção de FSH aumenta progressivamente desde o primeiro dia pós-parto, tendo valores máximos por volta dos 20 dias, o que favorece o desenvolvimento folicular. Portanto, a secreção de FSH no início do pós-parto não seria limitante para a reativação cíclica, ao passo que a LH deve antes atingir um padrão pulsátil de secreção com aumento na amplitude e na frequência dos picos necessário para o reinício dos ciclos ovarianos. Esse tipo de secreção começa por volta de 20 dias após o parto, graças a mudanças na sensibilidade pituitária ao estímulo hipotalâmico, devidas ao aumento da frequência de secreção de GnRH e/ou por efeito *feedback* positivo do estradiol proveniente dos folículos em desenvolvimento. Entretanto, a secreção pulsátil de LH não vem acompanhada inicialmente do pico pré-ovulatório de LH, que é observado mais tarde. A resposta de LH ao GnRH exógeno, começa a ser evidente depois do dia 20 pós-parto, o que significa que nos primeiros dias do pós-parto ainda não ocorre regularização da população de receptores para GnRH na pituitária (Peters e Lamming, 1990).

No caso das vacas de corte, o intervalo do parto ao primeiro cio pós-parto pode estar entre 50 a 100 dias, dependendo, entre outros fatores,

do manejo reprodutivo e alimentar, da condição corporal ao parto, do clima e da raça. No trópico, este valor pode aumentar para mais de 100 dias. Em vacas Hereford x Friesian, Lamming *et al.* (1981) encontraram reativação ovariana aos 91 dias pós-parto, sendo que 53% destas vacas apresentaram ciclos iniciais curtos. As vacas zebú podem ter períodos abertos curtos (65 a 75 dias) nas condições de América do Norte, com adequada nutrição, porém no trópico este valor pode chegar a ser tão alto quanto 200 ou mais dias. As vacas de corte sofrem frequentemente de aciclia, apesar de encontrar reservas de LH na pituitária nas primeiras semanas do pós-parto (Williams, 1990). O manejo do desmame nas vacas de corte é um fator determinante na duração do anestro pós-parto, pois a amamentação aumenta este intervalo. A prática de diminuir o tempo de amamentação tem demonstrado ser efetiva na redução do intervalo ao primeiro cio.

Nas éguas pode ocorrer cio entre 6 a 13 dias depois do parto. A cobertura nesta época, quando ainda não há completa involução uterina, está caracterizada por uma taxa de concepção baixa e um alto índice de morte embrionária ou abortos.

Na maioria das porcas, o anestro se mantém durante toda a lactação. O cio aparece 3 a 5 dias depois do desmame. Nas ovelhas e cabras, por terem atividade reprodutiva estacional, o período aberto dependerá da época em que ocorreu o parto. Se este ocorrer durante a estação reprodutiva, a concepção pode acontecer em um intervalo tão curto quanto 5 a 6 semanas. Se não, o intervalo pode ser tão longo quanto 10 semanas na ovelha ou até 27 semanas em algumas raças de cabras (Hafez, 1995).

A reativação ovariana pode ser estudada mediante a determinação de níveis de progesterona no sangue, em amostragens com frequência de 2-3 vezes/semana. É considerado que houve ovulação quando se observam concentrações de progesterona >1 ng/ml. Estudos feitos na Colômbia (González *et al.*, 1994) em vacas holandesas de produção média mostraram que vacas com melhor manejo nutricional depois do parto tiveram períodos de serviço mais curtos (77 dias) do que vacas com alimentação inferior (99 dias). O mesmo trabalho sugere que vacas leiteiras com condição corporal ao parto mínima de 2,5/5, não tiveram efeitos negativos sobre a reativação ovariana pós-parto, que ocorreu aos 21 dias, medida por níveis de progesterona.

Um estudo realizado com vacas holandesas no Equador (Jarrín e Villalba, 1984), mostrou que a reativação ovariana, medida por níveis de progesterona no leite, ocorreu 53% antes de 20 dias pós-parto, 27% entre 20 a 30 dias pós-parto e 13% entre 30 a 40 dias pós-parto. O mesmo trabalho mostrou que do total de cios detectados por níveis de progesterona, somente 57% foram detectados pelo pessoal da fazenda.

O perfil prostestacional no sangue ou no leite, portanto, é um exame que pode ser útil não somente para determinar a atividade ovariana, mas também para estudar a eficiência na detecção de estros, a duração dos ciclos estrais, a incidência de cistos ovarianos e como diagnóstico de gestação precoce aos 21 dias pós-serviço.

VII.1.3. Fatores que afetam a duração do pós-parto.

VII.1.3.1. Cistos ovarianos.

No início do pós-parto, é frequente o aparecimento de cistos ovarianos, foliculares ou luteais, especialmente em vacas leiteiras, sendo mais comum naquelas que sofreram retenção placentária, metrite, febre do leite, bem como nas vacas com parto gemelar ou as que tiveram mais de 5 partos. Os cistos foliculares são mais frequentes, mostrando uma incidência de 15% a 30%, sendo maior nas vacas leiteiras de alta produção. Aparentemente são causados por falha na secreção de LH ou por insuficiente número de seus receptores em nível de folículos, o que impede a ovulação. As vacas evidenciam sintomas de cio a intervalos muito curtos e respondem a tratamentos com GnRH.

Os cistos luteais são mais difíceis de diagnosticar e resultam em anestros prolongados, respondendo a tratamentos com prostaglandina F_{2α}. A maioria dos cistos ovarianos desaparecem espontaneamente antes de 2 meses após o parto, mas as vacas que costumam repetir a apresentação de cistos, têm intervalos entre partos mais longos do que aquelas que não reincidem. É recomendável que as vacas com cistos que persistem além dos 30 dias pós-parto sejam tratadas.

VII.1.3.2. Amamentação.

A amamentação afeta negativamente o período de serviço e o número de dias abertos, fato que tem especial importância nas vacas de corte e nas vacas mestiças, bastante utilizadas nas condições tropicais. Estudos realizados com raças

leiteiras, mostram o efeito negativo da amamentação sobre a reativação ovárica. Smith *et al.* (1981) estudaram vacas gêmeas encontrando um intervalo do parto ao primeiro cio de 29,5 dias nas que estavam em ordenha, enquanto que suas correspondentes gêmeas que estavam amamentando tiveram um intervalo de 73 dias.

A prolactina tem sido responsabilizada da ação inibitória da amamentação sobre o início da atividade ovárica pós-parto. Entretanto, há evidências que indicam que vacas em ordenha têm níveis de prolactina maiores do que vacas amamentando: Lamming *et al.* (1981) determinaram os níveis de prolactina sanguínea em vacas Friesian amamentando ou em ordenha encontrando maiores níveis do hormônio nas vacas em ordenha, depois do dia 11 pós-parto (Tabela VII-1). Como as vacas em ordenha entram em atividade ovariana antes que as vacas amamentando, foi sugerido que o aumento na secreção de prolactina durante o pós-parto não seria a causa primária do problema do anestro lactacional e que a possível via inibitória da atividade ovariana seja neural via glândula mamária e não hormonal.

Por outra parte, o uso de bromocriptina, agonista da dopamina que é o fator inibidor da secreção de prolactina, em doses de 80 mg por três dias, com a idéia de desbloquear o suposto efeito inibidor da prolactina sobre a ciclicidade ovariana, não mostrou que houvesse redução do intervalo parto-primeiro cio e nem aumento da LH, embora tenha havido diminuição dos níveis de prolactina de 30 a 6,8 ng/ml (Smith *et al.*, 1981).

VII.1.3.3. Nível nutricional.

Os efeitos do nível nutricional são especialmente importantes nas vacas leiteiras, as quais estão submetidas a um desequilíbrio energético no início da lactação, sendo maior nas vacas de maior produção. Os primeiros 2 meses do pós-parto são os mais críticos para as vacas leiteiras de alta e média produção, pois o consumo de alimento é insuficiente para cobrir as necessidades metabólicas, principalmente energéticas, derivadas da síntese do leite. Por outra parte, durante este período a vaca está em processo de recuperação uterina e de reativação ovariana, eventos que causam maiores demandas energéticas. Daí que normalmente ocorra perda de peso nessas vacas nos primeiros 2-3 meses após o parto. A partir do 4º mês, o equilíbrio é

menos negativo e começam a acumular-se reservas energéticas devido à diminuição da produção de leite. No final da lactação e durante o período seco pode ocorrer ganho de peso.

Quanto maior for a perda de peso no início do pós-parto e quanto menores forem as reservas corporais, maior tempo levará para a reativação cíclica do ovário. Geralmente, o equilíbrio energético negativo causa atraso na reativação do ovário com longos períodos de anestro, cios silenciosos, ciclos estrais curtos e com baixa secreção de progesterona e baixas taxas de fertilidade, com aumento de repetição de cios pós-serviço. Em geral, as vacas de maior produção apresentam períodos de serviço mais prolongados, o que pode ter relação com desequilíbrios energéticos ou bem com maior incidência de cistos foliculares.

VII.1.4. Tratamentos para encurtar os dias abertos.

Vários tratamentos tem sido utilizados a fim de reduzir o intervalo parto-concepção. O uso de hormônios para acelerar a reativação ovárica é comum tanto em vacas de corte como de leite. O GnRH sintético (Buserelina) é empregado em dose de 200 µg/vaca 15 dias após o parto, às vezes com repetições para desbloquear o anestro do pós-parto. Alguns autores sugerem que é de especial utilidade em vacas que sofreram retenção placentária e/ou cistos ovarianos.

O dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (PRID) inserido no dia 15 e retirado no dia 27 pós-parto, é usado para induzir a secreção pulsátil de LH. Em alguns casos, também é usada a gonadotropina coriônica equina (eCG) em dose de 750 UI depois de retirar o PRID. Trabalhos na Argentina com gado

Tabela VII-1. Níveis de prolactina (ng/ml) no pós-parto de vacas Friesian amamentando e em ordenha.

Período	Vacas amamentando	Vacas em ordenha
Pré-parto	16	
Parto	140	
Pós-parto		
dias 1-5	58,9	29,1
dias 6-10	20,5	16,4
dias 11-20	16,1	21,8
dias 21-30	10,2	22,6

Fonte: (Lamming *et al.*, 1981)

holandês, mostraram uma redução dos dias abertos com PRID de 79,2 dias nas vacas controle para 65,2 dias nas vacas tratadas (Dick *et al.*, 1984).

Nas vacas de corte, são usadas algumas alternativas para resolver o anestro devido à amamentação, as quais incluem o desmame precoce total e hormônios exógenos, tais como GnRH, prostaglandina $F_{2\alpha}$, implantes de progesterona/estradiol e o desmame temporário. Exemplo desta última prática é separar o bezerro por 48 horas a cada 30 dias a partir de dois meses pós-parto. As respostas a estes tratamentos têm grande interação com a nutrição e a condição corporal.

A prática de limitar a amamentação a 1 hora/dia a partir de 30 dias fazendo o desmame aos 6 meses em vacas zebu nas condições de Cuba, levou a redução do anestro pós-parto de 155 a 99 dias, porém a mortalidade dos bezerros com amamentação restringida foi o dobro comparada com os que tiveram amamentação permanente com desmame aos 6 meses (Brito *et al.*, 1988).

Também tem sido usado implantes de norgestomet/estradiol (Synchro-Mate-B) por 9 dias em vacas de corte com resultados pouco satisfatórios para resolver o anestro pós-parto, embora com resultados positivos para sincronizar ciclos em vacas ciclantes.

VII.2. Endocrinologia da lactação.

A lactação é um estado fisiológico que se inicia com o parto e que pode ser considerado como o último evento do ciclo reprodutivo dos mamíferos. O leite tem como objetivo nutrir ao neonato por um tempo que varia conforme a espécie. Além disto, o colostro é muito importante para a sobrevivência do neonato devido à alta concentração de anticorpos que lhe confere imunidade passiva, especialmente nas espécies de placentação epitélion-corial, como os

ruminantes, a égua e a porca. Nessas espécies, o colostro é produzido nas primeiras 72-96 horas depois do parto. Além de ser fonte de imunoglobulinas, o colostro é também rico em gordura, proteínas e vitaminas, porém é baixo em lactose, quando comparado com o leite (Tabela VII-2). Pelo menos 50% do conteúdo de proteínas do colostro está representado por imunoglobulinas.

O epitélio intestinal do neonato é permeável às imunoglobulinas nas primeiras 12-16 horas de vida, mas essa permeabilidade desaparece após 24 horas. O colostro também é rico em elementos celulares (corpúsculos de Donné).

VII.2.1. Mamogênese: desenvolvimento da glândula mamária.

Na fêmea recém-nascida, a glândula mamária apresenta estruturas similares ao adulto, porém de menor tamanho. Antes da puberdade, praticamente não ocorre crescimento mamário. Chegando a puberdade, com a iniciação dos ciclos estrais, ocorre um leve crescimento da glândula mamária, mas o maior desenvolvimento acontece durante a gestação, quando se formam os dutos inter-alveolares e os alvéolos começam a aparecer. A quantidade de tecido secretor da glândula mamária na vaca aumenta pouco nos primeiros meses de gestação, começando a aumentar a partir do 4º mês. No 5º mês de gestação o tecido secretor substitui o tecido adiposo formando microlóbulos e dutos que vão crescendo durante o resto da gestação. Os tecidos vascular e linfático também vão ocupando espaço de forma que no 9º mês de gestação o alvéolos mostram atividade secretora. Em novilhas ou vacas novas de alta produção, pode ocorrer edema da glândula mamária e do tecido adjacente antes do parto, ao ponto de ocasionar dor e desconforto, necrose da pele e falha na descida do leite. Este fato é devido ao desequilíbrio circulatório causado pelo grande fluxo de sangue à glândula, maior do que o sistema venoso pode comportar. Nesses casos, convém fazer massagens e aplicações quentes e frias e usar drogas anti-inflamatórias leves, além de fazer ordenha prévia e exercício moderado.

O tecido mamário continua a crescer após o parto e alcança o máximo crescimento durante o pico de lactação, sofrendo regressão após esse período. A quantidade de secreção de leite depende do crescimento do tecido epitelial túbulo-alveolar da glândula mamária, processo

Tabela VII-2. Comparação dos componentes (g%) do colostro e do leite na vaca.

Componente	Colostro	Leite
Água	73,3	87,3
Gordura	5,1	3,7
Lactose	2,2	4,8
Proteína	17,6	3,3
Cinzas	1,8	0,9

que está sob controle hormonal. Com as gestações sucessivas, a glândula mamária vai aumentando seu desenvolvimento até atingir seu máximo potencial na 3ª ou 4ª gestação, cujas correspondentes lactações correspondem ao rendimento máximo.

Em 1956 foi proposto que os estrógenos eram importantes no crescimento dos dutos, ao passo que a progesterona promovia o desenvolvimento lóbulo-alveolar. Esse conceito se mantém até hoje, mas foram identificados outros hormônios que também participam do processo, entre eles GH, ACTH e PRL. Existem receptores para estrógenos no citoplasma das células epitélipo-alveolares do tecido mamário, que aumentam em número durante a gestação por efeito da prolactina. A progesterona também possui receptores nas células do tecido mamário, que estão presentes durante a gestação porém ausentes durante a lactação. Aparentemente a ação dos estrógenos precede à ação da progesterona.

O hormônio do crescimento (GH) e a prolactina (PRL) parecem atuar diretamente sobre o tecido mamário, sendo necessários para a ação dos esteróides ováricos. O GH tem mais efeito sobre o sistema canalicular e a PRL sobre o desenvolvimento lóbulo-alveolar. O TSH e o ACTH (hormônios estimuladores da tireóide e do córtex adrenal, respectivamente) atuam indiretamente por estimular a secreção dos hormônios tireoidianos (T_3 e T_4) e os glicocorticóides. Estes dois últimos grupos de hormônios parecem ter uma ação secundária na mamogênese através da promoção de mudanças metabólicas favoráveis para o desenvolvimento do tecido mamário.

A insulina também possui receptores na célula mamária e parece influir positivamente no crescimento do tecido mamário por estimular a mitose e melhorar a utilização da glicose. A relaxina, hormônio peptídico do ovário, parece ter ação sinérgica com os esteróides ováricos no crescimento da glândula mamária.

Na maioria das espécies, o hormônio lactógeno placentário (somatomamotropina), peptídeo estruturalmente análogo à PRL e ao GH, tem ação sinérgica com os estrógenos, a progesterona, a PRL e o GH para o desenvolvimento da glândula mamária durante a gestação. Na cabra e na ovelha, gestações gemelares induzem maior desenvolvimento mamário e portanto maior secreção de leite, devido à maior produção de lactógeno

placentário.

Em animais não gestantes pode ser induzido crescimento mamário com combinações de estrógenos e progesterona, mediante injeções ou implantes por 1 a 3 semanas para induzir a formação de alvéolos e dutos. Após este período, é necessário começar com a ordenha para estimular a produção de leite. A quantidade de leite produzido desta forma é muito variável e o tratamento pode ter como efeito colateral a formação de cistos ovarianos e apresentação de ninfomania.

VII.2.2. Lactogênese: iniciação da lactação.

A unidade anatomo-funcional do tecido mamário secretor é o alvéolo, estrutura sacular cujas paredes estão compostas de células epiteliais secretoras. Cerca de 150 a 220 alvéolos formam o lóbulo, que possui um duto drenado por um duto comum maior. Grupos de lóbulos formam lobos separados por septos de tecido conectivo. Os dutos lobulares confluem a um canal galactóforo que por sua vez desemboca no seio galactóforo, em comunicação com a cisterna da glândula. Cada alvéolo é irrigado por uma rede de capilares que fornece os nutrientes necessários para a síntese do leite. Os elementos contráteis do alvéolo são as células mioepiteliais, as quais são sensíveis à ocitocina. Em volta do alvéolo existe tecido conectivo, que adquire maior proporção durante a involução da glândula mamária.

O processo de lactogênese compreende a diferenciação das células mamárias, as quais passam de um estado não secretor para um estado secretor. Esse processo envolve duas etapas:

- (a) Diferenciação histológica e bioquímica das células epiteliais alveolares, que ocorre durante o terço final da gestação. Estas diferenças podem ser evidenciadas pelo aumento da relação RNA/DNA, que de um valor <1 durante a gestação, passa para 2 no início da lactação, o que indica aumento da síntese de proteínas e pelo aumento do quociente respiratório, que indica aumento da oxidação de substratos energéticos;
- (b) Início da secreção dos produtos do leite, geralmente 1-4 dias antes depois do parto.

A mudança mais evidente na histologia da célula epitelial ocorre na última semana antes do parto. Ocorre acúmulo de gotas lipídicas e presença de vacuolas, contendo micelas de caseína. Seis horas depois do parto, começa a

secreção das gotas lipídicas e das micelas, por um mecanismo ainda desconhecido. Em seguida, e em resposta às mudanças endócrinas que ocorrem após o parto, há uma rápida proliferação do retículo endoplasmático rugoso, do aparelho de Golgi e de mitocôndrias. Este aumento no maquinário ultraestrutural da célula, vem acompanhado de uma onda de divisão mitótica, atingindo sua capacidade máxima de produção vários dias depois do parto.

Na vaca, a atividade enzimática e o nível de metabólitos disponíveis seriam suficientes para iniciar a lactação desde duas semanas antes do parto. Entretanto, o estímulo para o início dessa secreção ocorre com a queda nos níveis de progesterona que acontece com o parto. As mudanças nos níveis de glicocorticóides e PRL parecem contribuir mais com o alto conteúdo de enzimas nas células mamárias do que com o efeito “disparador” da lactação. Portanto, os requerimentos hormonais mínimos para a lactogênese envolvem o aumento nos níveis de PRL, glicocorticóides e estradiol, bem como a diminuição de progesterona.

Parece que uma das funções da PRL é estimular a expressão dos genes da caseína e outras proteínas. Entre outras funções da PRL estão o aumento das membranas do aparelho de Golgi e a indução da síntese de α -lactalbumina, lactose e gordura do leite. Embora aconteça secreção de PRL durante a gestação, os altos níveis de estrógenos e de progesterona inibem os receptores de PRL no tecido mamário, protelando a lactogênese até que os níveis desses esteróides declinem no período do periparto. A PRL parece exercer sua função lactogênica mediante a indução da diferenciação bioquímica nas vias metabólicas envolvidas na síntese do leite.

Embora a PRL parece ser essencial para a expressão máxima do processo lactogênico, ele não é o único hormônio responsável pela lactogênese. Estudos revelam que a inibição da secreção de PRL mediante alcalóides do ergot, como a bromocriptina, mantém ainda a lactação em 55% do normal (Tucker, 1988).

O controle mais importante da secreção e liberação de PRL é através da dopamina, neurotransmissor que exerce efeito inibitório sobre as células lactotróficas da hipófise. O stress tem sido considerado como fator que aumenta os níveis de PRL, talvez através da inibição da dopamina. Por outra parte, o estímulo da amamentação diminui os níveis de dopamina e, portanto, aumenta a secreção de PRL. Os

hormônios tireoidianos e os estrógenos também estimulam a secreção de PRL.

Existe influência sinérgica com a PRL para a secreção do leite por parte da ACTH e dos hormônios tireoidianos. O efeito lactogênico do ACTH está mediado pela estimulação da secreção de glicocorticóides. A função dos glicocorticóides parece estar na indução da diferenciação do retículo endoplasmático rugoso e do aparelho de Golgi, bem como no aumento dos níveis de mRNA. O cortisol é essencial para que a PRL possa estimular a expressão do gene da caseína e outros genes. A concentração de glicocorticóides permanece baixa durante a gestação, mas nos dias anteriores ao parto sofre um marcado aumento que tem seu pico no momento do parto. A concentração da proteína transportadora de glicocorticóides (CBG) diminui antes do parto, permitindo a maior disponibilidade dos glicocorticóides para sua ação no tecido mamário.

A secreção de lactógeno placentário, que é iniciada no meio da gestação, diminui antes do parto sendo pouca ou nula a sua participação no processo lactogênico. A ação do lactógeno placentário está mediado pelo receptor para PRL e é inibida pelas elevadas concentrações de progesterona, a qual é comprovadamente inibidora dos receptores de PRL.

A progesterona é inibitória sobre a lactogênese. O efeito negativo da progesterona parece consistir em sua união aos receptores dos glicocorticóides na célula mamária e em aumentar a proporção de corticóides ligados à CBG, diminuindo a quantidade deles livres para atuar na célula. Na vaca, ocorre uma marcada diminuição de progesterona 24-48 horas antes do parto, coincidindo com o estágio inicial da lactogênese. Na mulher, entretanto, os altos níveis de progesterona persistem por várias horas após o parto, retardando o início da lactação. Portanto, a diminuição da secreção de progesterona está intimamente associada à indução da secreção de leite. Contudo, assim que a glândula mamária completa sua diferenciação e inicia sua atividade secretora, a progesterona perde a capacidade inibitória sobre a lactação.

Os estrógenos também parecem estimular a produção de leite sem que se saiba o mecanismo exato. Os estrógenos e os glicocorticóides aumentam o número de receptores para PRL nos alvéolos mamários de forma a contribuir para a resposta do tecido mamário tanto da PRL como dos próprios

glicocorticóides.

As prostaglandinas também têm participação na lactogênese. Como a prostaglandina $F_{2\alpha}$ é luteolítica, tem sido relacionada com a resposta lactogênica por causar diminuição de progesterona. O complexo lactogênico está, portanto, formado por PRL, GH, glicocorticóides, hormônios tireoidianos e ACTH.

O GH está envolvido no estímulo da lactogênese por mecanismos ainda não esclarecidos. Seus níveis, que se mantêm relativamente estáveis durante a gestação, aumentam significativamente no parto e durante a lactação, sugerindo que sua função é importante durante a segunda fase da lactogênese.

VII.2.3. Manutenção da lactação.

A produção láctea nas vacas aumenta gradativamente até atingir o pico de produção a 8-9 semanas pós-parto, para depois diminuir lentamente. A produção de leite varia em função de: (a) o potencial genético; (b) o nível nutricional; (c) o manejo; (d) a condição sanitária; e (e) a idade.

A amamentação estimula a lactação de duas maneiras: primeiro por diminuir o efeito inibitório da pressão intramamária causado pela acumulação de leite na glândula mamária, e segundo por estimular neuralmente a secreção de hormônios lactogênicos (PRL, ocitocina, ACTH). Contudo, esse efeito estimulatório diminui com o avanço da lactação, talvez devido à dessensibilização do sistema neurotransmissor que controla a secreção de PRL.

O termo *homeorrese* é referido à regulação endócrina que permite a distribuição de nutrientes necessários para a manutenção da lactação ou de qualquer outro estado fisiológico. Os hormônios associados à manutenção da lactação são principalmente hipofisiários e incluem PRL, GH, ACTH e TSH. Além dos hormônios da hipófise, estão incluídos como participantes do processo de manutenção da lactação a insulina, o hormônio da paratireóide (PTH), os glicocorticóides e a tiroxina.

A ação da PRL varia nas diferentes espécies. Em vacas e cabras, a PRL parece ter maior importância na lactogênese, porém menor na manutenção da lactação, ao passo que no coelho tem provada ação galactopoiética. Em ruminantes, a PRL é útil para manter níveis máximos de produção de leite, sem no entanto, ser necessária para a manutenção da lactação. A

PRL teria maior importância na manutenção da lactação em animais não ruminantes.

O GH tem ação sinérgica com a PRL, os glicocorticóides e os hormônios tireoidianos para estimular a lactação em animais hipofisectomizados. Em 1937, foi observado que a administração de extratos crus de hipófise estimulavam a produção de leite em vacas. Anos depois, foi identificado o GH como sendo o fator estimulatório. Foi o início da utilização de GH como fator galactopoiético de forma comercial, fato facilitado depois com a produção do hormônio recombinante. Existe uma relação linear entre a percentagem de aumento da secreção de leite e o logaritmo da dose exógena de GH. Em geral, é considerado que ocorre um incremento de produção de leite entre 6 a 35% mediante o uso de GH exógeno. O rGH possui uma atividade galactopoiética maior do que o GH extraído da hipófise, produzindo aumentos de produção entre 23 a 41%. O maior efeito galactopoiético do rGH pode ser devido ao fato de possuir uma metionina N-terminal adicional quando comparado ao GH hipofisiário, que faz com que sua degradação seja mais lenta.

Os mecanismos através dos quais o GH provoca o efeito galactopoiético passam pelo estímulo da produção de somatomedinas no fígado e o conseqüente estímulo mobilizador de reservas corporais para obter um efeito estimulador da homeorrese sobre a glândula mamária. Em geral, o efeito envolve mudanças coordenadas no metabolismo corporal de proteínas, lipídios e glicídios de forma a direcioná-los para a síntese de leite. Assim, entre as ações do GH estão: (a) estimula a capacidade do fígado para metabolizar propionato como fonte de glicose; (b) estimula a biossíntese de α -lactalbumina na glândula mamária; (c) aumenta a taxa de gasto de glicose para sintetizar lactose no tecido mamário, porém reduzindo a taxa de oxidação de glicose em outros tecidos; (d) aumenta a distribuição de aminoácidos para a produção de proteínas do leite, embora dependendo da reserva de proteínas; e (e) aumenta a mobilização de lipídios, quando o animal está em balanço energético negativo, permitindo a maior utilização de ácidos graxos livres, para poupar glicose.

Os glicocorticóides fazem parte do complexo endócrino da manutenção da lactação. Eles favorecem o metabolismo, especialmente da glicose, para aumentar a sua disponibilidade na glândula mamária. No entanto, os

glicocorticóides exógenos podem provocar inibição da lactação, quando se utilizam em doses elevadas.

Os hormônios tireoidianos são essenciais para a resposta máxima de secreção de leite. A administração desses hormônios estimula o desempenho produtivo em várias espécies, especialmente em ruminantes, nos quais o aumento pode ser de 27%. O efeito galactopoiético dos hormônios tireoidianos foi estudado na década de 1960 quando se utilizou a tirocaseína, uma proteína iodada com atividade de tiroxina, fornecida no alimento em vacas. Administrada em vários estágios da lactação, a tirocaseína aumentava a produção em 10-20%, porém o consumo de alimento também aumentava, efeito não observado com o GH e a produção caía abruptamente quando era interrompida a administração de tirocaseína, razões que desestimularam seu uso.

A secreção de PTH é estimulada quando os níveis de cálcio sanguíneo diminuem. No parto, a concentração de PTH aumenta para extrair reservas de cálcio dos ossos, ao passo que os níveis de 1,25-dihidroxi-vitamina D₃ aumentam para melhorar a absorção de cálcio no intestino. Esses dois hormônios seriam então determinantes no performance lactacional.

A administração de estrógenos naturais ou sintéticos ou combinações de estrógenos e progestinas ou de estrógenos e andrógenos inibem a secreção de leite em várias espécies. Em mulheres têm sido usados para inibir a lactação. O efeito inibitório está associado com o desaparecimento das miofibrilas das células mioepiteliais. Na época do estro, ocorre uma leve queda de produção de leite devido ao aumento dos estrógenos, embora também entrem como causas a intranquilidade e o nervosismo, bem como a perda de apetite próprios desse período. Nas vacas gestantes, o aumento gradual de produção de estrógenos próprios no terço final da gestação, bem como o aumento da demanda nutritiva do feto, tendem a diminuir a produção de leite.

A progesterona inibe a lactogênese, no início da lactação, porém não inibe a lactação já estabelecida, talvez devido ao desaparecimento dos receptores para progesterona na glândula mamária. Além disso, a progesterona tem mais afinidade pelos lipídios do leite do que pelos receptores, de forma que a gordura do leite “seqüestra” a progesterona e impede sua atividade biológica.

A insulina exógena pode aumentar os níveis de gordura e de proteína no leite, por melhorar a captação de aminoácidos e ácidos graxos e aumentar o metabolismo na glândula mamária.

A atividade de ejeção do leite está relacionada com a liberação de ocitocina da pituitária posterior, hormônio que causa contração das células mioepiteliais dos alvéolos e dos dutos. A liberação de ocitocina da neurohipófise é ocasionada pelo estímulo nervoso da palpação da úbere, da amamentação, da presença do bezerro e de outros estímulos associados à ordenha, tais como movimentação de baldes, alimentação ou a presença do ordenhador. A liberação de ocitocina pode ser inibida por stress ou por dor, mediante a liberação de adrenalina, a qual tem um efeito central, inibindo a liberação de ocitocina da neurohipófise e um efeito periférico por causar vasoconstrição e, talvez também, por bloquear a união da ocitocina aos receptores da glândula mamária. Embora a ocitocina exógena seja galactopoiética, sua função está restrita ao reflexo da ejeção, pois a concentração basal e as taxas de secreção desse hormônio são iguais no pico de produção e durante a involução mamária. Além disso, a curta meia-vida deste hormônio (1-2 min) faz com seu efeito seja transitório. Na cabra, não ocorre secreção de ocitocina durante a ordenha, não sendo necessário este hormônio para o esvaziamento da glândula mamária. Em novilhas que sofrem de edema profuso, a dor chega a bloquear a secreção de ocitocina, impedindo a saída do leite. Nesses casos, é recomendada uma aplicação de ocitocina exógena (5-15 U) ou então massagens via retal do útero e das estruturas intrapelveanas.

A vaca deve ser seca pelo menos 40 dias antes do seguinte parto para garantir uma adequada produção na seguinte lactação. A melhor forma de secar uma vaca é deixando de ordenhar por 4 a 5 dias, pois a evacuação do leite é um estímulo necessário na manutenção da lactação. Períodos secos menores de 40 dias causam diminuição da ordem de 20 a 30% na produção de leite da seguinte lactação, provavelmente devido à falta de renovação e regeneração das células epitélio-alveolares. Em algumas vacas de alta produção que são difíceis de secar, devem ser aplicadas restrições severas de água e alimento por alguns dias, além de aumentar gradativamente os períodos entre ordenhas. Não é aconselhável usar estrógenos,

apesar de seu efeito inibitório sobre a lactação, devido aos efeitos colaterais de hiperestrogenismo e ninfomania, com possível formação de cistos.

VII.2.4. Formação e composição do leite.

A formação do leite demanda um enorme trabalho metabólico. Em uma vaca leiteira, é requerida a passagem de 450 litros de sangue pela glândula mamária para produzir 1 litro de leite. A quantidade de leite produzido varia muito em função da espécie e da raça, além da variação individual. Algumas espécies, como a vaca, a cabra e a ovelha foram selecionadas geneticamente para produzir leite para o consumo humano, em quantidades que estão além de suas necessidades biológicas. De forma geral, as quantidades diárias de leite produzidas são de 11 a 45 kg na vaca, 9 a 23 kg na égua, 1,3 a 7 kg na cabra, 1 a 4,5 kg na ovelha, e 2 a 9 kg na porca.

Entre os componentes exclusivos, sintetizados pela glândula mamária que são considerados como indicadores do processo lactogênico estão a lactose, a α -lactalbumina, a caseína, além de certo tipo de triglicerídios e citrato em ruminantes. A proporção dos diferentes componentes do leite nas espécies varia especialmente quanto a gordura, proteína e lactose (Tabela VII-3).

Dentro das proteínas do leite, a mais importante é a caseína, que perfaz cerca de 90% das proteínas lácteas. Existem vários tipos identificados de caseínas: α , β , γ e κ . As caseínas se agregam formando grânulos insolúveis chamados micelas. As demais proteínas do leite estão em forma solúvel.

A α -lactalbumina corresponde a 2-5% do total de proteínas e funciona como uma das subunidades da enzima lactose sintetase. A lactose sintetase consta de duas proteínas, a proteína A, uma galactosil transferase, e a proteína B, que é a α -lactalbumina. Durante a gestação, a progesterona impede a síntese de α -lactalbumina, mas não da galactosil transferase, a qual transfere galactose sobre outros monossacarídeos diferentes de glicose para participar na formação de oligossacarídeos de membrana.

Outras proteínas do leite incluem a β -lactalbumina (7-12%), albumina sérica (1%) e as imunoglobulinas G, M e A (1,3-2,8%). Os precursores para a síntese das proteínas do leite são aminoácidos livres do sangue em 90% e proteínas séricas em 10%. Entre estas últimas

estão as imunoglobulinas.

A maioria da gordura do leite está representada pelos triglicerídios. A quantidade e a composição dos triglicerídios do leite variam muito entre as espécies (Tabela VII-3). Nos ruminantes, a proporção de ácidos graxos de cadeia curta e insaturados é bem maior que nos monogástricos. Os precursores dos ácidos graxos sintetizados no tecido mamário incluem glicose, acetato e β -hidroxibutirato. Entretanto, alguns ácidos graxos provenientes da dieta ou do metabolismo ruminal e intestinal são incorporados à glândula mamária a partir do sangue. Uma grande proporção de triglicerídios transportados pelas lipoproteínas do sangue entram na glândula mamária.

Aproximadamente 25% dos ácidos graxos do leite são derivados da dieta e 50% do plasma sanguíneo. O resto é elaborado na glândula mamária a partir de precursores, principalmente de acetato. A glândula mamária possui a enzima glicerol quinase, podendo portanto produzir glicerol-3-fosfato a partir de glicerol livre, para a síntese de triglicerídios. Contudo, cerca de 70% do glicerol necessário para a síntese de triglicerídios na glândula mamária provém da glicose sanguínea.

Os ácidos graxos de cadeia média (8-12 C) são característicos do leite não sendo possível encontrá-los em outros tecidos.

A lactose, açúcar primário do leite, é um dissacarídeo que constitui o maior regulador osmótico da célula mamária funcional, sendo portanto sua concentração o principal determinante do volume de leite secretado. A galactose é originada a partir de glicose mediante a seguinte série de reações:

$\text{glicose} + \text{ATP} \rightarrow \text{glicose-6-fosfato} + \text{ADP}$
(enzima: hexoquinase)

$\text{glicose-6-fosfato} \rightarrow \text{glicose-1-fosfato}$ (enzima: fosfoglicomutase)

$\text{glicose-1-fosfato} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-glicose} + \text{PPi}$
(enzima: UDP-glicose pirofosforilase)

$\text{UDP-glicose} \rightarrow \text{UDP-galactose}$ (enzima: UDP-galactose 4-epimerase)

A lactose isomerase, enzima limitante na secreção de leite, catalisa a transferência de UDP-galactose sobre a glicose para dar lactose. A glicose que não é utilizada para a síntese de lactose vai para síntese de glicerol e fornecimento de energia. A disponibilidade de glicose sanguínea é um fator limitante para a síntese de

leite. Outros precursores da glicose para a síntese de lactose são propionato, glicerol, pentoses-fosfatos e lactato.

Dos minerais do leite os mais importantes são o cálcio (0,12%) e o fósforo (0,1%), os quais provêm do sangue. O cálcio no leite é encontrado combinado de forma insolúvel com caseinato, citrato e fosfatos, de forma que consegue acumular altas concentrações ao mesmo tempo que mantém equilíbrio osmótico com o sangue. A capacidade tamponante do leite é atribuída a seu conteúdo de citrato, fosfato, bicarbonato e proteínas, os quais garantem a manutenção do pH em cerca de 6,6. Outros minerais presentes no leite incluem zinco, cobre, ferro, iodo, manganês e molibdênio. As quantidades de ferro e cobre estão em quantidades insuficientes para cobrir as necessidades do lactente.

A glândula mamária não sintetiza vitaminas, sendo que todas as vitaminas do leite provêm do sangue. O leite contém vitaminas A, D, E e a maioria do complexo B. O nível de vitamina C é baixo e, no caso do leite de vaca para consumo humano, a maioria é destruída no processo de pasteurização.

O colostro é mais rico que o leite em quantidade de vitamina A (4-25 vezes), D (3-10 vezes) e E (2,5-7 vezes). Em geral, o leite das vacas Jersey e Guernsey têm maior conteúdo vitamínico que a raça holandesa.

O leite contém enzimas como a peroxidase e a catalase, as quais aumentam nos processos inflamatórios e sua elevação é usada nos métodos diagnósticos de mastite. Outras enzimas presentes no leite incluem fosfatases, xantinoxidase e redutases.

VII.3. Referências bibliográficas.

- Akers, R.M. Lactation physiology: a ruminant animal perspective. *Protosplasma* 159: 96-111. 1990.
- Brito, R., Tolno, T.E. & García, R. Comparación entre el sistema de limitación de amamentación y el de cría tradicional en el ganado cebú. *Rev. Cubana Cienc. Vet.* 19: 299-303. 1988.
- Dick, A.L., Mongiardino, M.E., García, R. Performance reproductiva en bovinos lecheros en Argentina. In: *First Coord. Meet. Joint FAO/IAEA Division*. Lima, Perú. 1984.
- Galina, C.S. & Arthur, G.H. Review of cattle reproduction in the tropics. Part 3. Puerperium. *Anim. Breed. Abstr.* 57 (11): 899-910. 1989.
- Gallego, M.I. *Manejo del problema reproductivo en el ganado de leche*. ICA/CEGA/ANALAC. Bogotá, 1988.
- García, M., Echevarría, L., Huanca, W. Post-partum reproductive efficiency of pure and crossbred zebu cattle under different management and nutritional conditions in the Amazon basin of Perú. In: *Livestock Reproduction in Latin America*. IAEA, Vienna: 181-195. 1984.
- González, F.H.D., Duarte, C., López, A. *et al.*, Influencia del manejo nutricional y la condición corporal en el desempeño reproductivo y el perfil metabólico en el posparto de vacas lecheras. *Rev.Ass.Col.Med. Vet.Zoot.* 19 (4), 6-9. 1994.
- Gyawu, P. & Pope, G.S. Post-partum, ovarian function in dairy cows as revealed by concentrations of oestradiol-17 β and progesterone in defatted milk. *Br. Vet. J.* 146: 194-204. 1990.
- Hafez, E.S.E. (Ed.) *Reprodução animal*. 6ª edição. São Paulo: Editora Manole Ltda. 1995.
- Jarrín, J. & Villalba, P. A study of the post-partum activity in dairy cows from two geographic areas in which two different feeding systems are used. In: *First Coord. Meet. FAO/IAEA Division*. Lima, Perú. 1984.
- Lamming, G.E., Wathes, D.C. & Peters, A.R. Endocrine patterns of the postpartum cow. *J. Reprod. Fertil. suppl.* 30: 155-170. 1981.

Tabela VII-3. Proporção (%) dos principais componentes do leite em várias espécies.

Espécie	Água	Gordura	Proteína	Lactose	Minerais
Vaca	86,2	4,4	3,8	4,9	0,7
Ovelha	82,9	6,2	5,4	4,3	0,9
Cabra	87,1	4,1	3,7	4,2	0,8
Porca	83,0	7,0	6,0	4,0	0,9
Gata	82,0	5,0	7,0	5,0	0,6
Cadela	79,0	8,5	7,5	3,7	1,2
Égua	89,0	1,6	2,7	6,1	0,5
Mulher	87,4	3,8	1,6	7,0	0,2

- Lindell, J.O. & Kindahl, H. Exogenous prostaglandin $F_{2\alpha}$ promotes uterine involution in the cow. *Acta Vet. Scand.* 24 (3): 269-274. 1983.
- López, O. Características productivas del ganado bovino en el trópico. II. Comportamiento reproductivo. *Cuban J. Agric. Sci.* 20: 215-223. 1986.
- O'Connell, C.M. & Wettemann, R.P. Immunization of postpartum cows against GnRH influences the onset of luteal activity and establishment of pregnancy. *Anim. Sci. Res. Rep.*: 334-337. 1990.
- Ott, R.S. & Gustafsson, B.K. Therapeutic applications of prostaglandins for postpartum infections. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 77: 363-369. 1981.
- Peters, A.R., Lamming, G.E. Lactational anestrus in farm animals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Vol.12. Milligan (ed.), New York: Oxford Univ. Press. 1990.
- Randel, R.D. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *J. Anim. Sci.* 68: 853-862. 1990.
- Schmidt, G.H. 1979. *Biología de la Lactación*. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Sharpe, P.H. & King, G.J. Post-partum ovarian function of dairy cows in a tropical environment. *J. Dairy Sci.* 64: 672-677. 1981.
- Short, R.E., Bellows, R.A., Staigmiller, R.B., Berardinelli, G.J. & Custer, E.E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in post-partum beef cattle. *J. Anim. Sci.* 68: 799-816. 1990.
- Slama, H., Vaillancourt, D. & Goff, A.K. Pathophysiology of the puerperal period: relationship between PGE_2 and uterine involution in the cow. *Theriogenology* 36: 1071-1090. 1991.
- Smith, J.F., Payne, E., Tervit, H.R., McGowan, L.T., Fairclough, R., Kilgour, R. & Goold, P.G. The effect of suckling upon the endocrine changes associated with anoestrus in identical twin dairy cows. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 30: 241-249. 1981.
- Thatcher, W.W., Wilcox, C.J., Collier, R.J., Eley, D.S., Head, H.H. Bovine conceptus-maternal interactions during the pre-and postpartum periods. *J. Dairy Sci.* 63: 1530-1540. 1980.
- Tucker, H.A. 1988. Lactation and its hormonal control. In: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, J. Neill (eds.). New York: Raven Press.
- Weesner, G.D., Norris, T.A., Forrest, D.W., Harms, P.G. Biological activity of LH in the peripartum cow: least activity at parturition with an increase throughout the postpartum interval. *Biol. Reprod.* 37: 851-858. 1987.
- Williams, G.L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 68: 831-852. 1990.

VIII. AS PROSTAGLANDINAS NA REPRODUÇÃO

VIII.1. Estrutura química das prostaglandinas.

As prostaglandinas (PGs) são ácidos graxos de 20 átomos de carbono, cuja estrutura básica contém um anel de ciclopentano mais duas cadeias laterais. Todas as PGs possuem um grupo hidroxila no carbono 15 e uma ligação dupla *trans* no carbono 13.

Seis grupos de PGs tem sido identificadas: A, B, C, D, E e F. A diferença entre elas radica na estrutura do anel ciclopentano. Dentro de cada grupo foram estabelecidos subgrupos designados em função do número de ligações duplas nas cadeias laterais, assim:

subgrupo 1: *trans* C13

subgrupo 2: *trans* C13, *cis* C5

subgrupo 3: *trans* C13, *cis* C5, *cis* C16

Grupos hidroxilas podem estar localizados nos C11, 15 ou 19, sempre em orientação α . As séries de PGs dos grupos E e F são as mais abundantes e as de maior importância biológica. As PGEs estão caracterizadas por ter um grupo hidroxila no C11 e um grupo ceto no C9, ao passo que as PGFs possuem grupos hidroxila naqueles dois carbonos.

As PGs da série A são produto da desidratação das PGEs, desaparecendo o grupo hidroxila e formando uma ligação dupla no C10. As PGs B e C são isômeros da PGA, e a PGD é isômero da PGE.

VIII.2. Distribuição das PGs nos tecidos.

As PGs são sintetizadas na maioria dos tecidos dos mamíferos, e ainda tem sido detectadas em vertebrados inferiores e até em invertebrados.

Aumentos de PGs tem sido observados em inúmeros eventos patológicos, entre os quais cabe ressaltar febre, traumatismos, processos sépticos, queimaduras, choques, hemorragia, hipertensão essencial e pulmonar, asma bronquial, pneumonia, diarreia, gastroenterite, aborto, endometriose, atrite e inflamação. Também é observado aumento de PGs devido ao parto e à colocação de dispositivos intrauterinos.

O sêmen é o líquido orgânico onde se encontram PGs em maior concentração e variedade, predominantemente as do grupo E. Existem diferenças entre espécies nesse aspecto. O carneiro e o homem são as espécies em que as PGs são abundantes no sêmen, ao passo que touro, cavalo e cão têm sêmen com baixa concentração de PGs.

As PGs do sêmen não parecem afetar de

forma importante o metabolismo do espermatozóide. Todavia, elas podem ser absorvidas pelo trato genital feminino, causando contração das paredes e favorecendo o transporte dos espermatozoides. No caso dos humanos, as PGs são secretadas pelo trato reprodutor feminino durante o orgasmo. É bem provável que a ação primária das PGs seja no oviduto, para favorecer o ascenso dos espermatozoides.

No fluido menstrual dos humanos é observada a presença de PGs E_2 e $F_{2\alpha}$, de origem endometrial. A $PGF_{2\alpha}$ tem sido observada em maior proporção durante a fase luteal, especialmente ao final, em relação com seu efeito vasoconstritor no processo espasmódico dos vasos capilares e a isquemia do endométrio, ao passo que a PGE_2 estaria em maior proporção na fase folicular, relacionada com seu efeito relaxador do cérvix uterino.

No líquido amniótico, têm sido encontradas elevadas concentrações de PGs E_1 , E_2 , $F_{1\alpha}$ e $F_{2\alpha}$, de origem decidual. O fato das concentrações aumentarem por ocasião do parto ou do aborto, leva a crer na participação das PGs nesses processos. A $PGF_{2\alpha}$, associada com a oxitocina, causando predominantemente contração do miométrio e a PGE por sua ação espasmódica da parte anterior do útero, simultaneamente com efeito relaxante do cérvix. Na égua e na porca, espécies com cérvix de menor tamanho, a indução do parto com $PGF_{2\alpha}$ é realizada com facilidade. Entretanto, nos ruminantes, caracterizados por cérvix de maior porte, a indução do parto com $PGF_{2\alpha}$ embora possível, não é tão bem sucedido.

A presença de PGs no sangue materno no período próximo ao parto, em maior concentração que durante a gestação, é outro indício da participação das PGs no desencadeamento do parto. É provável que elas participem, além da contração uterina, em eventos como a oclusão dos vasos umbilicais e o fechamento do duto arterial-venoso.

Tem sido comprovado que a PGE_2 regula a secreção do muco gástrico. Daí que a aspirina, como inibidor da síntese de PGs, pode ocasionar úlceras da mucosa gástrica.

Em condições normais, as PGs têm uma meia-vida e uma concentração no sangue muito baixas devido a sua rápida degradação no pulmão. É calculado que uma passagem pelo pulmão destrói 85 a 99% das PGs primárias, ao passo que a PGA é degradada em 60%. Estudos da variação de PGs no sangue tem sido feitos

mediante a dosagem dos compostos derivados dos processos de metabolização, que têm uma meia-vida mais longa. Assim, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é melhor monitorada mediante a medição dos níveis de 13, 14-dihidro-15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esses metabólitos podem também ser encontrados na urina, que é a sua via normal de excreção.

VIII.3. Biossíntese das prostaglandinas.

O primeiro passo para a síntese das PGs é a hidrólise dos ácidos graxos dos fosfolípidos de membrana na célula produtora, mediante a enzima fosfolipase A. O ácido araquidônico, de 20 carbonos, deve ser liberado para servir de precursor dos eicosanóides. A transformação deste composto pode acontecer por três possíveis vias metabólicas:

(a) via da ciclooxygenase: esta via foi a primeira a ser descoberta e nela esta implicada a enzima PG sintetase ou ciclooxygenase, que catalisa a endoperoxidação do ácido araquidônico para dar compostos intermediários muito instáveis, as PGs G_2 e H_2 , os quais por isomerização formam as PGs D_2 , E_2 e $\text{F}_{2\alpha}$. Nesta rota, as enzimas prostaciclina sintetase e tromboxano sintetase catalisam a síntese de prostaciclina (PGI_2) e tromboxano A_2 , respectivamente.

(b) via da lipooxygenase: esta via está mediada pelas enzimas lipooxygenases (5, 12 ou 15), que formam ácidos graxos hidroxilados não cíclicos: 5, 12 ou 15-hidroperoxi-eicosatetraenóicos (HPETE), os quais originam os leucotrienos, substâncias comprometidas nas reações anafiláticas.

(c) via da epoxigenase: mediante esta via são originados os ácidos epoxi-eicosatetraenóicos (EETs) e dihidro-eicosatetraenóicos (DHTs), mediante a enzima monooxygenase, ligada ao sistema citocromo P450, que requer de coenzimas NADH e oxigênio molecular. Esses ácidos têm ações inibitórias sobre as anteriores vias.

VIII.4. Ações biológicas das PGs na reprodução.

VIII.4.1. Luteólise.

A natureza transitória do corpo lúteo (CL) é essencial para que exista a oportunidade de uma nova fecundação e por isso deve ocorrer a sua lise caso não aconteça a gestação. Por outra parte, a persistência do CL é essencial para a manutenção da gestação. Entretanto, em algumas espécies como a cadela, o CL persiste por longo período de tempo, apesar de não haver gestação,

evento considerado como um atavismo herdado do lobo, que teria como finalidade a adoção de filhotes órfãos de outras lobas.

Babcock, em 1966, foi o primeiro a sugerir que uma PG secretada pelo útero seria o composto causador da luteólise. Estudos posteriores mostraram que a injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em ratas causava diminuição dos níveis de progesterona e que o fator luteolítico na ovelha era a $\text{PGF}_{2\alpha}$, fato aplicado depois à vaca. Entre outros estudos, foi demonstrado que a injeção de indometacina, inibidor da síntese de PGs, no corno uterino ipsi-lateral ao CL, evitava a luteólise em novilhas.

Mais tarde ficou comprovada a presença de receptores para $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL, os quais mostravam aumento de afinidade em até 200 vezes mais, durante os dias 13 a 20 do ciclo estral bovino. Os receptores para $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL são refratários à própria PG durante os dias 1 a 4 dos ciclo estral.

Os subgrupos de células luteais mostram diferente comportamento frente às PGs. Assim, as células luteais pequenas, que secretam grandes quantidades de progesterona quando estimuladas pelo LH, respondem às PGs E e $\text{F}_{2\alpha}$ com aumento da produção de progesterona (efeito luteotrópico), enquanto que as células luteais grandes, responsáveis pela maior parte da progesterona basal, sofrem inibição da síntese de progesterona induzida por LH por ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (efeito luteolítico). Ou seja, a ação luteolítica da $\text{PGF}_{2\alpha}$ é realizada através das células luteais grandes, embora se aceita que são necessários fenômenos de comunicação intercelular entre células luteais grandes e pequenas, bem como entre células luteais e não luteais, para que a regressão do CL progrida. Por outro lado, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ inibe a secreção de progesterona induzida por LH e não a secreção basal.

Um dos efeitos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no ovário é a diminuição do fluxo sanguíneo para o CL. Este mecanismo, tido como um dos responsáveis da luteólise, na verdade é devido à degeneração dos capilares luteais e não à provável vasoconstrição que a PG poderia causar.

O mais provável efeito das PGs que explique a luteólise, é a inibição da utilização de lipoproteínas, e portanto a limitação do substrato disponível para a esteroidogênese, efeito que parece ter lugar nas mitocôndrias das células luteais. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ atua mediante receptores de membrana sobre a fosfolipase C, que libera

inositol trifosfato (ITP) e diacil-glicerol (DAG). O ITP estimula a entrada de íons de Ca^{2+} no interior da célula e o DAG estimula a fosforilação de proteína-quinases, eventos que levariam à inibição da síntese de progesterona.

Por outra parte, como as membranas das células luteais são ricas em ácido araquidônico e sabendo que as PGs podem atuar de forma parácrina e autócrina, foi postulado que as próprias PGs luteais possam atuar na regulação do CL, pelo menos no rato.

O mecanismo *feedback* positivo entre a ocitocina e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi postulado para a ovelha e parece ser o mesmo para a cabra e vaca. É iniciado com a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio, que atua sobre o CL para produzir ocitocina, a qual por sua vez vai para o útero para estimular maior produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Este mecanismo é completado pelo fato de que a progesterona estimularia o endométrio para que armazene grandes quantidades de fosfolípidios e incremente a sua atividade enzimática de ciclooxygenase. A ocitocina, tanto de origem ovárica como da neurohipófise, estimula a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ unicamente quando os níveis de progesterona estão baixos, devido a que existe um bloqueio deste hormônio sobre a expressão dos receptores de ocitocina durante a fase luteal (10-12 dias). A queda da progesterona, unido ao efeito estimulatório dos estrógenos sobre a expressão dos receptores de ocitocina, facilita a resposta do mecanismo *feedback* proposto.

Um outro aspecto é o papel do sistema imune na luteólise. Já faz algum tempo que se conhece a presença de células do sistema imune no CL no momento da regressão, estando implicadas na fagocitose de células. De fato, é possível observar macrófagos no CL ao longo da fase luteal, tendo um aumento quando se aproxima a luteólise. A infiltração de células imunitárias no CL cíclico é maior que no CL da gestação, sem que se saiba o motivo para este fato.

A ativação do sistema imune é facilitada por glicoproteínas de membrana (complexos de histocompatibilidade). No CL a expressão desses antígenos é ativada por uma linfoquina liberada pelos linfócitos T, o interferon γ . Por outro lado, tanto macrófagos quanto linfócitos T secretam citocinas, peptídeos que potencializam a resposta imune, e foi comprovado que as células luteais são suscetíveis aos efeitos das citocinas, quais sejam, a inibição da esteroidogênese e o incremento da síntese de PGs locais, mediante a

indução das enzimas fosfolipase e a PG sintetase. Portanto, parece que algumas citocinas atuam como reguladores parácrinos ou autócrinos como mediadores da resposta imune. Por sua vez, os eicosanóides são capazes de regular a ativação das células do sistema imune e a secreção de citocinas. Haveria algumas citocinas que estimulariam a secreção de PGs endometriais.

A hipótese que surge é a de que a regressão do CL obedeceria a fenômenos autoimunes locais. Neste mecanismo existiria um sistema *feedback* entre as células do sistema imune e as células do CL, mediante o qual as citocinas e as PGs participariam como reguladores autócrinos e parácrinos, formando um eficiente sistema no controle da luteólise.

Outra hipótese sugerida a partir de estudos no rato é a favor da peroxidação de lípidios da membrana plasmática das células luteais, como causa inicial da luteólise. A concentração luteal da enzima superóxido dismutase é paralela com a secreção de progesterona. A diminuição da secreção de progesterona seria resultado da isquemia luteal coincidente com a diminuição da atividade da superóxido dismutase e com o aumento da peroxidação lipídica da membrana, o que provocaria mudanças na permeabilidade da membrana, efeito similar ao causado pela $\text{PGF}_{2\alpha}$. A formação de radicais de peróxido estaria ligada ao incremento da atividade da fosfolipase. Por sua vez, os radicais peroxidados estimulariam a atividade da fosfolipase A_2 , estabelecendo um sistema *feedback* positivo, resultando na acumulação de radicais livres fortemente oxidados, que levariam a lesão e destruição da célula luteal.

Um dos efeitos das citocinas é o de diminuir a concentração de glutathione, tripeptídeo com capacidade para eliminar radicais peroxidados, e o de induzir a produção mitocondrial de radicais oxidados. Dessa maneira, a presença de citocinas levaria a aumentar a presença de radicais oxidados precipitando a destruição celular. De qualquer forma, e apesar das muitas evidências, o papel do sistema imune no processo da luteólise ainda não está suficientemente esclarecido, sendo objeto de estudo atualmente.

Outra hipótese sobre a luteólise está relacionada com a morte celular programada. Em geral é aceito que a morte das células pode acontecer por dois mecanismos: apoptose ou necrose. A primeira se refere a um processo fisiológico, enquanto que a segunda se refere à

morte celular patológica.

A apoptose é um processo ativo que requer energia e que causa mudanças morfo-bioquímicas das células, entre as quais estão incrementos na concentração intracelular de Ca^{2+} e a ativação de endonucleases Ca-Mg-dependentes. No processo ocorre saída de íons e de água da célula causando contração celular. O fato indicador da apoptose é a ruptura do DNA com formação de oligonucleossomas, estruturas que tem sido identificadas durante a luteólise na vaca e na ovelha.

O processo de apoptose talvez seja iniciado com a retirada de um fator trófico. No CL, o fator desencadeante seria a diminuição da secreção de progesterona e/ou a presença de citoquinas.

VIII.4.2. Ovulação.

A ovulação requer pelo menos de três processos distintos: (a) terminação da maturação e divisão do ovócito, (b) mudanças na parede folicular que ocasionam a sua ruptura, e (c) modificação morfo-bioquímica e espacial das células granulosas para se transformarem em células luteais. Todos esses processos acontecem em decorrência da liberação dos hormônios gonadotrópicos.

No líquido folicular tem sido identificadas as PGs $\text{F}_{2\alpha}$ e E e o papel das PGs no processo da ovulação tem sido objeto de estudo desde 1972, quando Tsafiriri *et al.* conseguiram provocar a ovulação mediante PGE_2 em ratas, nas quais tinha sido bloqueada a onda pré-ovulatória de LH. Tais autores chegaram ainda às seguintes conclusões: (a) a indometacina não bloqueia a liberação de LH, porém possui ação anti-ovulatória por evitar a ruptura folicular, sem no entanto afetar a maturação; (b) as PGs têm um papel essencial no mecanismo pelo qual o LH causa a ruptura folicular; e (c) as PGs não são necessárias na maturação do ovócito, ação na qual o LH está diretamente envolvido.

A hipótese de que as PGs estariam envolvidas no processo da ovulação implica o seguinte mecanismo: PGs E_1 e E_2 estimulam a síntese da enzima ativadora do plasminogênio, que forma plasmina nas células da granulosa quando a ovulação se aproxima, efeito que é de responsabilidade primária do FSH e do LH. A plasmina ocasiona o enfraquecimento da parede folicular que posteriormente leva à ruptura. Por outra parte, o aumento pré-ovulatório da concentração folicular de $\text{PGF}_{2\alpha}$, produzida pelas células granulosas, estimularia a síntese de

enzimas como a collagenase e a elastase, nas células foliculares.

As PGs da série E também estão implicadas no processo de luteinização das células granulosas. De fato, uma das primeiras funções descobertas das PGs na área da reprodução foi a da capacidade das PGs E de estimular a produção de progesterona em tecido ovárico. O mecanismo de ação das PGs E é mediante aumento dos níveis de cAMP, imitando e talvez reforçando a função do LH. É bastante provável, que a ação sinérgica entre PGE e gonadotropinas possa ser aplicada à maturação folicular. Foi postulado que as PGs E produzidas pelas células da teca interna passem por difusão através da membrana basal do folículo e atuem sobre as células granulosas favorecendo a formação de receptores para FSH e LH.

As PGs também devem ser levadas em consideração como fatores intraováricos de origem folicular implicados no controle do crescimento dos folículos não proliferativos, quando não existem receptores para gonadotropinas. As gonadotropinas são os reguladores primários do desenvolvimento folicular depois que o folículo inicia seu crescimento e começa a ter receptores para LH/FSH, a síntese dos quais provavelmente seria estimulada pelas PGs. Nos folículos em crescimento, as PGs E atuam sinergizando a ação das gonadotropinas para a síntese de esteróides, mediante aumento nos níveis de cAMP.

VIII.4.3. Parto.

No final da gestação aumenta a síntese de glicocorticóides tanto fetais quanto maternos, que causam desvio da rota esteroidogênica, evitando a síntese de progesterona e favorecendo a síntese de estrógenos. Por outra parte, aumentam os níveis circulantes de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Na medida em que o parto se aproxima, o útero se dilata, aumentando a excitabilidade miométrial.

Tanto ocitocina quanto $\text{PGF}_{2\alpha}$ intervêm na regulação da contratilidade uterina. A ocitocina é liberada da neurohipófise mediante o chamado reflexo de Ferguson, causado pela distensão vaginal e cervical. A descarga de ocitocina é seguida por um incremento da $\text{PGF}_{2\alpha}$ de origem uterina, provavelmente causado pela própria ocitocina.

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é o fator intrínseco que estimula as fibras musculares lisas e com sua liberação são iniciadas as contrações miométriais que forçam a

saída do feto em direção ao cérvix provocando o reflexo de Fergusson, e induzindo a liberação de grandes quantidades de ocitocina da neurohipófise materna, que por sua vez estimula novas contrações uterinas e a liberação de mais $\text{PGF}_{2\alpha}$, estimulação progressiva que leva à expulsão do feto. As PGs I_2 e E_2 participam no processo causando a dilatação do cérvix.

VIII.4.4. Pós-parto.

O pós-parto inicia com a terminação do parto e conclui com o primeiro cio seguido da formação de um CL de duração normal. Do ponto de vista reprodutivo, o pós-parto está fundamentado em dois pontos: (a) a involução uterina e (b) a reinstauração da atividade sexual.

Durante este período se desenvolvem processos tendentes a recuperar o estado fisiológico que existia antes da gestação, quais sejam: (a) diminuição do tamanho do útero. Na vaca passa de 10 kg após o parto para 6 kg aos 6 dias, 2 kg aos 12 dias e 1 kg aos 25 dias, até chegar ao peso normal aos 50 dias; (b) descarga de lóquios, (c) regeneração do epitélio endometrial, (d) diminuição do fluxo sanguíneo ao útero, (e) regressão das glândulas uterinas.

A duração da involução uterina na vaca é variável e afetada por vários fatores, mas a média está em torno de 6 semanas. Esse período é maior nas vacas de corte que nas de leite, aumenta com a idade e o número de partos, no inverno e em animais confinados, com pouco exercício físico.

Endocrinamente o pós-parto está caracterizado por uma liberação massiva de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante 10 ou 20 dias, com um pico de secreção aos 3 dias pós-parto. Quanto maior a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ menor tempo para se completar a involução uterina. A diminuição da concentração plasmática de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é paralela com a diminuição do diâmetro do corpo do útero. Entretanto, em animais com alguma alteração na involução uterina, geralmente como consequência de parto distócico, é encontrada uma prolongação da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. A razão desta prolongação pode estar na estimulação exercida por toxinas bacterianas ou dos tecidos lesados.

A reinstalação da atividade ovárica está relacionada com a involução uterina. Daí que o retorno ao estado normal tenha sido procurado mediante a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou seus análogos. Aos 15 dias após o parto é possível encontrar folículos pré-ovulatórios. A primeira ovulação geralmente vem com cio silente e um

CL de duração mais curta que o normal. Na regressão deste primeiro CL não parece intervir a ocitocina, e sim a prematura e massiva liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. O ciclo seguinte em geral é de curta duração, ocorrendo ovulação por volta do dia 50 pós-parto, com uma proporção de cios silentes de 36% e uma taxa de fertilidade de 50%.

A administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou PGE_2 em vacas, cobaias e mulheres mostrou estímulo sobre a ejeção do leite, provavelmente por efeito central sobre a liberação de ocitocina da neurohipófise.

VIII.4.5. Gestação.

As PGs exercem um importante papel na instauração da gestação desde sua presença no plasma seminal, regulando a motilidade espermática e o transporte dos espermatozoides no oviduto, graças a seu efeito estimulatório sobre a contratilidade das paredes do trato feminino. Também é importante a ação das PGs no transporte do embrião, na implantação e na função placentária.

Os embriões têm capacidade de sintetizar, ainda antes da implantação, PGs das séries E e F. Na égua, embriões com 5 ou 6 dias secretam PGE_2 , sinal que estimula o seu transporte para o útero. Os óvulos não fecundados ficam no oviduto.

Na vaca, o reconhecimento maternal da gestação ocorre por volta do dia 15 do ciclo, momento em que o embrião deve enviar sinais ao endométrio para evitar que libere $\text{PGF}_{2\alpha}$ e, portanto, evitar a luteólise, para permitir o avanço da gestação. O sinal embrionário secretado pelo embrião parece ser uma proteína similar ao interferon, secretada entre os 16 a 26 dias de vida do embrião, e que teria efeito antiluteolítico. Inicialmente a proteína foi denominada Proteína Trofoblástica Bovina I. Para ser diferenciada de outros interferons, foi chamada de interferon τ (theta).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é sintetizada principalmente pelas células epiteliais do endométrio, enquanto que as células do estroma sintetizam predominantemente PGE . O interferon τ atua sobre as células epiteliais como sinal parácrina antiluteolítica evitando a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os mecanismos da ação do interferon incluem: (a) estabilização dos receptores endometriais de progesterona, para manter o bloqueio deste hormônio sobre a expressão de receptores endometriais para estrógenos e ocitocina; (b) inibição dos receptores de estrógenos para

atenuar a liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$; (c) inibição da expressão de receptores para ocitocina. O interferon parece atuar também sobre a atividade do sistema imune para evitar o ataque sobre o embrião.

A PGE_2 secretada pelo embrião em maior quantidade por volta do dia 18 de gestação na vaca é tido como sinal luteotrópica, bem como imunorregulatória local.

VIII.5. Aplicações terapêuticas das prostaglandinas.

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ e seus análogos são provavelmente os fármacos mais usados no manejo da reprodução dos bovinos. Em gado de corte, a utilização em ordem decrescente, é mais comum nos seguintes casos: (a) tratamento de patologias uterinas, (b) indução de abortos, (c) controle e sincronização de cios, e (d) indução do parto. Em gado de leite, seu uso é maior em: (a) tratamento de infecções uterinas, (b) sincronização de cios, (c) evidenciar cios não detectados, (d) retenção placentária, (e) cistos ovarianos, (f) indução de abortos, (g) indução do parto.

VIII.6. Referências bibliográficas.

Beal, W.E. Application of knowledge about corpus luteum function in control of estrus and ovulation in cattle. *Theriogenol.* 45, 1399-1411. 1996.

Booth, N., McDonald, L. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. São Paulo: Guanabara-Koogan. 1992.

Hansel, W. Bovine corpus luteum: a historic

overview and implications for the future. *Theriogenol.* 45, 1265-1266. 1996.

- Lindell, J.O. & Kindahl, H. Exogenous prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ promotes uterine involution in the cow. *Acta Vet. Scand.* 24 (3): 269-274. 1983.
- Milvae, R.A., Hinckley, S.T., Carlson, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenol.* 45, 1327-1349. 1996.
- Orihuela, T.A., Galina, C.S., Duchateau, A. The efficacy of estrus detection and fertility following synchronization with $\text{PGF}_{2\alpha}$ or synchro-mate-B in zebu cattle. *Theriogenol.* 32, 745-753. 1989.
- Ott, R.S. & Gustafsson, B.K. Therapeutic applications of prostaglandins for postpartum infections. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 77: 363-369. 1981.
- Parkinson, T.J., Jenner, L.J., Lamming, G.E. Comparison of oxytocin/prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ interrelationships in cyclic and pregnant cows. *J. Reprod. Fertil.* 90, 337-345. 1990.
- Putney, D.J., Gross, T.S., Thatcher, W.W. Prostaglandin secretion by endometrium of pregnant and cyclic cattle at day 17 after oestrus in response to in vitro heat stress. *J. Reprod. Fertil.* 84, 475-483. 1988.
- Rodriguez, M.H., Ko, J., McKeena, D. et al. Uterine motility in the cow during the estrous cycle. II. comparative effects of prostaglandins $\text{F}_{2\alpha}$, E_2 e cloprostenol. *Theriogenol.* 27, 349-357. 1987.