

Ramiro Corujeira Valentim

ESTUDO DA SAZONALIDADE SEXUAL EM CARNEIROS DA RAÇA CHURRA GALEGA BRAGANÇANA

APLICAÇÃO DE DOIS TRATAMENTOS — LUZ E MELATONINA



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO
VILA REAL 2004

Este trabalho foi expressamente elaborado para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Zootécnica, de acordo com o disposto no nº1 do Artigo 8º do Decreto-Lei 388/70, de 18 de Agosto.

Este trabalho foi realizado no âmbito do Programa PRODEP, Medida 5.4 – Formação Avançada de Docentes.

AGRADECIMENTOS

Aos Conselhos Directivo e Científico da Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB), expressamos o nosso reconhecimento pela disponibilização de parte dos meios necessários à nossa promoção académica e valorização profissional. À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), na pessoa do seu Magnífico Reitor, Professor Doutor ARMANDO MASCARENHAS FERREIRA, agradecemos todo o apoio necessário à realização duma parte significativa da componente experimental desta tese de doutoramento.

Aos Professores Doutores JOSÉ FOLCH PERA e JORGE MANUEL TEIXEIRA DE AZEVEDO, o nosso muito obrigado pela orientação científica do presente trabalho, bem como pela total disponibilidade evidenciada sempre que a ajuda se tornou necessária.

Ao Professor Doutor ARNALDO ALVES DIAS DA SILVA, então Coordenador Científico do Departamento de Zootecnia da UTAD, estamos muito gratos pela autorização da utilização das salas com controlo de luz desta Instituição, especialmente porque temos consciência de que teve de adiar a realização de alguns dos seus trabalhos.

Aos Professores Doutores RAMIRO RIBEIRO VALENTIM e JOSÉ CARLOS MARQUES DE ALMEIDA, Engenheira TERESA MARIA MONTENEGRO DE ARAÚJO ALMENDRA CORREIA e Doutor RAIMUNDO MANUEL ÁLVARES SERRÃO MAURÍCIO, estamos muito gratos pela discussão dos temas abordados, bem como pelas sugestões e críticas ao trabalho apresentado e à leitura do manuscrito. Aos Professores Doutores RAMIRO DOUTEL MASCARANHAS, JOÃO PEDRO SANTA-CLARA BARBAS e SEVERIANO JOSÉ CRUZ DA ROCHA E SILVA, o nosso muito obrigado pela amabilidade com que disponibilizaram parte da bibliografia utilizada neste trabalho. Ao Engenheiro LUÍS DE SOUSA COSTA, agradecemos a disponibilização dos dados relativos aos parâmetros ambientais.

Aos Tratadores de Animais, de uma forma muito particular aos Srs. MANUEL JOAQUIM GONÇALVES e LUÍS CARLOS VILA, à Auxiliar Técnica, da ESAB, MARIA DO CÉU MATOS, assim como ao Técnico Superior PAULO JOSÉ PEIXOTO FONTES e ao Tratador de Animais ANTÓNIO MACHADO VILELA, da UTAD, o nosso muito obrigado pelo apoio prestado. Sem a ajuda destas pessoas este trabalho jamais poderia ter sido feito.

Aos responsáveis do Programa PRODEP, Medida 5.4, Formação Avançada de Docentes, agradecemos o apoio financeiro necessário à nossa dispensa do serviço docente nos anos de 2001 a 2003.

À secção de Reprografia, são igualmente devidos agradecimentos pela ajuda prestada na composição gráfica e na impressão deste trabalho.

Aos meus PAIS, IRMÃOS e em particular à minha ESPOSA, estamos profundamente gratos por todo o apoio dispensado e a paciência infinita que sempre tiveram, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha AFILHADA, ao meu AFILHADO e aos meus SOBRINHOS, o nosso muito obrigado por nos mostrarem o poder contido na inocência dos seus “sorrisos”.

Aos nossos amigos e colegas, Professores Doutores MARIA DO LORETO MONTEIRO e ÁLVARO LUÍS PEGADO LEMOS DE MENDONÇA, aos Drs ANABELA RODRIGUES LOURENÇO MARTINS, RAIMUNDO MANUEL ÁLVARES SERRÃO MAURÍCIO e MANUEL SERRA CARDOSO e às Eng^a TERESA MARIA MONTENEGRO DE ARAÚJO ALMENDRA CORREIA, MARIA DE LURDES CICORO GALVÃO e MARIETA AMÉLIA MARTINS DE CARVALHO, gostaríamos de afirmar que jamais esqueceremos o apoio incondicional em tempos tão complicados....

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objectivo estudar a sazonalidade sexual em carneiros da raça autóctone Churra Galega Bragançana e avaliar a forma como estes animais respondem à aplicação de dois tratamentos – luminoso de “dias curtos” (8L:16E) e administração de melatonina exógena – no decurso da Primavera.

Primeiramente, procedeu-se a uma revisão bibliográfica sobre os efeitos e os mecanismos relacionados com o fotoperíodo e a secreção de melatonina e o modo como estes controlam a sazonalidade reprodutiva nos ovinos.

Posteriormente, no decurso do ano de 1998, procedeu-se ao estudo da sazonalidade sexual, designadamente no que concerne à evolução dos níveis plasmáticos de testosterona total, ao tamanho dos testículos, à produção seminal e ao comportamento sexual de um grupo de 21 carneiros Churros Bragançanos. Este estudo foi feito em Bragança, mais precisamente na Quinta de Sta Apolónia, pertença da Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB), nas condições de manejo aí existentes.

Em Dezembro de 1999, 21 carneiros Churros Bragançanos foram transportados para as instalações com controlo de luz da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), dando-se início ao estudo da aplicação dos tratamentos anteriormente referidos. Avaliaram-se os seus efeitos sobre os níveis plasmáticos de testosterona total, o tamanho dos testículos, a produção seminal e o comportamento sexual.

A actividade sexual dos carneiros Churros Bragançanos variou ao longo do ano. De um modo geral, esta foi mais elevada no período de Verão-Outono do que no de Inverno-Primavera. As diferenças entre carneiros, relativamente à generalidade dos parâmetros sexuais estudados, revelaram-se muito elevadas. Somente os parâmetros definidores da qualidade seminal não variaram significativamente entre carneiros. Dos vários parâmetros sexuais avaliados, o peso corporal apenas afectou, com uma reduzida expressividade, o tamanho dos testículos. De igual modo, a condição corporal só afectou significativamente o tamanho testicular.

A passagem abrupta de um regime luminoso natural de “dias crescentes” para outro artificial de “dias curtos” desencadeou, no prazo de 8 semanas, uma resposta testicular significativa, ou seja, cerca de um mês antes da observada entre os carneiros Testemunha. A aplicação de três implantes subcutâneos de melatonina (3 x 18 mg) por carneiro não produ-

ziu efeitos sobre a resposta testicular semelhantes aos do tratamento luminoso de “dias curtos”. Os efeitos dos tratamentos luminoso de “dias curtos” e com melatonina exógena sobre o comportamento sexual dos carneiros Churros Bragançanos foram desprezáveis.

Novos trabalhos deverão ser realizados no futuro, aproveitando os ensinamentos e a experiência técnico-laboratorial conseguidos ao longo deste trabalho, que foi pioneiro no estudo da sazonalidade sexual entre os carneiros da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como principal objetivo estudiar la estacionalidad sexual de moruecos de la raza autóctona portuguesa Churra Galega Bragançana y la evaluación de la respuesta de estos animales a la aplicación de dos tratamientos – luminoso de “días cortos” (8L:16O) y administración de melatonina exógena – en Primavera.

Primero se hizo una revisión bibliográfica sobre los efectos y los mecanismos ligados al fotoperíodo y a la secreción de melatonina y su acción en el control de la estacionalidad reproductiva en ovinos.

Posteriormente, en el año de 1998, hemos estudiado la estacionalidad sexual de 21 moruecos Churros Bragançanos, especialmente en lo que respecta a la evolución de los niveles plasmáticos de testosterona total, al tamaño testicular, a la producción de semen y al comportamiento sexual. Este ensayo fue desarrollado en Bragança, más precisamente en la granja de Sta. Apolónia, bajo las condiciones de manejo existentes en la Escuela Superior Agraria de Bragança (ESAB).

En Diciembre de 1999, los moruecos Churros Bragançanos fueron transportados y ubicados en las instalaciones con control de luz de la Universidad de Tras-os-Montes y Alto Douro (UTAD) donde se estudió su respuesta a la aplicación de los tratamientos antes mencionados. Fueron igualmente evaluados los niveles plasmáticos de testosterona total, el tamaño testicular, la producción de semen y el comportamiento sexual.

La actividad sexual de los moruecos Churros Bragançanos varió según la estación del año. En general, fue más elevada en Verano-Otoño y menor en Invierno-Primavera. Las diferencias entre moruecos fueron casi siempre muy elevadas. Sólo la calidad seminal no varió significativamente en función del morueco estudiado. El peso y la condición corporal sólo afectaron significativamente el tamaño testicular.

El cambio súbito de un régimen luminoso natural de “días crecientes” a otro artificial de “días cortos” originó, en 8 semanas, una respuesta testicular significativa, anticipando en 4 semanas la respuesta natural de los moruecos Churros Bragançanos. A su vez, la aplicación de 3 implantes subcutáneos de melatonina (3 x 18 mg) por morueco no determinó una respuesta testicular semejante a la inducida por el tratamiento luminoso de “días cortos”. Los efectos de los tratamientos luminoso y con melatonina exógena sobre el comportamiento sexual no fueron expresivos.

Nuevos trabajos deberán realizarse en el futuro, aprovechando los conocimientos y la experiencia técnico-laboratorial conseguidos a lo largo de este trabajo, que fue pionero en el estudio de la estacionalidad sexual en los moruecos de la raza autóctona portuguesa Churra Galega Bragançana.

ABSTRACT

The main aim of this work was to study the sexual seasonality of Portuguese autochthonous Churra Galega Bragançana breed rams. The sexual response to two different treatments – “short days” lighting (8L:16D) and exogenous melatonin administration – was also evaluated during Spring.

First a bibliographic review on the effects and mechanisms concerning photoperiod and melatonin secretion and how they control breeding seasonality in sheep was performed.

Sexual seasonality was assessed by testosterone plasmatic levels, testis size, sperm production and sexual behaviour tests during the year of 1998. This assay took place at the Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB) facilities in Bragança (NE of Portugal), involving 21 adult Churra Galega Bragançana rams.

On December 1999, these rams were transferred to Trás-os-Montes e Alto Douro University (UTAD) light proof facilities in Vila Real (NE of Portugal) where they were allocated for 7 months. Light and exogenous melatonin treatments were performed at Vila Real. Once again testosterone plasmatic levels, testis size, sperm production and sexual behaviour were evaluated.

Churra Galega Bragançana rams presented sexual seasonality. In general, sexual performance was higher on the Summer-Fall period and lower on the Winter-Spring period. Sexual differences between rams were very high, except on sperm quality. Rams' energy *status* influenced significantly just the testis size.

The sudden transition from a natural increasing photoperiod to an artificial “short days” lighting determined a significant testis response in 8 weeks. On the other hand the application of 3 subcutaneous implants (3 x 18 mg) per ram had no expressive sexual effect.

New studies should be performed in the future using the knowledge and the experimental squeals acquired on the present study, pioneer on the study of sexual seasonality among Churra Galega Bragançana rams.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – SAZONALIDADE REPRODUTIVA	3
2.1 – ACÇÃO DO FOTOPERÍODO	6
2.1.1 – PERÍODO FETAL	6
2.1.2 – PERÍODO PERINATAL	7
2.1.3 – PROCESSO DA PUBERDADE	8
2.1.4 – CARNEIROS	10
3 – TRADUÇÃO DA INFORMAÇÃO FOTOPERIÓDICA EM MENSAGEM HORMONAL	15
3.1 – NÚCLEOS SUPRAQUIASMÁTICOS	17
3.2 – IMPORTÂNCIA DA SECREÇÃO DE MELATONINA	24
3.3 – MELATONINA	27
3.3.1 – SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA MELATONINA	30
3.3.2 – RITMO DE SECREÇÃO DA MELATONINA	37
3.3.3 – PARÂMETROS CHAVE DO RITMO DE SECREÇÃO DA MELATONINA	39
3.3.4 – SINCRONIZAÇÃO DO “RELÓGIO” INTERNO COM O FOTOPERÍODO DIÁRIO	46

3.4 – ESTADOS REFRACTÁRIOS	51
3.5 – FORMAS DE ACÇÃO DA MELATONINA	55
3.5.1 – VIA ESTROGÉNIOS	60
3.5.2 – VIA PROGESTERONA	64
3.5.3 – VIA PROLACTINA	64
3.5.4 – DISTRIBUIÇÃO DOS NEURÓNIOS GnRH	67
3.5.5 – LOCAIS DE ACÇÃO DA MELATONINA	70
3.5.5.1 – SOBRE A HIPÓFISE	72
3.5.5.2 – SOBRE O HIPOTÁLAMO	75
3.5.5.3 – SOBRE OUTRAS REGIÕES CEREBRAIS	78
3.5.5.4 – SOBRE OUTROS ÓRGÃOS OU TECIDOS	79
3.5.6 – MECANISMOS DE ACÇÃO DA MELATONINA	80
3.5.6.1 – SOBRE O SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPOFISÁRIO	80
3.5.6.1.1 – PÉPTIDOS OPIÓIDES ENDÓGENOS	82
3.5.6.1.1.1 – β -ENDORFINA	83
3.5.6.1.1.2 – NALOXONA	84
3.5.6.1.1.3 – MORFINA	85
3.5.6.1.2 – CATECOLAMINAS	85
3.5.6.1.2.1 – NORADRENALINA	86
3.5.6.1.2.2 – DOPAMINA	86
3.5.6.1.2.3 – SEROTONINA	92
3.5.6.1.3 – ÁCIDO- γ -AMINO-BUTÍRICO	93
3.5.6.1.4 – AMINOÁCIDOS EXCITANTES	95

3.5.6.1.5 – HORMONAS TIROIDEIAS	96
3.5.6.1.6 – PLASTICIDADE SAZONAL DOS NEURÓNIOS GNRH	99
PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL	101
1 – MATERIAL E MÉTODOS	101
1.1 – ESTUDO DA SAZONALIDADE SEXUAL	101
1.2 – ESTUDO DA APLICAÇÃO DE TRATAMENTOS DE LUZ E MELATONINA	102
1.2.1 – TRATAMENTOS – LUZ E MELATONINA	103
1.3 – PESAGEM E DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL	104
1.4 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL	104
1.5 – DETERMINAÇÃO DO PERÍMETRO ESCROTAL	105
1.6 – DETERMINAÇÃO DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS	105
1.6.1 – VOLUME DO EJACULADO	105
1.6.2 – CONCENTRAÇÃO DO EJACULADO	105
1.6.3 – MOTILIDADE MASSAL	106
1.6.4 – MOTILIDADE INDIVIDUAL	106
1.6.5 – PERCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES VIVOS	107
1.6.6 – PERCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES NORMAIS	107
1.7 – DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL	107
1.8 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	108
2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
2.1 – SAZONALIDADE SEXUAL	109

2.1.1 – VARIAÇÃO DO PESO E DA CONDIÇÃO CORPORAL	109
2.1.1.1 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E SECREÇÃO DE TESTOSTERONA TOTAL	115
2.1.1.2 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E TAMANHO DOS TESTÍCULOS	116
2.1.1.3 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E PRODUÇÃO SEMINAL	117
2.1.1.4 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E COMPORTAMENTO SEXUAL	119
2.1.2 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL	119
2.1.2.1 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS DE TESTOSTERONA TOTAL E TAMANHO DOS TESTÍCULOS	123
2.1.2.2 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS DE TESTOSTERONA TOTAL E PRODUÇÃO SEMINAL	124
2.1.2.3 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS DE TESTOSTERONA TOTAL E COMPORTAMENTO SEXUAL	125
2.1.3 – VARIAÇÃO DO TAMANHO DOS TESTÍCULOS	126
2.1.3.1 – RELAÇÃO ENTRE TAMANHO DOS TESTÍCULOS E PRODUÇÃO SEMINAL	129
2.1.3.2 – RELAÇÃO ENTRE TAMANHO DOS TESTÍCULOS E COMPORTAMENTO SEXUAL	130
2.1.4 – VARIAÇÃO DA PRODUÇÃO SEMINAL	131
2.1.4.1 – RELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO SEMINAL E COMPORTAMENTO SEXUAL	143
2.1.5 – VARIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL	144

2.2 – TRATAMENTOS DE LUZ E MELATONINA	150
2.2.1 – VARIAÇÃO DO PESO E DA CONDIÇÃO CORPORAL	151
2.2.1.1 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E SECREÇÃO DE TESTOSTERONA TOTAL	154
2.2.1.2 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E TAMANHO DOS TESTÍCULOS	155
2.2.1.3 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E PRODUÇÃO SEMINAL	156
2.2.1.4 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E COMPORTAMENTO SEXUAL	157
2.2.2 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL	158
2.2.2.1 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL E TAMANHO DOS TESTÍCULOS	163
2.2.2.2 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL E PRODUÇÃO SEMINAL	164
2.2.2.3 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL E COMPORTAMENTO SEXUAL	165
2.2.3 – VARIAÇÃO DO TAMANHO DOS TESTÍCULOS	165
2.2.3.1 – RELAÇÃO ENTRE TAMANHO DOS TESTÍCULOS E PRODUÇÃO SEMINAL	168
2.2.3.2 – RELAÇÃO ENTRE TAMANHO DOS TESTÍCULOS E COMPORTAMENTO SEXUAL	169
2.2.4 – VARIAÇÃO DA PRODUÇÃO SEMINAL	169
2.2.4.1 – RELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO SEMINAL E COMPORTAMENTO SEXUAL	173

2.2.5 – VARIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL	173
2.3 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	175
3 – CONCLUSÕES	177
PARTE III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – CALENDARIZAÇÃO DO CICLO REPRODUTIVO ANUAL DE ALGUNS REPRODUTORES SAZONAIS	3
FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL EM ANIMAIS EXPLORADOS SOB CONDIÇÕES NATURAIS	9
FIGURA 3 – VARIAÇÃO SAZONAL DA PRODUÇÃO DIÁRIA DE ESPERMATOZÓIDES, POR TESTÍCULO, NOS CARNEIROS	11
FIGURA 4 – ESQUEMA DO PERCURSO FEITO PELO IMPULSO NERVOSO GERADO PELA LUZ, DESDE OS FOTORRECEPTORES DA RETINA ATÉ À GLÂNDULA PINEAL	16
FIGURA 5 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO ENVOLVIMENTO DOS GENES “RELÓGIO” NO CONTROLO DA RITMICIDADE NOS RATOS	21
FIGURA 6 – REGULAÇÃO SAZONAL DOS CICLOS REPRODUTIVO, DE CRESCIMENTO DA PELAGEM E DE REGULAÇÃO DAS RESERVAS CORPORAIS DE GORDURA	26
FIGURA 7 – PERFIS NECTIMÉRICOS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE MELATONINA, EM OVELHAS OVARIETOMIZADAS E TRATADAS COM IMPLANTES DE ESTRADIOL, DETERMINADOS 17 DIAS ANTES DOS SOLSTÍCIOS OU 7 DIAS APÓS OS EQUINÓCIOS	29
FIGURA 8 – RITMOS DO METABOLISMO DA MELATONINA	31
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DOS DOIS TIPOS DE SINAL QUE A SECREÇÃO DE MELATONINA FORNECE A UM ANIMAL: “RELÓGIO” E “CALENDÁRIO”	34
FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS HIPÓTESES DA AMPLITUDE, DA DURAÇÃO E DA FASE (OU COINCIDÊNCIA INTERNA)	40

FIGURA 11 – MODELOS DE FORMAÇÃO DO SINAL DA MELATONINA SOB “DIAS LONGOS” (16L:8E) E SOB “DIAS CURTOS” (8L:16E)	48
FIGURA 12 – MODELOS DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MEDIÇÃO DO TEMPO FOTOPERIÓDICO, DE ANIMAIS DE “DIAS LONGOS”	50
FIGURA 13 – MODIFICAÇÃO DA SECREÇÃO PULSÁTIL DE LH DETERMINADA PELA MELATONINA, EM OVELHAS DA RAÇA ILE-DE-FRANCE	54
FIGURA 14 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO HIPOTÁLAMO E DE ALGUMAS ESTRUTURAS ADJACENTES	56
FIGURA 15 – MODIFICAÇÃO SAZONAL DA SECREÇÃO DE LH FACE À RETROACÇÃO NEGATIVA EXERCIDA PELO ESTRADIOL	57
FIGURA 16 – ESQUEMA HIPOTÉTICO DE CONTROLO DA SAZONALIDADE REPRODUTIVA NAS OVELHAS	59
FIGURA 17 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS NERVOSAS COM RECEPTORES DE ESTROGÉNIO, QUE EMITEM PROJECCÕES PARA A EM DOS OVINOS	62
FIGURA 18 – VARIAÇÃO ANUAL DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PROLACTINA EM CARNEIROS E EM OVELHAS	65
FIGURA 19 – DISTRIBUIÇÃO HIPOTALÂMICA DOS NEURÓNIOS DE GNRH NAS OVELHAS	70
FIGURA 20 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS DIFERENTES PORÇÕES DA HIPÓFISE	73
FIGURA 21 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MODO DE ACÇÃO DE AGENTES AGONISTAS E ANTAGONISTAS	76
FIGURA 22 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ÁREA HIPOTALÂMICA MÉDIO BASAL	76

FIGURA 23 – MÚLTIPLOS LOCAIS DE ACÇÃO DA MELATONINA, DESDE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL (CNS) ATÉ AO APARELHO GENITAL E ÀS GLÂNDULAS MAMÁRIAS	79
FIGURA 24 – PRINCIPAIS VIAS DE COMUNICAÇÃO ENTRE O HIPOTÁLAMO E A HIPÓFISE, PARA ALÉM DO LÍQUIDO CÉFALO-RAQUIDIANO	81
FIGURA 25 – BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA DOPAMINA	87
FIGURA 26 – INTERACÇÕES ENTRE SISTEMAS NEURONAIS RESPONSÁVEIS PELA INIBIÇÃO DA SECREÇÃO DE GNRH/LH EM OVELHAS SUJEITAS A UM REGIME FOTOPERIÓDICO DE “DIAS LONGOS”	91
FIGURA 27 – VARIAÇÃO ANUAL DO PERÍODO DIÁRIO DE LUZ EM BRAGANÇA	101
FIGURA 28 – VARIAÇÃO MENSAL DA TEMPERATURA MÉDIA DO AR NORMALIZADA E NO DECURSO DO ANO DE 1998	102
FIGURA 29 – VARIAÇÃO MENSAL DO PESO CORPORAL MÉDIO (KG) DOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	110
FIGURA 30 – VARIAÇÃO SAZONAL DO PESO CORPORAL MÉDIO (KG) DOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	111
FIGURA 31 – VARIAÇÃO MENSAL E SAZONAL DA CONDIÇÃO CORPORAL MÉDIA DOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	112
FIGURA 32 – VARIAÇÃO MENSAL DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS (NG/ML) DE TESTOSTERONA TOTAL DOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	121
FIGURA 33 – VARIAÇÃO SAZONAL DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS (NG/ML) DE TESTOSTERONA TOTAL DOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	122

FIGURA 34 – VARIAÇÃO MENSAL DO PERÍMETRO ESCROTAL MÉDIO (CM) DOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	127
FIGURA 35 – VARIAÇÃO SAZONAL DO PERÍMETRO ESCROTAL MÉDIO (CM) DOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	128
FIGURA 36 – VARIAÇÃO MENSAL DO VOLUME SEMINAL MÉDIO (ML) E DAS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DO EJACULADO (ESPERMATOZÓIDES) E ESPERMÁTICA (ESPERMATOZÓIDES/ML) PRODUZIDOS PELOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	134
FIGURA 37 – VARIAÇÃO SAZONAL DO VOLUME SEMINAL MÉDIO (ML) E DAS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DO EJACULADO (ESPERMATOZÓIDES) E ESPERMÁTICA (ESPERMATOZÓIDES/ML) PRODUZIDOS PELOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	135
FIGURA 38 – VARIAÇÃO MENSAL DAS MOTILIDADES MÉDIAS MASSAL E INDIVIDUAL DOS ESPERMATOZÓIDES PRODUZIDOS PELOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	137
FIGURA 39 – VARIAÇÃO MENSAL DAS PERCENTAGENS MÉDIAS DE ESPERMATOZÓIDES NORMAIS E VIVOS PRODUZIDOS PELOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	141
FIGURA 40 – VARIAÇÃO SAZONAL DAS PERCENTAGENS MÉDIAS DE ESPERMATOZÓIDES NORMAIS E VIVOS PRODUZIDOS PELOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	142
FIGURA 41 – VARIAÇÃO MENSAL DO PESO CORPORAL MÉDIO (KG) DOS CARNEIROS ESTUDADOS, NO PERÍODO PRÉ-TRATAMENTOS	152
FIGURA 42 – VARIAÇÃO MENSAL DO PESO CORPORAL MÉDIO (KG) DOS CARNEIROS DOS VÁRIOS GRUPOS ESTUDADOS, DURANTE O PERÍODO DE TRATAMENTOS	153
FIGURA 43 – VARIAÇÃO MENSAL DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS	

(NG/ML) DE TESTOSTERONA TOTAL DOS CARNEIROS DOS VÁRIOS GRUPOS ESTUDADOS, DURANTE O PERÍODO PRÉ-TRATAMENTOS	159
FIGURA 44 – VARIAÇÃO MENSAL DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS (NG/ML) DE TESTOSTERONA TOTAL, NO PERÍODO DE TRATAMENTOS	160
FIGURA 45 – VARIAÇÃO MENSAL DO PERÍMETRO ESCROTAL MÉDIO (CM) DOS CARNEIROS DOS VÁRIOS GRUPOS ESTUDADOS, DURANTE O PERÍODO PRÉ-TRATAMENTOS	166
FIGURA 46 – VARIAÇÃO MENSAL DO PERÍMETRO ESCROTAL MÉDIO (CM) DOS CARNEIROS DOS VÁRIOS GRUPOS ESTUDADOS, DURANTE O PERÍODO DE TRATAMENTOS	167

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO I – VARIAÇÃO MENSAL DA DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS CARNEIROS ESTUDADOS POR TRÊS CLASSES DE CONDIÇÃO CORPORAL	113
QUADRO II – VARIAÇÃO SAZONAL DA DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS CARNEIROS ESTUDADOS POR TRÊS CLASSES DE CONDIÇÃO CORPORAL	114
QUADRO III – NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS DE TESTOSTERONA TOTAL (NG/ML) DOS CARNEIROS ESTUDADOS, TENDO EM CONTA A SUA CLASSE DE CONDIÇÃO CORPORAL	116
QUADRO IV – PERÍMETRO ESCROTAL MÉDIO (CM) DOS CARNEIROS ESTUDADOS, TENDO EM CONTA A SUA CLASSE DE CONDIÇÃO CORPORAL	117
QUADRO V – VARIAÇÃO MENSAL DAS MOTILIDADES MASSAL E INDIVIDUAL DOS EJACULADOS PRODUZIDOS PELOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	138
QUADRO VI – VARIAÇÃO MENSAL DAS MOTILIDADES MASSAL E INDIVIDUAL, DEPOIS DE AGRUPAR OS EJACULADOS ESTUDADOS EM DUAS CLASSES: NÃO UTILIZÁVEIS (< 4,0) E UTILIZÁVEIS (≥ 4,0)	139
QUADRO VII – VARIAÇÃO SAZONAL DAS MOTILIDADES MASSAL E INDIVIDUAL DOS EJACULADOS PRODUZIDOS PELOS CARNEIROS CHURROS BRAGANÇANOS	140
QUADRO VIII – VARIAÇÃO MENSAL DO VALOR MÉDIO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS ESTUDADOS, AO LONGO DO ANO DE 1998	147
QUADRO IX – VARIAÇÃO SAZONAL DO VALOR MÉDIO DOS VÁRIOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS ESTUDADOS	148

QUADRO X – VARIAÇÃO MENSAL DA DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL
DOS CARNEIROS ESTUDADOS POR DUAS CLASSES DE CONDIÇÃO
CORPORAL

154

ÍNDICE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DA MOTILIDADE MASSAL DO SÉMEN	106
TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DA MOTILIDADE INDIVIDUAL DO SÉMEN	106

GLOSSÁRIO

16L:8E – 16 horas de luz : 8 de escuridão

5-HT – Serotonina

8L:16E – 8 horas de luz : 16 de escuridão

AANAT – N-acetiltransferase

ABP – Proteína de ligação aos androgénios

AHA – Área hipotalâmica anterior

AMP_c – Adenosina monofosfato cíclica

ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro

CC – Condição corporal

CK1 ϵ – Caseína quinase 1 ϵ

CNS – Sistema nervoso central

Cry – Genes criptocromo

Cry1 – Gene criptocromo 1

Cry2 – Gene criptocromo 2

c.v. – Coeficiente de variação

DA – Dopamina

dBb/MS – Banda diagonal da região septal de Broca/região média

EM – Eminência mediana

EOP – Péptidos opióides endógenos

Er α – Receptor estrogénico citosólico do tipo α

Er β – Receptor estrogénico citosólico do tipo β

FSH – Hormona folículo-estimulante

GABA – Ácido- γ -amino-butírico

GABA_A – Receptor GABAérgico do tipo A

GnRH – Hormona de libertação das gonadotropinas
GnRH/LH – GnRH e de LH
HR – Humidade relativa do ar
I – Insolação
ICER – Gene repressor precoce APMc indutível
IGF-I – Factor de crescimento da insulina I
LH – Hormona luteinizante
MBH – Área hipotalâmica médiobasal
MET1 – Receptor membranar de melatonina do subtipo 1
MET2 – Receptor membranar de melatonina do subtipo 2
MET3 – Receptor membranar de melatonina do tipo 3
MET3 α – Receptor membranar de melatonina do tipo 3, isoforma α
MET3 β – Receptor membranar de melatonina do tipo 3, isoforma β
MOR – Morfina
MPOA – Área pré-óptica mediana
MVH – Área hipotalâmica ventro-mediana
NAT – N-acetil-transferase
NLX – Naloxona
NMA – N-metil-aspartato
NMDA – N-metil-D-aspartato
NOR – Noradrenalina
NPY – Neuropeptido Y
OVLT – *organum vasculosum de lamina terminalis*
PACAP – Polipéptido activador da adenilciclase
PD – Pars distalis
Per – Genes período

Per1 – Gene período 1

Per2 – Gene período 2

Per3 – Gene Período 3

PI – *Pars intermedia*

PMH – Área hipotalâmica pré-mamilar

POA – Área pré-óptica

POMC – Pró-opiomelanocortina

PRC – Curva de resposta de fase

PRL – Prolactina

PT – *Pars tuberalis*

PVN – Núcleo hipotalâmico paraventricular

r – Coeficiente de correlação

r^2 – Coeficiente de determinação

R – Precipitação total

SCN – Núcleos supra-quiasmáticos

SON – Núcleo supra-óptico

T – Temperatura do ar

T_3 – 3,5,3'-triiidotironina

T_4 – Tiroxina

TH – Triptofano hidrolase

Tim – Gene *timeless*

TRH – Tireotropina

$\bar{x} \pm sd$ – Média $\pm$ desvio padrão

PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – INTRODUÇÃO

Nas regiões temperadas do globo terrestre, a actividade reprodutora dos ovinos é sazonal e é fundamentalmente controlada pelas alterações do fotoperíodo. Os momentos do amanhecer e do pôr-do-sol (que definem a duração do período diário de luz ou fotoperíodo diário) constituem os indicadores naturais mais fiáveis da altura do ano em que os animais se encontram e, como tal, podem ser por estes utilizados como marcadores de um calendário definidor de eventos biológicos tão importantes como a reprodução, a ingestão voluntária de alimentos, o metabolismo, a alteração das reservas corporais de gordura, o sono, o crescimento, etc.. Contudo, a actividade reprodutora destes animais é igualmente condicionada por outros factores, nomeadamente de ordem genética (a interpretação do fotoperíodo não é igual em todas as raças), climática (temperatura do ar, humidade relativa do ar, dinâmica atmosférica, etc.), nutricional, social, etc..

De acordo com os conhecimentos actuais, a informação luminosa, depois de captada pela retina, é transmitida, via nervosa, por etapas, até à glândula pineal, condicionando a secreção de melatonina. Esta hormona é produzida segundo um ritmo endógeno diário, definido pelos núcleos supraquiasmáticos, sincronizado pelo fotoperíodo diário e suprimido pela acção da luz.

A melatonina é a hormona responsável pela tradução dos efeitos do fotoperíodo sobre a actividade reprodutora. Nos ovinos, a estimulação da secreção de melatonina eleva a actividade reprodutora. Nestes animais, enquanto que os “dias curtos” estimulam este tipo de actividade, os “dias longos” inibem-na. Porém, quando submetidas prolongadamente a um fotoperíodo constante de “dias curtos”, as ovelhas acabam por entrar em anestro “sazonal”. Pelo contrário, quando sujeitas prolongadamente a um fotoperíodo constante de “dias longos”, estas fêmeas acabam por se tornar sexualmente activas. Nas ovelhas, as mudanças de direcção do fotoperíodo e a consequente alteração da secreção de melatonina desempenham um papel fundamental na magnitude e sentido da sua resposta reprodutiva. Aos “dias longos” (geradores de fenómenos inibidores) cabem as importantes funções de inibir a actividade reprodutora destas fêmeas e de ressensibilizar o seu sistema neuroendócrino relativamente aos “dias curtos” (geradores de fenómenos estimuladores).

Ainda que a melatonina possa actuar a vários níveis do eixo reprodutivo, a sua acção principal produz-se a nível do sistema nervoso central (CNS) e relaciona-se com a modificação da frequência de libertação de GnRH (hormona de libertação das gonadotropinas). Consequentemente, modificam-se também as frequências de libertação de LH (hormona luteinizante) e de esteróides sexuais. Esta acção da melatonina é conseguida através de dois mecanismos complementares: modulação directa da secreção de GnRH (esteróide-independente) e alteração da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário face à retroacção negativa exercida pelos esteróides gonadais (esteróide-dependente). A retroacção negativa é particularmente eficaz durante o período de anestro sazonal, bloqueando a ocorrência do pulso pré-ovulatório de GnRH/LH e consequentemente a ovulação.

A sazonalidade reprodutiva condiciona o funcionamento e a rentabilidade das explorações ovinas. Importa pois conhecer, o melhor possível, a fisiologia da reprodução dos ovinos com que se trabalha, de modo a poderem-se estabelecer estratégias adequadas à sua conveniente manipulação. A sazonalidade reprodutiva das ovelhas da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana foi já estudada por CORREIA (1996). De acordo com esta autora, a estação reprodutiva das ovelhas Churras Bragançanas estende-se de Junho a Fevereiro, ainda que o melhor período reprodutivo (tanto do ponto de vista comportamental como do da actividade ovárica) se situe entre Julho e Outubro. Por outro lado, o anestro sazonal destas ovelhas é pouco profundo, sendo o comportamento sexual mais afectado do que a actividade ovárica (CORREIA, 1996). No que concerne à sazonalidade sexual dos carneiros Churros Bragançanos, a falta de conhecimentos científicos é total. O presente trabalho teve, pois, como principal objectivo, o estudo da sazonalidade sexual em carneiros da raça Churra Galega Bragançana e a avaliação da forma como estes animais respondem à aplicação de dois tratamentos – luminoso de “dias curtos” e administração de melatonina exógena – no período do ano que à partida pensávamos ser menos favorável à sua actividade sexual – a Primavera.

2 – SAZONALIDADE REPRODUTIVA

Na natureza, a maioria dos mamíferos reproduz-se numa época específica do ano, para que os partos coincidam com a estação em que as condições climáticas e alimentares são mais favoráveis ao crescimento fetal final e à lactação (MALPAUX *et al.*, 1988, LOPEZ SEBASTIAN, 1989, MARTIN *et al.*, 1990, GODDARD, 1991, LINCOLN, 1992, MATTHEWS *et al.*, 1993, THATCHER e HANSEN, 1993, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, MALPAUX *et al.*, 1996a, THIMONIER, 1996, LEHMAN *et al.*, 1997, GUERIN e MATTHEWS, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, MALPAUX *et al.*, 2001, MARTIN *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003) (Figura 1). Por outro lado, as crias nascem numa época do ano, geralmente na Primavera, em que as condições alimentar e de temperatura são mais favoráveis ao começo do seu crescimento pós-natal (VIJIL, 1989, MARTIN *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003).

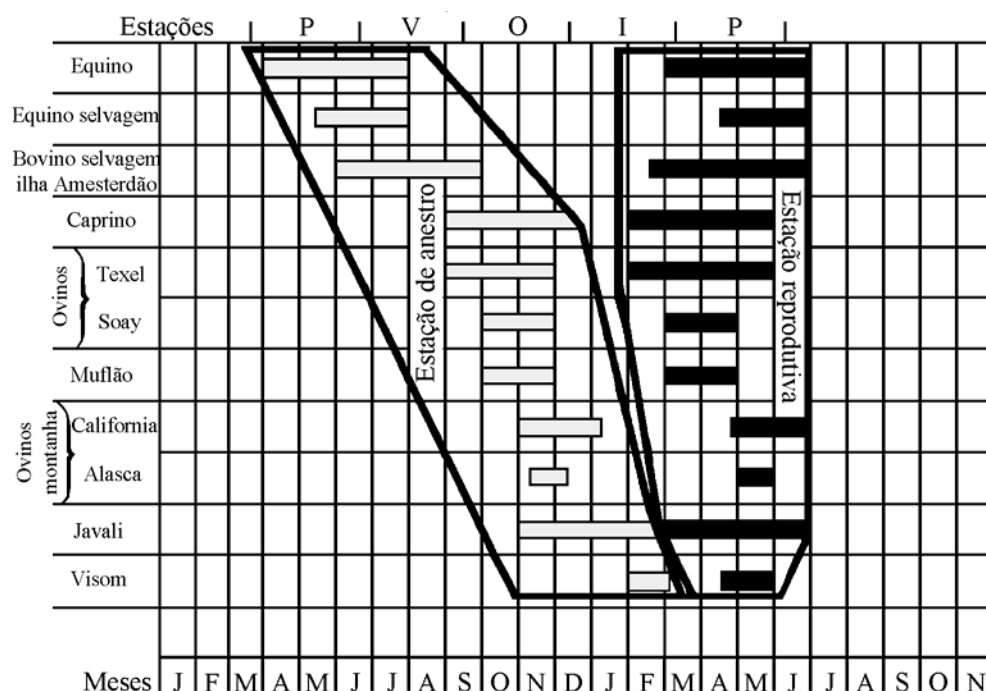


FIGURA 1 – Calendarização do ciclo reprodutivo anual de alguns reprodutores sazonais (ORTAVANT *et al.*, 1985).

Os animais de várias espécies domesticadas, tais como os bovinos, os suínos e os coelhos, deixaram já de apresentar uma reprodução marcadamente sazonal, desde que explorados em condições favoráveis (GOODMAN e KARSCH, 1981, VIJIL, 1989, MARTIN *et al.*,

1990, THATCHER e HANSEN, 1993 e MALPAUX *et al.*, 1996a). O mesmo parece suceder entre os equinos (FITZGERALD e MCMANUS, 2000). Porém, alguns aspectos da actividade reprodutora destes animais podem ainda ser alterados pela estação do ano (VIJIL, 1989, THATCHER e HANSEN, 1993 e ANDERSON *et al.*, 2000). Pelo contrário, os ovinos e os caprinos originários das regiões temperadas continuam a apresentar esta característica adaptativa, que se desenvolveu ao longo de milhões de anos (ORTAVANT *et al.*, 1988, VIJIL, 1989, MARTIN *et al.*, 1990, O'CALLAGHAN *et al.*, 1993, MALPAUX *et al.*, 1996a, SIROTKIN e SCHAEFFER, 1997, GOLDMAN, 2001 e THIÉRY *et al.*, 2002). Mesmo os ovinos Merino, muitas vezes considerados animais poliéstricos contínuos, continuam a manifestar alguma sazonalidade (STAPLES *et al.*, 1992 e BETTENCOURT, 2001, informação pessoal).

Nos ovinos e nos caprinos, a sazonalidade reprodutiva constitui frequentemente uma importante barreira ao seu manejo flexível (QUIRKE *et al.*, 1986, VIJIL, 1989, HARESIGN, 1993 e VINCENT *et al.*, 2000) e diminui a eficiência reprodutiva dos rebanhos comerciais (VIJIL, 1989, FITZGERALD e SELLFLUG, 1991, GATES *et al.*, 1998, VINCENT *et al.*, 2000 e EL-ALAMY *et al.*, 2001). Ainda que, geralmente, a sazonalidade reprodutiva se coadune perfeitamente às disponibilidades de pastoreio, os mercados têm normalmente muita dificuldade em absorver, em poucos meses, a produção total anual de carne fresca de borrego (VIJIL, 1986 e GATES *et al.*, 1998).

De acordo com o momento em que se inicia a época reprodutiva, os mamíferos podem ser, ainda que grosseiramente, divididos em dois grupos distintos: espécies de “dias longos” e espécies de “dias curtos” (LOPEZ SEBASTIAN, 1989, MALPAUX *et al.*, 1989, THATCHER e HANSEN, 1993, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, GERLACH e AURICH, 2000, PINCKARD *et al.*, 2000, GOLDMAN, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003). Os ovinos, porque as cobrições têm lugar, maioritariamente, nos meses de Outono (altura do ano em que a duração do período diário de luz decresce) e consequentemente os partos ocorrem nos finais do Inverno-inícios da Primavera (VIJIL, 1986, GODDARD, 1991, STAPLES *et al.*, 1992, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, GATES *et al.*, 1998, HILEMAN *et al.*, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, KAYA *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003), dizem-se reprodutores de “dias curtos”.

Nos ovinos, a duração da época reprodutiva varia em função da latitude, ou seja, diminui à medida que se caminha das regiões tropicais para as polares (LOPEZ SEBASTIAN, 1989, MATTHEWS *et al.*, 1993, THATCHER e HANSEN, 1993 e ROSA e BRYANT,

2003). Nas regiões tropicais, a actividade reprodutora destes animais é pouco sazonal e é basicamente controlada pelas disponibilidades presentes de alimentos, as quais, por sua vez, dependem essencialmente da pluviosidade (THATCHER e HANSEN, 1993 e ROSA e BRYANT, 2003). Os ovinos originários de regiões de clima temperado ou frio apresentam, geralmente, uma actividade reprodutora sazonal, que é fundamentalmente ditada pelo ciclo anual de variação do período diário de luz (LOPEZ SEBASTIAN, 1989, MARTIN *et al.*, 1990, LINCOLN, 1992, THATCHER e HANSEN, 1993, THIÉRY *et al.*, 1995, CHEMINEAU *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996a, MALPAUX *et al.*, 1997, FORCADA *et al.*, 2002, MARTIN *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Nalgumas raças, como a Dorset, e na generalidade das raças do sul da Europa, a estação reprodutiva começa por volta do solstício de Verão (O'CALLAGHAN, 1992, GALLEGOS-SANCHEZ *et al.*, 1998 e SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2000). Noutras, como as Galway e Suffolk, esta mesma estação inicia-se por volta do equinócio de Outono (O'CALLAGHAN, 1992, GALLEGOS-SANCHEZ *et al.*, 1998 e KUSAKARI e OHARA, 1999). Nos Muflões (*Ovis gmelini musimon*), ovinos selvagens originários das ilhas da Sardenha e da Córsega, a estação reprodutiva começa igualmente por volta do equinócio de Outono (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2000). Finalmente, a estação reprodutiva de ovelhas como a Finnish Landrace (Finn) e a Soay inicia-se muito depois do equinócio do Outono (O'CALLAGHAN, 1992 e GALLEGOS-SANCHEZ *et al.*, 1998).

O transporte de ovinos originários de regiões temperadas para os trópicos traduz-se numa perturbação da actividade reprodutora sazonal (CHEMINEAU, 1998, informação pessoal). De um modo geral, com o tempo, estes ovinos deixam de apresentar uma estação reprodutiva bem definida; a actividade reprodutora torna-se esporádica e dessincronizada entre os animais (THATCHER e HANSEN, 1993, SWEENEY *et al.*, 1997 e CHEMINEAU, 1998, informação pessoal).

Nas regiões temperadas, o fotoperíodo, principal factor controlador da sazonalidade reprodutiva (MARTIN *et al.*, 1990, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, CHEMINEAU *et al.*, 1996, PÉREZ *et al.*, 1997, GERLACH e AURICH, 2000, MARTIN *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003), afecta os ovinos directamente – através do seu sistema neuroendócrino – e indirectamente – através das disponibilidades alimentares (MARTIN *et al.*, 1990, CHALLET e PEVET, 1997, PÉREZ *et al.*, 1997, KALSBECK *et al.*, 2000a, FORCADA *et al.*, 2002 e MARTIN *et al.*, 2002). Na região mediterrânea, os períodos de maiores disponibilidades alimentares

estão desfasados dos períodos em que o fotoperíodo é mais favorável ao desenrolar da actividade reprodutora (MARTIN *et al.*, 1990 e MARTIN *et al.*, 2002). Nestas condições, existe um conflito claro entre a resposta ao fotoperíodo e a resposta a outros factores ambientais (MARTIN *et al.*, 1990 e MARTIN *et al.*, 2002). Na verdade, a sazonalidade depende de vários outros factores ambientais – temperatura e humidade relativa do ar, pluviosidade, dinâmica atmosférica, etc. –, de factores ligados ao animal – património genético, idade, sexo, condição corporal, etc. – e de factores de manejo – alimentação, estado sanitário, interacções sociais, etc., que, dependendo da situação, podem mesmo sobrepor-se ao fotoperíodo (MARTIN *et al.*, 1990, CHEMINEAU, 1992, PÉREZ *et al.*, 1998 e MARTIN *et al.*, 2002).

2.1 – ACÇÃO DO FOTOPERÍODO

2.1.1 – PERÍODO FETAL

Nos fetos dos mamíferos, a melatonina constitui a “janela” para a periodicidade do mundo exterior (DAVIS, 1997). Através desta hormona, eles são “informados” sobre a altura do dia em que se encontram (DAVIS, 1997). Os seus níveis circulantes de melatonina são, essencialmente, de origem materna (DAVIS, 1997 e WILLIAMS *et al.*, 2001), embora, nalgumas espécies, os fetos sejam também capazes de produzir alguma melatonina (pouca e não ritmicamente) (DAVIS, 1997). Desde muito cedo, a melatonina parece sincronizar o “relógio” endógeno ainda em formação (DAVIS, 1997). Ao que tudo indica, esta sincronização existe em todos os mamíferos eutérios (DAVIS, 1997). Na verdade, os fetos apresentam ritmos circadianos relativamente a vários parâmetros fisiológicos: batimento cardíaco, respiração, movimento e temperatura corporal (WILLIAMS *et al.*, 2001). Ao longo do desenvolvimento fetal, a extensa distribuição e a grande abundância de receptores membranares de melatonina (DAVIS, 1997 e WILLIAMS *et al.*, 2001), relativamente aos animais maduros, sugerem que os efeitos da melatonina sobre o desenvolvimento são grandes e diversos (DAVIS, 1997). Contudo, há que referir que a melatonina não é, *per se*, um requisito básico ao desenvolvimento dos mamíferos (DAVIS, 1997).

Durante a vida fetal, os ovinos recebem efectivamente vários sinais que os informam sobre a altura do dia e, nalguns casos, do ano em que se encontram (FOSTER *et al.*, 1988 e MCMILLEN *et al.*, 1994). Na fase final da gestação, existe uma relação evidente entre o fotoperíodo e as concentrações plasmáticas, maternas e fetais, de prolactina (PRL) (FOS-

TER *et al.*, 1988, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, MCMILLEN *et al.*, 1994 e LINCOLN e CLARKE, 2000b) e de melatonina (FOSTER *et al.*, 1988, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, MCMILLEN *et al.*, 1994 e DAVIS, 1997). No feto ovino, a melatonina gera e/ou sincroniza vários ritmos comportamentais e de secreção hormonal (diários e/ou sazonais) (MCMILLEN *et al.*, 1994, BROOKS *et al.*, 1996a, DAVIS, 1997 e BARRETT *et al.*, 1999). Contudo, não é de descartar totalmente a hipótese da luz exercer uma qualquer acção directa sobre o feto. Na verdade, PARRAGUEZ *et al.* (1998) verificaram que a quantidade de luz natural que chega ao interior do útero sobe de 2 lux, ao 40º dia de gestação, para os 51,1 lux, ao 142º dia (respectivamente, 0,2 e 5,4% da quantidade de luz detectada a nível do flanco da mãe). Segundo estes autores, a partir do meio da gestação, o feto dos ovinos encontra-se mesmo exposto às transições luminosas que caracterizam o amanhecer e o pôr-do-sol e ao pico luminoso que se produz por volta do meio-dia.

Durante o período de gestação, a informação fotoperiódica que chega ao feto é muito importante, pois irá desde logo fazer parte da sua história fotoperiódica (GERLACH e AURICH, 2000 e GOLDMAN, 2001). Assim, por exemplo, a exposição dos fetos de hamster aos “dias curtos” potencializa os efeitos estimuladores que os “dias longos” pós-parto exercem sobre o desenvolvimento testicular dos machos desta espécie (GERLACH e AURICH, 2000 e GOLDMAN, 2001).

2.1.2 – PERÍODO PERINATAL

Pouco tempo após o nascimento, os ovinos começam a segregar melatonina de uma forma ritmada (DAVIS, 1997). Na primeira semana de vida, a secreção nocturna de melatonina eleva-se significativamente, ainda que seja de baixa amplitude (DAVIS, 1997). Nas cinco semanas seguintes, a secreção rítmica desta hormona passa a ser feita em função da duração do período diário de luz e a mediar respostas fotoperiódicas (DAVIS, 1997). Nestes animais, o momento do aparecimento desta secreção rítmica de melatonina não parece depender dos níveis circulantes de melatonina (de origem materna) anteriores ao parto (DAVIS, 1997).

Durante o período perinatal, a resposta dos borregos e das borregas à acção da melatonina é normalmente diferente (WOOD e FOSTER, 1992, HARESIGN, 1993, HERBOSA *et al.*, 1995 e HERBOSA e FOSTER, 1996). De acordo com WOOD *et al.* (1991), WOOD e FOS-

TER (1992), HERBOSA *et al.* (1995), HERBOSA e FOSTER (1996), ROBINSON e FORSDIKE (1999) e PARVIZI (2000), esta diferença é definida durante o período pré-natal e relaciona-se com a exposição ou não dos fetos à acção dos androgénios. Ao que tudo indica, a presença destas hormonas, durante um período crítico que, nos animais domesticados, se situa a meio da gestação (PARVIZI, 2000), condiciona a forma como os neurónios responsáveis pela secreção GnRH passam a responder aos esteróides sexuais (CANNY *et al.*, 1999, ROBINSON e FORSDIKE, 1999 e PARVIZI, 2000). PARVIZI (2000) e PINKARD *et al.* (2000) acreditam que a molécula esteróide activa, responsável pelo dimorfismo cerebral, é o estradiol, sintetizado, *in situ*, através da aromatização da testosterona. Na verdade, diferentes estruturas cerebrais, tais como os núcleos hipotalâmicos da área pré-óptica (POA), tornam-se sexualmente dimórficos devido aos efeitos organizadores dos esteróides sexuais (PARVIZI, 2000 e PINCKARD *et al.*, 2000). Nos machos, a incapacidade do estradiol induzir a plasticidade sináptica dos neurónios dos núcleos arqueados é igualmente atribuída à impossibilidade destes animais activarem um mecanismo de retroacção positiva face ao estradiol (PARVIZI, 2000). Contudo, ao que sabemos, permanece por conhecer quando é que, durante o período de desenvolvimento pré-natal, a resposta reprodutiva à melatonina se torna sensível à acção organizadora dos esteróides.

2.1.3 – PROCESSO DA PUBERDADE

Nos ovinos, o aparecimento da puberdade varia em função do sexo (WOOD *et al.*, 1991, HERBOSA *et al.*, 1995 e WOOD e FOSTER, 1992). Nos borregos machos nascidos na Primavera, a puberdade (estabelecimento da espermatogénese) surge por volta da 10^a semana de vida (HERBOSA *et al.*, 1995) e nas borregas (primeira ovulação) por volta da 35^a semana (HERBOSA *et al.*, 1995). A mesma relação temporal foi observada quando se utilizou, como parâmetro definidor do aparecimento da puberdade, o decréscimo da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário face à retroacção negativa exercida pelos esteróides sexuais (HERBOSA *et al.*, 1995). Dados semelhantes foram encontrados por WOOD e FOSTER (1992). Contudo, os borregos de ambos os sexos, nascidos no Outono, só alcançam a puberdade com aproximadamente um ano de idade (FOSTER *et al.*, 1988 e GERLACH e AURICH, 2000).

O fotoperíodo desempenha um papel muito mais importante no estabelecimento da puberdade entre as borregas do que entre os borregos (YELLON e FOSTER, 1986, FOSTER *et al.*, 1988, WOOD *et al.*, 1991, HERBOSA *et al.*, 1995 e HERBOSA e FOSTER, 1996) (Figura 2).

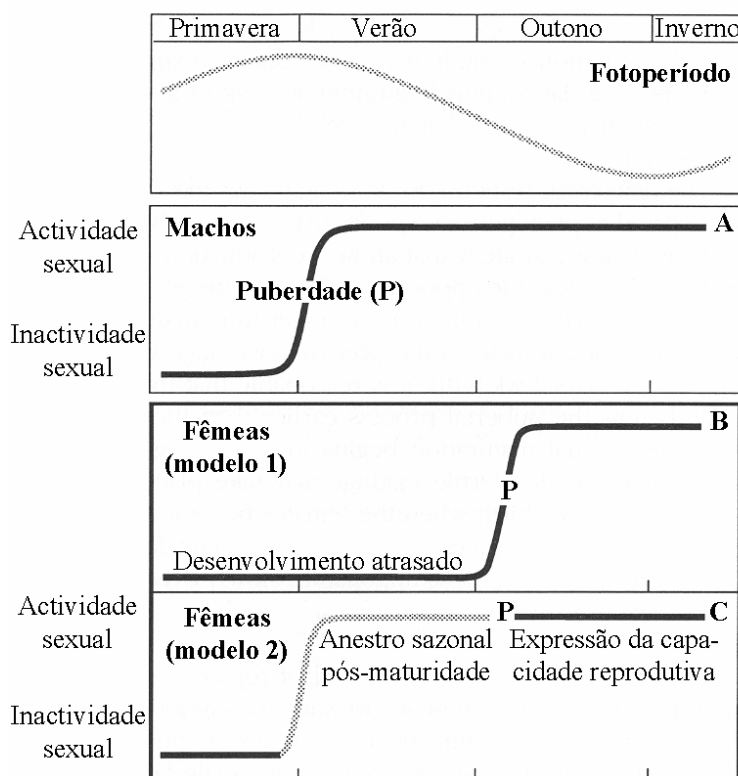


FIGURA 2 – Esquema representativo do desenvolvimento sexual em animais explorados sob condições naturais. Painel A: machos e Painéis B e C: fêmeas. No modelo 1 (painel B), o regime fotoperiódico “dias longos” atrasa o estabelecimento da atividade sexual. No modelo 2 (painel C), a atividade sexual é estabelecida simultaneamente nos machos e nas fêmeas, mas o regime fotoperiódico “dias longos” inibe a expressão da capacidade reprodutiva nas fêmeas, até que a duração do período diário de luz seja de “dias curtos” (HERBOSA *et al.*, 1995).

Segundo YELLON e FOSTER (1986) e FOSTER *et al.* (1988), o fotoperíodo é o principal factor ambiental capaz de condicionar o aparecimento da puberdade nas borregas. Pelo contrário, WOOD *et al.* (1991) e STELLFLUG (2002) afirmam que os efeitos do fotoperíodo sobre o mecanismo da puberdade nos borregos são mínimos. Para alcançarem a puberdade, as borregas têm de ser sujeitas a um regime luminoso de “dias curtos” (FOSTER *et al.*,

1988). Porém, as borregas que são exploradas sob um regime luminoso constante de “dias curtos” vêem o estabelecimento da puberdade adiado para o segundo ano de vida (FOSTER *et al.*, 1988 e GERLACH e AURICH, 2000). Na verdade, para que as borregas impúberes reconheçam os “dias curtos” necessitam de ser previamente sujeitas à acção inibidora dos “dias longos” (YELLON e FOSTER, 1986 e FOSTER *et al.*, 1988). Pelo contrário, o reconhecimento dos “dias longos”, por parte das borregas impúberes, não implica que estas tenham sido previamente sujeitas à acção dos “dias curtos” (FOSTER *et al.*, 1988).

De acordo com GERLACH e AURICH (2000), os borregos são menos sensíveis aos efeitos inibidores do fotoperíodo do que os carneiros e alcançam a puberdade antes destes últimos entrarem na estação reprodutiva.

2.1.4 – CARNEIROS

De um modo geral, os carneiros são sexualmente menos sazonais do que as ovelhas. Na realidade, os carneiros e as ovelhas apresentam diferentes graus de sensibilidade ao fotoperíodo (ORTAVANT *et al.*, 1988, CHEMINEAU *et al.*, 1996, GERLACH e AURICH, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003). Assim, por exemplo, sob condições naturais, os carneiros respondem mais cedo (cerca de 1,5-2,0 meses) do que as ovelhas às variações do fotoperíodo (ORTAVANT *et al.*, 1988, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Porém, estes animais podem manifestar variações sazonais da sua actividade sexual. Na verdade, FOLCH (1983), VIJIL (1986), XU *et al.* (1993), GERLACH e AURICH (2000) e ROSA e BRYANT (2003) afirmam que existem variações sazonais no tamanho dos testículos, na quantidade e na qualidade do sémen produzido e/ou no comportamento sexual dos carneiros (Figura 3).

O carneiro é efectivamente um reprodutor sazonal, com níveis máximos de actividade sexual nos finais do Verão e no Outono e mínimos no Inverno-Primavera (MASCARENHAS *et al.*, 1980, THIMONIER, 1981, FOLCH, 1983, LINDSAY *et al.*, 1984, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, VIJIL, 1989, MARTIN *et al.*, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, THATCHER e HANSEN, 1993, GERLACH e AURICH, 2000, KAYA *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Contudo, a resposta dos ovinos ao fotoperíodo varia, consideravelmente, de raça para raça (THIMONIER, 1981 e EL-ALAMY *et al.*, 2001). De acordo com PÉREZ *et al.* (1997), os carneiros de praticamente todas as raças que vivem em latitudes superiores a 40° Norte apresentam variações sazonais do volume escrotal e da

produção diária de espermatozóides. Para FOLCH (1983), VIJIL (1986) e ORTAVANT *et al.* (1988), o período máximo de actividade sexual dos carneiros Ile-de-France ocorre entre finais do Verão e inícios do Outono (fotoperíodo “decrecente”). Nestes carneiros, os testículos são claramente mais pesados no Outono do que na Primavera (LINDSAY *et al.*, 1984). ORTAVANT *et al.* (1988) verificaram que o peso dos testículos destes carneiros varia entre os 180-190 g (finais do Inverno-inícios da Primavera) e os 300-320 g (finais do Verão e no Outono). Nestes carneiros, o peso dos testículos começa a elevar-se antes do início do Verão e a decrescer antes do início do Inverno (ORTAVANT *et al.*, 1988). BARRELL e LAPWOOD (1979) verificaram que carneiros Romney Marsh, sujeitos a um fotoperíodo de “dias curtos”, possuíam testículos e glândulas anexas de tamanho superior aos de carneiros da mesma raça sujeitos a um fotoperíodo de “dias longos”.

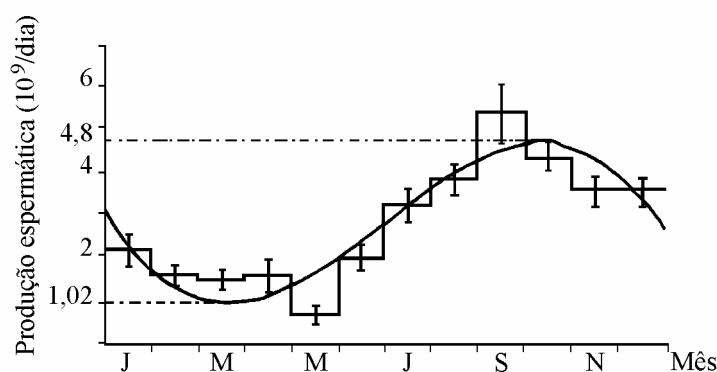


FIGURA 3 – Variação sazonal da produção diária de espermatozóides, por testículo, nos carneiros. São representados os valores médios e os respectivos erros padrão, assim como a curva de regressão. Os valores mínimos foram observados em Fevereiro/Março e os máximos em Agosto/Outubro (Dacheux *et al.*, 1981; citados por ORTAVANT *et al.*, 1985 e THIÉRY *et al.*, 2002).

Como o peso dos testículos se relaciona com a capacidade do macho produzir espermatozóides, é de supor que a produção espermática siga um padrão sazonal de evolução semelhante ao dos testículos (MARTIN *et al.*, 1990). Em média, os testículos dos carneiros Ile-de-France produzem $8,5 \times 10^6$ e $12,2 \times 10^6$ espermatozóides/dia por grama de parênquima testicular, respectivamente na Primavera e no Outono (ORTAVANT *et al.*, 1988).

Consequentemente, a produção diária de espermatozóides, determinada após canulação de *rete testis*, varia entre os 1×10^9 espermatozóides, na Primavera, e os $4,8 \times 10^9$ espermatozóides, no final do Verão (ORTAVANT *et al.*, 1988). Por outro lado, a qualidade do sémen produzido pelos carneiros Ile-de-France é menor na Primavera do que no Outono (ORTAVANT *et al.*, 1988), diminuindo marcadamente entre Janeiro e Junho (fotoperíodo “crescente”) (VIJIL, 1986).

Segundo VIJIL (1986), variações tão marcadas da actividade sexual, como as anteriormente referidas, não são comuns em carneiros de todas as raças. Na realidade, a duração da estação reprodutiva varia, consideravelmente, de raça para raça e até de indivíduo para indivíduo (HARESIGN, 1993 e EL-ALAMY *et al.*, 2001). Assim, por exemplo, embora o comportamento sexual e a quantidade e a qualidade seminal dos carneiros da raça espanhola Manchega variem ao longo do ano, as diferenças observadas não põem em causa a sua capacidade reprodutora normal (VIJIL, 1986). Porém, este autor verificou que os carneiros Manchegos apresentam uma libido mais elevada nos meses de Outono e de Inverno e mais reduzida nos meses de Primavera. Por outro lado, os valores máximos do diâmetro testicular dos carneiros Manchegos registaram-se nos meses de Verão e os mínimos foram observados nos meses de Inverno (VIJIL, 1986). De acordo com BARRELL e LAPWOOD (1979), a produção espermática dos carneiros Romney Marsh não é significativamente modificada pelo fotoperíodo. Segundo MARTIN *et al.* (1990) e MARTIN *et al.* (2002), embora os carneiros Merino aparentem responder ao fotoperíodo, os padrões sazonais de crescimento testicular são determinados por outros factores ambientais, em particular, pela alimentação.

Como se verá mais adiante neste trabalho, as variações do fotoperíodo afectam, fundamentalmente, a libertação de GnRH e da gonadotropina hipofisária LH. Assim, a frequência (LINCOLN, 1976, LINCOLN *et al.*, 1978 e LINDSAY *et al.*, 1984) e a amplitude (LINCOLN, 1976) da secreção de LH é maior nos carneiros sujeitos a “dias curtos” do que nos carneiros sujeitos a “dias longos”. Nos carneiros Ile-de-France, a frequência dos pulsos de LH é baixa no início do Inverno (3 pulsos/24 horas) e elevada logo no início de Junho (6 pulsos/24 horas) (ORTAVANT *et al.*, 1988). A alteração da secreção destas hormonas influencia o tamanho dos testículos (LINCOLN, 1976, THIMONIER, 1981, COUROT e ORTAVANT, 1981, LINCOLN e ALMEIDA, 1982, ORTAVANT *et al.*, 1982, LINDSAY *et al.*, 1984, SIMÕES, 1984, PELLETIER, 1986, ORTAVANT *et al.*, 1988, CHEMINEAU *et al.*, 1991,

XU *et al.*, 1993, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, MARTIN *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002) e a sua capacidade de produzir espermatozóides e androgénios (LINCOLN, 1976, LINCOLN e DAVIDSON, 1977 e ROSA *et al.*, 2000). Na verdade, cada pulso de LH induz o aparecimento de um pico de testosterona, ou seja, a elevação da frequência de secreção da LH leva a um aumento da frequência de secreção de testosterona (PELLETIER *et al.*, 1982, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, GONZALEZ *et al.*, 1988, ORTAVANT *et al.*, 1988, MARTIN *et al.*, 1990, TILBROOK e CAMERON, 1990, WEBSTER *et al.*, 1991, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, GORDON, 1997 e HILEMAN e JACKSON, 1999). Finalmente, a modificação da secreção de androgénios afecta o tamanho das glândulas anexas e os comportamentos agonístico (LINCOLN e DAVIDSON, 1977) e sexual (LINCOLN e DAVIDSON, 1977 e ROSA *et al.*, 2000).

Esta hierarquização de acontecimentos fisiológicos, reflexo directo da hierarquização do controlo da actividade sexual, traduz-se em diferenças no tempo de resposta ao fotoperíodo (LINCOLN e DAVIDSON, 1977). De acordo com LINCOLN e DAVIDSON (1977), a hipófise responde de uma forma relativamente rápida à variação do fotoperíodo. Assim, por exemplo, a variação brusca do fotoperíodo leva, em dois dias, a uma alteração do conteúdo hipofisário em gonadotropinas (LINCOLN e DAVIDSON, 1977 e ORTAVANT *et al.*, 1988). Porém, a alteração dos níveis periféricos destas hormonas é mais lento (LINCOLN e DAVIDSON, 1977). No trabalho efectuado por LINCOLN e DAVIDSON (1977), com carneiros Soay, a passagem brusca de um fotoperíodo de “dias longos” para um de “dias curtos” conduziu, em 2-4 semanas, a uma elevação significativa da secreção de LH e de FSH (hormona foliculo-estimulante). No estudo de LINCOLN (1976), realizado igualmente com carneiros da raça Soay, o primeiro aumento significativo da secreção de LH produziu-se 17 dias após a passagem súbita de “dias longos” para “dias curtos”. A elevação da secreção de gonadotropinas promove um aumento, quase imediato, da secreção de testosterona e do tamanho dos testículos (LINCOLN e DAVIDSON, 1977 e ORTAVANT *et al.*, 1988). Porém, o aumento estatisticamente significativo dos níveis circulantes de testosterona só se produz 3-4 semanas (ORTAVANT *et al.*, 1988) ou 3-6 semanas (LINCOLN e DAVIDSON, 1977) após a elevação dos níveis plasmáticos de LH. No trabalho de LINCOLN (1976), o aumento do tamanho dos testículos tornou-se significativo 3 semanas após a elevação da secreção de LH. O posterior aumento progressivo da actividade testicular afectou, 5-10 semanas mais

tarde, vários tecidos hormono-dependentes periféricos (LINCOLN e DAVIDSON, 1977). Segundo LINCOLN e DAVIDSON (1977), a variação do fotoperíodo demora várias semanas a influenciar significativamente o comportamento sexual.

Em todas as populações de animais sazonais, existe sempre uma determinada percentagem de indivíduos que não respondem à acção do fotoperíodo (NELSON e DEMAS, 1997 e GOLDMAN, 2001). Para NELSON e DEMAS (1997) e GOLDMAN (2001), este fenómeno está relacionado com diferenças genéticas entre indivíduos e foi graças a elas que, nalgumas espécies, o homem conseguiu, através da selecção artificial, diminuir drasticamente a sazonalidade reprodutiva.

3 – TRADUÇÃO DA INFORMAÇÃO FOTOPERIÓDICA EM MENSAGEM HORMONAL

Embora a glândula pineal tenha sido descrita pela primeira vez há 2300 anos, as suas funções permaneceram desconhecidas até 1958, altura em que Lerner *et al.* identificaram a melatonina (CASSONE e NATESAN, 1997, KVETNOY *et al.*, 1997, BERGSTROM e HAKANSON, 1998 e TOSINI, 2000). Em 1965, Wurtman e Axelrod lançam a “hipótese da melatonina”, segundo a qual a glândula pineal, funcionando como um tradutor que converte a informação neural, relativa aos ciclos de luz-escuridão, num sinal endócrino, faz variar o tempo de secreção da melatonina (CASSONE e NATESAN, 1997, BERGSTROM e HAKANSON, 1998 e GÜNDÜZ, 2002). Nos nossos dias, esta hormona é considerada o tradutor bioquímico fundamental da informação fotoperiódica (LOPEZ SEBASTIAN, 1989, RUSAK *et al.*, 1990, GODDARD, 1991, LINCOLN, 1992, MATTHEWS *et al.*, 1993, NONNO *et al.*, 1993, REITER, 1993, CHEMINEAU *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 1996b, NELSON e DEMAS, 1997, WEHR, 1997, DUNCAN, 1998, GUERIN e MATTHEWS, 1998, ZARAZAGA *et al.*, 1998a, VIVIEN-ROELS *et al.*, 1999, GERLACH e AURICH, 2000, GOLDMAN, 2001, HOLLANDER, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, WEHR, 2001, LINCOLN *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002). Nos mamíferos, a informação luminosa (fotónica) é apenas captada pela retina e é transmitida, via nervosa, por etapas, até à glândula pineal (LOPEZ SEBASTIAN, 1989, FOLCH, 1993, CORREIA, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996b, PRIVAT *et al.*, 1999, VIVIEN-ROELS *et al.*, 1999, GERLACH e AURICH, 2000, KOHLER *et al.*, 2000, PROSSER, 2000, WEHR, 2001, FORCADA *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003) (Figura 4). Em primeiro lugar, a informação luminosa é transmitida directamente da retina aos núcleos supraquiasmáticos (SCN), por intermédio da via monossináptica retino-hipotalâmica (WARREN e CASSONE, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b, WEHR, 1997, DUNCAN, 1998, BORJIGIN *et al.*, 1999, PROSSER, 2000, GOLDMAN, 2001, HOLLANDER, 2001, KOPP *et al.*, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, WEHR, 2001, BARRETT *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003) ou indirectamente através de sinais emitidos a partir dos núcleos da rafe do mesencéfalo (PROSSER, 2000) e do genículo hipotalâmico (KOHLER *et al.*, 2000, PROSSER, 2000 e SCHWARTZ *et al.*, 2001). Os SCN localizam-se no hipotálamo anterior, mais precisamente na imediação dorsal (logo acima) do quiasma óptico (RUSAK *et al.*, 1990, REITER, 1993, HOLLANDER, 2001, DAUVILLIERS, 2002 e KENNAWAY, 2002). A partir destes núcleos, o sinal é transportado até ao núcleo hipotalâmico paraventricular

(PVN) (MALPAUX *et al.*, 1996b, WEHR, 1997, DUNCAN, 1998, BORJIGIN *et al.*, 1999, BARTNESS *et al.*, 2001, HOLLANDER, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2001, WEHR, 2001 e MIKLÓS e KOVÁCS, 2002), cujas células neurosecretoras funcionam como tradutores celulares que integram sinais estimuladores e inibidores (MIKLÓS e KOVÁCS, 2002). Daí, o sinal segue para uma colónia de células intermédio-laterais situadas na medula torácica e, de seguida, para os gânglios cervicais superiores (MALPAUX *et al.*, 1996b, WEHR, 1997, DUNCAN, 1998, BORJIGIN *et al.*, 1999, BARTNESS *et al.*, 2001, HOLLANDER, 2001 e WEHR, 2001). O sinal chega finalmente à glândula pineal, através dos neurónios simpáticos pós-ganglionares (LINCOLN, 1992, MALPAUX *et al.*, 1996b, BORJIGIN *et al.*, 1999 BARTNESS *et al.*, 2001 e KENNAWAY, 2002).

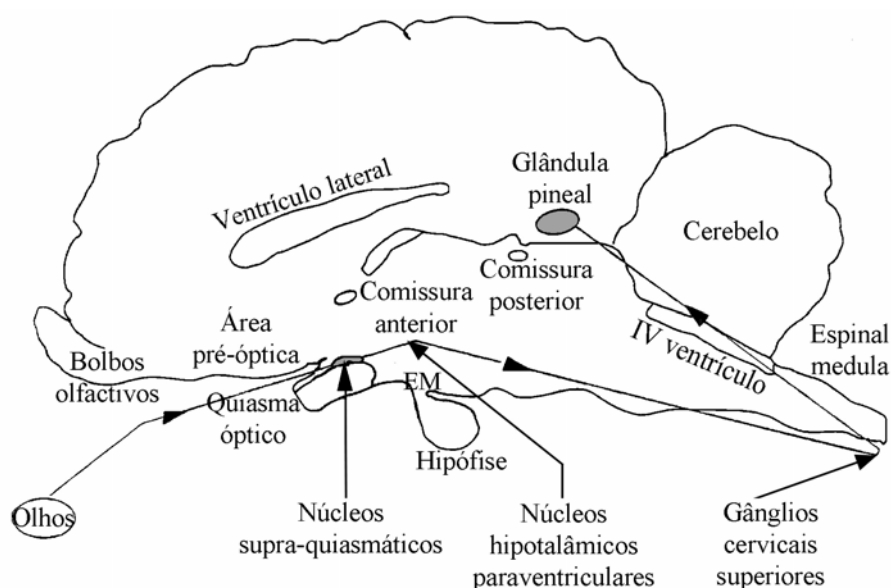


FIGURA 4 – Esquema do percurso feito pelo impulso nervoso gerado pela luz, desde os fotorreceptores da retina até à glândula pineal (EM – Eminência mediana) (adaptado de MALPAUX *et al.*, 1996b).

Nos ovinos, a existência de uma via retino-hipotalâmica foi demonstrada por Legan e Winans (1981) (MALPAUX *et al.*, 1996b e ROSA e BRYANT, 2003). Nesta espécie, a lesão da retina, dos SCN e/ou dos gânglios cervicais superiores determina uma modificação da resposta dos animais ao fotoperíodo (CORREIA, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003), embora não previna a expres-

são do ritmo circadiano¹ (do latim *circa* «ao redor» e *die* «dia») endógeno ou impeça a interferência de outros factores, tais como o regime alimentar, a temperatura do ar e as relações sociais (CORREIA, 1996). Nos carneiros da raça Soay, a gangliectomia cervical superior faz com que a variação sazonal do peso testicular desapareça (MALPAUX *et al.*, 1996b e ROSA e BRYANT, 2003).

A pinealectomia não compromete a sincronização dos ritmos circadianos com o fotoperíodo prevalecente (GOLDMAN, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003), mas abruptamente impede os animais de distinguir os “dias longos” dos “dias curtos” (GOLDMAN, 2001). Nas ovelhas, a alternância de “dias curtos” e de “dias longos” caracteriza-se por ciclos bem marcados de secreção de LH (MALPAUX *et al.*, 1996b). Após pinealectomia, os ciclos de secreção de LH persistem, mas os períodos de elevada secreção desta hormona ocorrem, nas diferentes fêmeas, em momentos distintos (KENNAWAY e HUGEL, 1992, MALPAUX *et al.*, 1996b e ROSA e BRYANT, 2003). Ainda de acordo com estes autores, a duração destes ciclos mostra-se muito diferente da dos existentes com fotoperíodo normal. Como a glândula pineal não emite projecções nervosas, a sua influência sobre as funções fisiológicas tem de ser mediada por um agente endócrino (THRUN e MOENTER, 1995 e MALPAUX *et al.*, 1996b). À melatonina, segregada pela glândula pineal, cabe o papel de traduzir os efeitos do fotoperíodo sobre a função reprodutora (LINCOLN, 1992, MATTHEWS *et al.*, 1993 e THATCHER e HANSEN, 1993, TUREK e VAN CAUTER, 1994, MATTHEWS e GUERIN, 1995, PICAZO e LINCOLN, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b, THIMONIER, 1996, YELLON, 1996b, WEHR, 1997, RECIO *et al.*, 1998, MALPAUX *et al.*, 1998, PANG, 1998, VIVIEN-ROELS *et al.*, 1999, GERLACH e AURICH, 2000, MALPAUX *et al.*, 2001, WEHR, 2001 e FORCADA *et al.*, 2002). Os pinealócitos segregam ainda glutamato (YATSUSHIRO *et al.*, 2000). Localmente, este glutamato inibe a actividade das enzimas envolvidas na síntese de melatonina e, consequentemente, a secreção desta hormona (YATSUSHIRO *et al.*, 2000).

3.1 – NÚCLEOS SUPRAQUIASMÁTICOS

Nos organismos vivos, a maioria das respostas fisiológicas e comportamentais não acontece desordenadamente, pelo contrário são rítmicas (BARTNESS *et al.*, 2001). De um

1 – Todos os ritmos que se produzem na ausência de indicadores ambientais (BARTNESS *et al.*, 2001) e que têm uma duração de 24 ± 4 horas, dizem-se circadianos (DILEO *et al.*, 2002).

modo geral, elas coincidem com modificações regulares do meio ambiente (BARTNESS *et al.*, 2001), como sejam as relacionadas com os ciclos de luz/escurecimento, a temperatura do ar e/ou as disponibilidades naturais de alimentos (THRUN e MOENTER, 1995 e CHALLET e PEVET, 1997). Da capacidade dos animais preverem e sincronizarem as suas respostas fisiológicas e comportamentais com os principais eventos ambientais, depende a sua sobrevivência e, em última instância, o seu sucesso reprodutivo (THRUN e MOENTER, 1995, RIBELAYGA *et al.*, 1999, SIMONNEAUX *et al.*, 1999, REA e PICKARD, 2000 e BARTNESS *et al.*, 2001). Porém, como alguns dos factores ambientais variam de ano para ano (por exemplo, a temperatura do ar) ou podem não estar “acessíveis” aos animais por longos períodos de tempo (por exemplo, o fotoperíodo, no caso dos animais que hibernam), os mecanismos que geram as adaptações sazonais são, frequentemente, internos (endogenamente gerados), ou seja, ocorrem mesmo na ausência de pistas ambientais (THRUN e MOENTER, 1995).

Fundamental à fisiologia das plantas e dos animais, é a existência de marcadores de ritmo circadianos endógenos ou de um “relógio” interno (KALSBECK *et al.*, 2000b). Os SCN constituem a região do cérebro que “orquestra” os sistemas fisiológicos da ritmicidade (WARREN e CASSONE, 1995, YELLON, 1996b, DUNCAN, 1998, MESSENGER *et al.*, 2000, NUESSEIN-HILDESHEIM, 2000, BARTNESS *et al.*, 2001, GOLDMAN, 2001, KAWANO *et al.*, 2001, KOPP *et al.*, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2001, DAUVILLIERS, 2002, DILEO *et al.*, 2002, KENNAWAY, 2002, LINCOLN *et al.*, 2002 e LUNDKVIST *et al.*, 2002), ou seja, funcionam como um “relógio” biológico endógeno (ou interno) (LINCOLN, 1992, MATTHEWS *et al.*, 1993, WARREN e CASSONE, 1995, YELLON, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, WEHR, 1997, TAKEKIDA *et al.*, 2000, GOLDMAN, 2001, KOPP *et al.*, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2001, WEHR, 2001, BARRETT *et al.*, 2002, LINCOLN *et al.*, 2002, LUNDKVIST *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002) e até, ao que tudo indica, como um “calendário” biológico endógeno (THRUN e MOENTER, 1995, RIBELAYGA *et al.*, 1999, NUESSEIN-HILDESHEIM, 2000, TAKEKIDA *et al.*, 2000, GOLDMAN, 2001, HASTINGS e FOLLETT, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2001, ROSA e BRYANT, 2003 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Eles são responsáveis pela ritmicidade da locomoção, do sono, da temperatura corporal, da pressão sanguínea, da imunidade, da produção hormonal, etc. (VIJIL, 1989, WARREN e CASSONE, 1995, BORJIGIN *et al.*, 1999, BARTNESS *et al.*, 2001, HASTINGS e FOLLETT, 2001, KOPP *et al.*, 2001, WEHR, 2001 e DILEO *et al.*, 2002). De acordo com KAWANO *et al.* (2001), o “relógio” interno é basicamente composto por três elementos neuronais: sistemas de entrada, marcadores automáticos de ritmo (*pacemakers*) e sistemas de saída do sinal rítmico (*pacemaker*

output systems). Na prática, estes três elementos estão profundamente associados e funcionam como uma verdadeira unidade integrada que envia sinais codificados para regiões-chave do CNS (BARTNESS *et al.*, 2001, HAZLERIGG *et al.*, 2001 e KAWANO *et al.*, 2001).

Uma das principais funções dos SCN é a de gerar o ritmo de síntese e libertação de melatonina, a partir da glândula pineal (YELLON, 1996b BARTNESS *et al.*, 2001, GOLDMAN, 2001, STEHLE *et al.*, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2001, WEHR, 2001, BARRETT *et al.*, 2002, KENNAWAY, 2002, LINCOLN *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002, ROSA e BRYANT, 2003 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Na verdade, os pinealócitos dos mamíferos não são sensíveis à acção directa da luz, nem possuem marcadores de ritmo próprios (KALSBECK *et al.*, 2000b). Na maioria dos organismos, a medição do período diário de luz é feita através de osciladores circadianos (WARREN e CASSONE, 1995, CASSONE e NATESAN, 1997, TAKEKIDA *et al.*, 2000, AKIYAMA *et al.*, 2001, GOLDMAN, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2001 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). O funcionamento destes osciladores é autónomo em cada célula (NUESSLEIN-HILDESHEIM, 2000), compreendendo um mecanismo transcripcional/translacional de retroacção auto-regulável (NUESSLEIN-HILDESHEIM, 2000). Nos SCN, tanto os neurónios agrupados como os neurónios dispersos possuem osciladores individuais (GOLDMAN, 2001, DAUVILLIERS, 2002 e LUNDKVIST *et al.*, 2002). Porém, a sincronização de fase nestes últimos neurónios não existe, dada a elevada variabilidade observada entre células relativamente aos períodos circadianos (LUNDKVIST *et al.*, 2002).

A forma como ocorre a sincronização dos neurónios agrupados dos SCN é ainda desconhecida (LUNDKVIST *et al.*, 2002). WEHR (2001) e LUNDKVIST *et al.* (2002) sugerem que o ácido- γ -amino-butírico (GABA) está envolvido nesta sincronização, uma vez que foram identificadas flutuações diárias nas concentrações deste ácido a nível dos SCN (LUNDKVIST *et al.*, 2002). Ao que tudo indica, este GABA tem origem no PVN (KALSBECK *et al.*, 2000b). LUNDKVIST *et al.* (2002) pensavam mesmo que a rede sináptica intrínseca dos SCN era essencialmente GABAérgica, sofrendo pouca ou nenhuma acção do glutamato. Contudo, LUNDKVIST *et al.* (2002) identificaram a presença de uma rede glutamatérgica na região ventral dos SCN. De acordo com estes autores, a actividade excitante espontânea pós-sináptica, observada nesta região dos SCN, pode estar envolvida nos mecanismos de sincronização do ritmo dos neurónios individuais destes núcleos e estar mesmo na origem das variações diárias da frequência do disparo funcional (*firing*) destes neurónios. KOHLER *et al.* (2000) e REA e PICKARD (2000) acreditam que a sincronização fótica dos SCN é basicamente alcançada através da libertação de aminoácidos excitantes, particularmente do glu-

tamato, promovida pela serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) (REA e PICKARD, 2000). Por outro lado, a 5-HT está envolvida na mediação dos efeitos de factores não fotónicos sobre a frequência do disparo dos neurónios dos SCN (PROSSER, 2000).

De acordo com SCHWARTZ *et al.* (2001) e LUNDKVIST *et al.* (2002), a frequência do disparo espontâneo (*pacemaker*) dos neurónios dos SCN apresenta variações diárias. Esta é mais elevada durante o “dia subjectivo” e mais baixa durante a “noite subjectiva” (SCHWARTZ *et al.*, 2001), ou seja, a frequência de disparo espontâneo é essencialmente determinada pela presença de luz (BORJIGIN *et al.*, 1999 e LUNDKVIST *et al.*, 2002), a qual determina um aumento da libertação de glutamato por parte dos neurónios ganglionares ópticos, sendo que alguns deles emitem mesmo projecções até à região ventral dos SCN (LUNDKVIST *et al.*, 2002). Em resposta, os SCN sincronizam as actividades metabólicas, hormonais e comportamentais com o fotoperíodo prevalecente (WARREN e CASSONE, 1995, BORJIGIN *et al.*, 1999, GOLDMAN, 2001, HASTINGS e FOLLETT, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2001, DAUVILLIERS, 2002, LINCOLN *et al.*, 2002 e LUNDKVIST *et al.*, 2002). Logicamente, o ritmo circadiano endógeno que controla a actividade reprodutora sazonal provém dos SCN e possibilita a efectiva sincronização desta actividade com o fotoperíodo (RUSAK *et al.*, 1990, LINCOLN, 1992, MATTHEWS *et al.*, 1993, REITER, 1993, TUREK e VAN CAUTER, 1994, KENNAWAY e ROWE, 1995, KLEIN *et al.*, 1997, GUERIN e MATTHEWS, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, GOLDMAN, 2001, HOLLANDER, 2001, NOTTER e CHEMINEAU, 2001, DILEO *et al.*, 2002, KENNAWAY, 2002, LUNDKVIST *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002).

Os mecanismos que controlam o ritmo endógeno de disparo dos SCN são ainda muito pouco conhecidos (LUNDKVIST *et al.*, 2002). Foi recentemente posta em evidência a existência de factores genéticos na génese dos ritmos circadianos (Figura 5) (MORGAN *et al.*, 1998, MESSENGER *et al.*, 2000, NUSSLEIN-HILDESHEIM, 2000, TAKEKIDA *et al.*, 2000, AKIYAMA *et al.*, 2001, HASTINGS e FOLLETT, 2001, HAZLERRIG *et al.*, 2001, DAUVILLIERS, 2002 e LINCOLN *et al.*, 2002). Sob o efeito da luz, estes ritmos são marcados através da expressão de certos genes e da concentração de proteínas específicas, que variam em função do tempo (BORJIGIN *et al.*, 1999, WEHR, 2001 e DAUVILLIERS, 2002). Independentemente do ciclo luz/escuridão, eles permanecem constantes durante o período de escuridão (DAUVILLIERS, 2002). De acordo com LUNDKVIST *et al.* (2002), é possível que os mecanismos que controlam a ritmicidade envolvam também a inserção e a remoção de moléculas membranares, feitas em função da variação circadiana da expressão dos genes “relógio”. A identificação de variações entre as fases diurna e nocturna do dia, relativamente ao

potencial membranar, à resistência aos estímulos e à retenção de corrente, por parte dos neurónios dos SCN, podem reflectir diferenças nas propriedades membranares determinadas por estes mecanismos (LUNDKVIST *et al.*, 2002).

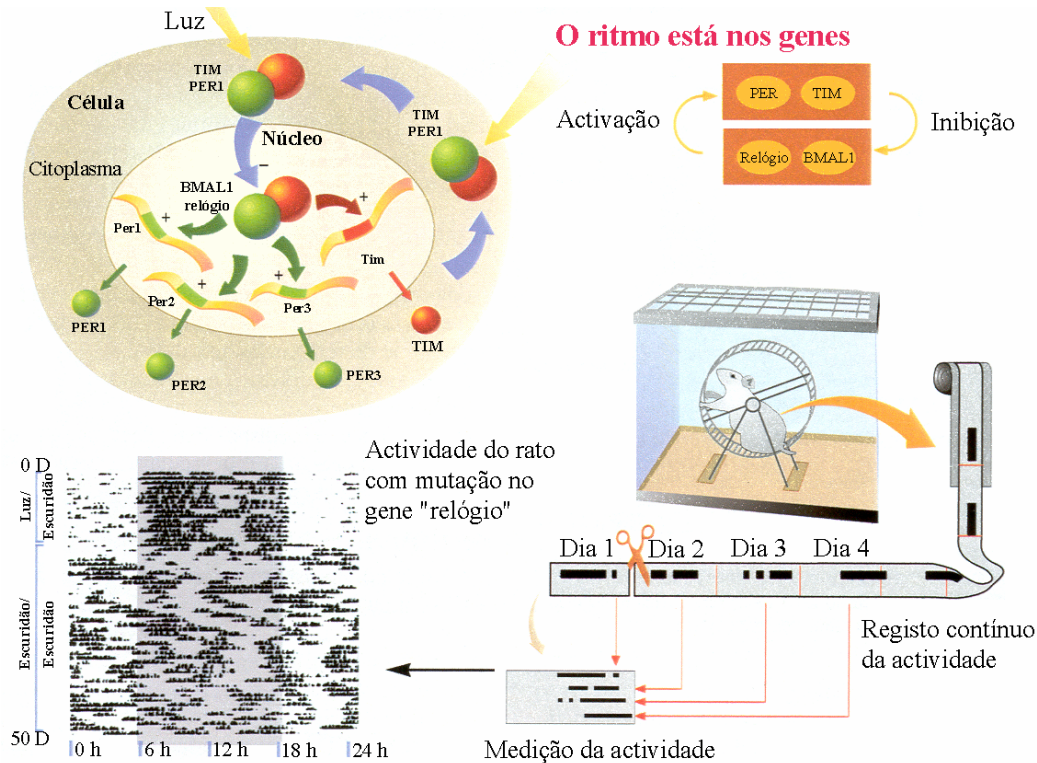


FIGURA 5 – Esquema representativo do envolvimento dos genes “relógio” no controlo da ritmicidade nos ratos. Na parte superior do esquema estão representados quatro genes (*Per1*, *Per2*, *Per3* «*Period*» e *Tim* «*Timeless*») e respectivas proteínas (PER1, PER2, PER3 e TIM), que participam na regulação do ritmo circadiano (os genes *Relógio* e *Bmal1* codificam as proteínas que activam a transcrição dos genes *Per* e *Tim*). No conjunto, eles formam uma via de retroacção sobre a qual actua a luz. Estes genes e suas proteínas estão presentes no núcleo das células, em quantidades significativamente mais elevadas durante o período nocturno. Na parte inferior do esquema, apresenta-se o registo, feito ao longo de vários dias, da actividade de um rato com uma mutação no gene *relógio*. Sob condições de luz/escuridão, o rato possui um ritmo circadiano normal. Sob condições de escuridão/escuridão, toda a ritmicidade desaparece (DAUVILLIERS, 2002).

Vários são os genes envolvidos na criação de ritmos auto-sustentáveis (genes “Relógio”). Nos roedores, a ocorrência de mutações nestes genes altera o ritmo endógeno e/ou a capacidade sincronizadora dos SCN ou destrói mesmo a ritmicidade endógena (LINCOLN *et al.*, 2002). A expressão dos genes Período (*Per* – *Per1* e *Per2*) é claramente rítmica e dependente da resposta de fase (ver página 47) ao estímulo luminoso, o que sugere que a luz regula o marcador de ritmo (*pacemaker*) dos SCN através da acção que exerce sobre a expressão dos genes *Per* (TAKEKIDA *et al.*, 2000 e LINCOLN *et al.*, 2002). Nos SCN destes animais, enquanto que os genes *Per* e criptocromos (*Cry* – *Cry1* e *Cry2*) parecem exercer uma retroacção negativa sobre o processo transcripcional (NUESSLEIN-HILDESHEIM, 2000), os genes *relógio* e *Bmal1* parecem exercer uma retroacção positiva sobre este mesmo processo (NUESSLEIN-HILDESHEIM, 2000). A expressão máxima dos genes *Per1* e *ICER* (repressor precoce AMP_c indutível) ocorre no início da fase luminosa do dia (MESSAGER *et al.*, 2000). Segundo MESSAGER *et al.* (2000) e NUESSLEIN-HILDESHEIM *et al.* (2000), as alterações fotoperíodo-dependentes dos ritmos circadianos estão relacionadas com a duração do período de elevada expressão dos genes *Per*. Contudo, há que referir que, a nível dos SCN, a pinealectomia não afecta o ritmo de expressão do gene *Per1*, ou seja, este parece ser melatonina-independente (HAZLERIGG *et al.*, 2001 e LINCOLN *et al.*, 2002). Nestes núcleos, a expressão do gene *relógio* é igualmente melatonina-independente (SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Pelo contrário, em *pars tuberalis* (PT) da hipófise a expressão dos genes *Per* (MORGAN *et al.*, 1998 e LINCOLN *et al.*, 2002) e *relógio* (SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003) é melatonina-dependente – a melatonina inibe a expressão destes genes (NUESSLEIN-HILDESHEIM, 2000). Nesta estrutura, o gene *Per1* exprime-se também ritmicamente (NUESSLEIN-HILDESHEIM, 2000, TAKEKIDA *et al.*, 2000, GOLDMAN, 2001, HAZLERIGG *et al.*, 2001 e LINCOLN *et al.*, 2002), registando-se igualmente os seus valores mais elevados no início da fase luminosa do dia (MESSAGER *et al.*, 2000, HAZLERIGG *et al.*, 2001 e LINCOLN *et al.*, 2002). Esta expressão é melatonina-dependente, uma vez que a pinealectomia bloqueia o ritmo de expressão do gene *Per1* (HAZLERIGG *et al.*, 2001 e LINCOLN *et al.*, 2002) e a administração diária de melatonina a animais pinealectomizados restaura o padrão rítmico da expressão deste gene em PT (LINCOLN *et al.*, 2002).

Num trabalho recente com ovelhas da raça Soay, LINCOLN *et al.* (2002) estudaram a expressão temporal de sete genes “relógio”, tanto a nível dos SCN como de PT: dois genes

Per – *Per1* e *Per2* –, dois genes ciclo-dependentes – *Relógio* e *Bmal1* –, dois genes *Cry* – *Cry1* e *Cry2* – e a caseína quinase 1 ϵ (CK1 ϵ). Nestas ovelhas, o gene *relógio* presente nos SCN exprime-se segundo um ritmo próximo das 24 horas, paralelamente ao gene *Bmal1*, e em anti-fase com os ciclos dos genes *Per1* e *Per2* (LINCOLN *et al.*, 2002). Nestes núcleos, os genes *Per* são os que apresentam maior variação na sua expressão diária, atingindo o gene *Per1* a sua expressão máxima no começo da fase luminosa do dia (MORGAN *et al.*, 1998, TAKEKIDA *et al.*, 2000 e LINCOLN, 2002), um pouco mais cedo do que o gene *Per2* (LINCOLN *et al.*, 2002). A expressão dos genes *relógio* e *Bmal1* varia ligeiramente em função do tempo, produzindo-se os seus valores máximos durante o período noturno do dia, sensivelmente 12-16 horas depois dos dos genes *Per* (LINCOLN *et al.*, 2002). As variações temporais dos genes *Cry* são pouco significativas ocorrendo, no entanto, a sua fase de maior expressão após a dos genes *Per* (LINCOLN *et al.*, 2002). Segundo LINCOLN *et al.* (2002), a nível dos SCN, apenas a expressão dos genes *Per* parece ser significativamente afectada pelo fotoperíodo, particularmente quando as ovelhas são sujeitas a um regime luminoso de “dias longos”. No geral, a variação temporal da expressão dos genes *Per*, *relógio* e *Bmal1* presentes em *PT* assemelha-se à dos mesmos genes presentes nos SCN (LINCOLN *et al.*, 2002). Porém, a amplitude da variação da expressão dos genes *Cry* é aqui claramente mais elevada e o seu ponto de maior expressão ocorre ao anoitecer (LINCOLN *et al.*, 2002). Em *PT*, enquanto que o amanhecer determina um aumento da expressão dos genes *Per* (MORGAN *et al.*, 1998 e LINCOLN, 2002), o anoitecer estimula a expressão dos genes *Cry* (LINCOLN *et al.*, 2002). Nas ovelhas, a expressão dos genes *Per*, *relógio*, *Bmal1* e *Cry* de *PT* é fotoperíodo-dependente (MORGAN *et al.*, 1998 e LINCOLN, 2002), enquanto que a expressão do gene CK1 ϵ não é visivelmente afectada pelo fotoperíodo (LINCOLN *et al.*, 2002).

Nos mamíferos fotoperiódicos, os SCN parecem igualmente sincronizar os ciclos sazonais, através do controlo que exercem sobre a secreção circadiana de melatonina (THRUN e MOENTER, 1995, WARREN e CASSONE, 1995, NUESSEIN-HILDESHEIM, 2000, HASTINGS e FOLLETT, 2001 e SCHWARTZ *et al.*, 2001). Contudo, nesta área, muitas questões permanecem sem resposta. A nível do organismo, não foi ainda possível estabelecer uma ligação clara entre a regulação de alguns ritmos anuais nas aves e nos mamíferos, por parte dos ritmos circadianos endógenos, e a regulação fotoperiódica dos ritmos circadianos

(THRUN e MOENTER, 1995 e HASTINGS e FOLLETT, 2001). Embora se saiba que os SCN codificam a informação circadiana, permanece desconhecida a forma como a duração do período noturno do dia e a luz alteram a actividade dos SCN, a nível molecular, de forma a codificar a informação circanual (do latim *circa* «ao redor» e *annu* «ano») (MESSAGER *et al.*, 2000, NUESSEIN-HILDESHEIM, 2000 e HASTINGS e FOLLETT, 2001). Na verdade, nem sequer existem provas irrefutáveis de que estes núcleos estão efectivamente envolvidos na codificação da informação circanual (ALILA-JOHANSSON *et al.*, 2001). Por outro lado, não se sabe como é que o organismo lê a mensagem circanual e a converte numa ampla gama de modificações fisiológicas (NUESSEIN-HILDESHEIM, 2000 e HASTINGS e FOLLETT, 2001).

3.2 – IMPORTÂNCIA DA SECREÇÃO DE MELATONINA

Desde o seu isolamento e caracterização, como agente que afecta a coloração da pele nos anfíbios (Lerner *et al.*, 1958; citados por CASSONE e NATESAN, 1997), a melatonina e os órgãos que a produzem têm sido alvos do interesse dos estudiosos da endocrinologia comparada (CASSONE e NATESAN, 1997). Ao que tudo indica, esta hormona é uma molécula filogeneticamente conservada, envolvida na definição do tempo biológico e/ou em processos de fototransdução em numerosos indivíduos, das microalgas, passando pelos metazoários invertebrados, até aos vertebrados (CASSONE e NATESAN, 1997 e REPPERT *et al.*, 1997).

Nos vertebrados, a melatonina é produzida segundo um ritmo endógeno diário (WEBSTER *et al.*, 1991, TUREK e VAN CAUTER, 1994, PICAZO e LINCOLN, 1995, THRUN e MOENTER, 1995, KLEIN *et al.*, 1997, PANG, 1998, BARRIGA *et al.*, 2000, MALPAUX *et al.*, 2001, MATTHEWS e GUERIN, 1995, WEHR, 2001, GÜNDÜZ, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002), inversamente relacionado com a duração do período diário de luz (PICAZO e LINCOLN, 1995, THRUN e MOENTER e GOLDMAN, 2001). Na verdade, este ritmo pode ser encontrado em todas as espécies de vertebrados, independentemente delas estarem activas durante o dia ou durante a noite ou do estilo de vida que levam (KLEIN *et al.*, 1997, REDMAN, 1997, BORJIGIN *et al.*, 1999 e GÜNDÜZ, 2002). Contudo, enquanto que nalgumas espécies o aumento da duração do período diário de secreção de melatonina estimula a actividade reprodutora

(espécies de “dias curtos”), noutras tem o efeito exactamente contrário (espécies de “dias longos”) (REITER, 1993, SONG e BARTNESS, 1996 e GOLDMAN, 2001).

A melatonina integra claramente adaptações sazonais (CASSONE e NATESAN, 1997, NELSON e DEMAS, 1997, BARTNESS *et al.*, 2001, GOLDMAN, 2001, GÜNDÜZ, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002) e afecta variadíssimos processos fisiológicos, anatomo-morfológicos e comportamentais (TUREK e VAN CAUTER, 1994, KLEIN *et al.*, 1997, NELSON e DEMAS, 1997, ZARAZAGA *et al.*, 1998a, BARRETT *et al.*, 1999, LINCOLN, 2000, BARTNESS *et al.*, 2001, GOLDMAN, 2001, WEHR, 2001, GÜNDÜZ, 2002, LINCOLN *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002).

Várias destas adaptações sazonais, incluindo a inibição da actividade reprodutora, o aumento da capacidade de termorregulação e a melhoria da capacidade imunológica, evoluíram de forma a ajudar os animais a prever e a ajustarem-se às variações anuais das suas necessidades energéticas determinadas pelo meio ambiente (Figura 6) (NELSON e DEMAS, 1996, NELSON e DEMAS, 1997, DUNCAN, 1998, BARRETT *et al.*, 1999, BARRIGA *et al.*, 2000, MESSENGER *et al.*, 2000, BARTNESS *et al.*, 2001, GOLDMAN, 2001, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Na verdade, todas estas características são energeticamente muito dispendiosas (NELSON e DEMAS, 1996). Ainda neste sentido, a melatonina afecta o desenvolvimento da pelagem, a regulação da massa corporal, o crescimento neoplásico, a actividade da tiroide, a eficiência intestinal, a taxa metabólica, etc. (KLEIN *et al.*, 1997, NELSON e DEMAS, 1997, ZARAZAGA *et al.*, 1998a, LINCOLN, 2000, LINCOLN *et al.*, 2001 e THIÉRY *et al.*, 2002). Por outro lado, trabalhos recentes têm feito referência ao papel da melatonina nos processos neurodegenerativos, associados ou não ao processo de envelhecimento. Pelo menos nos ratos, ratazanas e primatas, a melatonina inibe os processos neurodegenerativos (SANDYK, 1990, ARMSTRONG e REDMAN, 1991, BORJIGIN *et al.*, 1999, MARITIM *et al.*, 1999, DIAZ *et al.*, 2000, YIHUA *et al.*, 2000, BAYDAS *et al.*, 2002, SAIJA *et al.*, 2002 e PANDI-PERUMAL *et al.*, 2002). A melatonina parece prevenir o envelhecimento, pelo menos em parte, através do efeito antioxidante que exerce a nível das células nervosas (SANDYK, 1990, REITER *et al.*, 1998, BORJIGIN *et al.*, 1999, MARITIM *et al.*, 1999, BAYDAS *et al.*, 2002, OKATANI *et al.*, 2002 e PANDI-PERUMAL *et al.*, 2002) e de outros tecidos (KVETNOY *et al.*, 1997, REITER *et al.*, 1998, OKATANI *et al.*, 2002 e PANDI-PERUMAL *et al.*, 2002 e SAIJA *et al.*, 2002). Esta capacidade da melatonina parece ser mesmo superior à da glutatona reduzida (KVETNOY *et al.*, 1997, BORJIGIN *et al.*, 1999, TASKIRAN *et al.*, 2000 e

YIHUA *et al.*, 2000), da vitamina E e do manitol (KVETNOY *et al.*, 1997). O poder antioxidante da melatonina é 5 vezes superior ao da glutathione reduzida (TASKIRAN *et al.*, 2000 e YIHUA *et al.*, 2000). De acordo com REITER *et al.* (1998), BAYDAS *et al.* (2002) e OKATANI *et al.* (2002), as células nervosas são particularmente vulneráveis ao *stress* oxidativo, uma vez que geram taxas relativamente elevadas de radicais livres de oxigénio, possuem elevadas concentrações de ácidos gordos poli-insaturados e de metais de transição catalisadores de oxidações rápidas e um sistema de defesa antioxidante relativamente deficiente (baixos níveis, por exemplo, de antioxidantes citosólicos). Ao que tudo indica, a melatonina protege várias macromoléculas, incluindo os lípidos, as proteínas e os ácidos nucleicos, de possíveis lesões associadas à presença de espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species*) (MARITIM *et al.*, 1999, BAYDAS *et al.*, 2002, OKATANI *et al.*, 2002 e SAIJA *et al.*, 2002). Por outro lado, a melatonina estimula a actividade de várias enzimas, como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a glutathione redutase (TASKIRAN *et al.*, 2000 e OKATANI *et al.*, 2002).

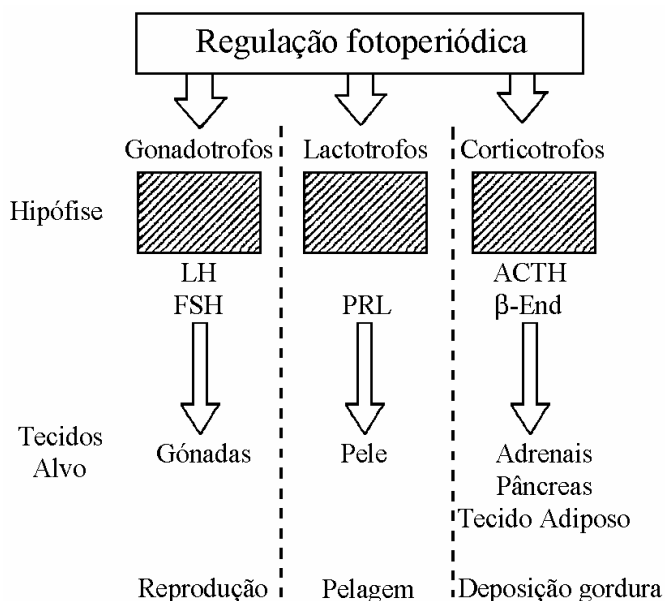


FIGURA 6 – Regulação sazonal dos ciclos reprodutivo, de crescimento da pelagem e de regulação das reservas corporais de gordura. Os ciclos de longa duração destes sistemas endócrinos podem ser gerados endogenamente, como ciclos circanuais, mas são ampliados e sincronizados pelo ciclo fotoperiódico anual, via melatonina (LINCOLN, 1991).

3.3 – MELATONINA

Nos ovinos, as primeiras investigações realizadas com o intuito de estudar a influência da melatonina sobre a sazonalidade reprodutiva foram feitas com ovelhas “inteiras” e pinealectomizadas, mantidas sob condições naturais (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, LINCOLN e CLARKE, 1998 e LINCOLN, 2000). Nesses trabalhos, independentemente do regime fotoperiódico prevalente (“dias curtos” ou “dias longos”), as diferenças observadas entre ovelhas pinealectomizadas e intactas relativamente à sazonalidade revelaram-se estatisticamente não significativas (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993). Por este motivo, o papel da melatonina permaneceu obscuro por algum tempo (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993). Só quando estes animais foram sujeitos a diferentes regimes luminosos artificiais é que o papel da melatonina sobre a sazonalidade reprodutiva se tornou evidente (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, TUREK e VAN CAUTER, 1994 e LINCOLN, 2000).

O ritmo de secreção de melatonina é um ritmo endógeno (ROBINSON *et al.*, 1986, GODDARD, 1991, LINCOLN, 1992, TUREK e VAN CAUTER, 1994, MATTHEWS e GUERIN, 1995, PICAZO e LINCOLN, 1995, THRUN e MOENTER, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b, YELLON, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, GUERIN e MATTHEWS, 1998, GOLDMAN, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, DILEO *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002), gerado pelos SCN (PICAZO e LINCOLN, 1995, YELLON, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, GUERIN e MATTHEWS, 1998, GOLDMAN, 2001, HAZLERIGG *et al.*, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, WEHR, 2001, DILEO *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002), sincronizado pelo fotoperíodo diário (GODDARD, 1991, MATTHEWS e GUERIN, 1995, PICAZO e LINCOLN, 1995, CHEMINEAU *et al.*, 1996, YELLON, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, GOLDMAN, 2001, HAZLERIGG *et al.*, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, DILEO *et al.*, 2002 e LINCOLN *et al.*, 2002) e suprimido pela acção da luz (GODDARD, 1991, MATTHEWS e GUERIN, 1995, PICAZO e LINCOLN, 1995, CHEMINEAU *et al.*, 1996, KLEIN *et al.*, 1997, GUERIN e MATTHEWS, 1998 e DILEO *et al.*, 2002). A infusão de melatonina na circulação periférica, a fim de mimetizar os perfis de secreção da melatonina nos “dias curtos” e nos “dias longos”, pode efectivamente reproduzir os efeitos da aplicação de regimes luminosos, respectivamente, de “dias curtos” e de “dias longos” (CHEMINEAU *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996b, LINCOLN e CLARKE, 1997, GOLDMAN, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, NOTTER e CHEMINEAU, 2001 e FORCADA *et al.*, 2002). Na verdade, a infusão diária de melatonina, por um período de apenas 8 horas, induz respostas típicas de

“dias longos”, enquanto que a infusão diária de melatonina, por um período de 16 horas, determina respostas típicas de “dias curtos” (ROBINSON *et al.*, 1986, LINCOLN, 1992 e LINCOLN, 2000). Nos ovinos expostos a um regime luminoso de “dias longos”, a administração de melatonina exógena consegue produzir o efeito de “dias curtos” (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, WARREN e CASSONE, 1995, CHEMINEAU *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996b, LINCOLN e CLARKE, 1997, LINCOLN, 2000 e FORCADA *et al.*, 2002). Contudo, ainda que os animais sejam mantidos constantemente na escuridão, a secreção de melatonina faz-se ritmicamente, embora a duração do ciclo formado seja diferente das 24 horas¹ (LINCOLN, 1992, MALPAUX *et al.*, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, KALSBECK *et al.*, 2000a, GOLDMAN, 2001 e THIÉRY *et al.*, 2002) e não se produza de uma forma sincronizada no conjunto dos animais (GOLDMAN, 2001 e MALPAUX *et al.*, 1996b). Neste sentido, a melatonina é um marcador útil da actividade circadiana, uma vez que sincroniza o “relógio” endógeno de diferentes animais com o fotoperíodo a que eles estão sujeitos (WEHR, 1997, GUERIN e MATTHEWS, 1998, GOLDMAN, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001 e WEHR, 2001). Contudo, vários factores não fotónicos afectam igualmente o funcionamento deste “relógio”: a alimentação (YELLON, 1996a, KALSBECK *et al.*, 2000a, PROSSER, 2000 e MARTIN *et al.*, 2001), o exercício (YELLON, 1996a, BARRIGA *et al.*, 2000 e HOLLANDER, 2001), a predação (PROSSER, 2000) o humor (*mood*) (YELLON, 1996a e KALSBECK *et al.*, 2000a) e a idade do animal (YELLON, 1996a, HORTON e YELLON, 2001 e PANDI-PERUMAL *et al.*, 2002).

A melatonina é libertada essencialmente durante a noite, em quantidades que variam em função da duração desta fase do dia, e constitui o sinal endócrino da duração do período diário de luz (SEAMARK *et al.*, 1981, ORTAVANT *et al.*, 1988, LOPEZ SEBASTIAN, 1989, GODDARD, 1991, LINCOLN, 1992, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, TUREK e VAN CAUTER, 1994, CHEMINEAU *et al.*, 1996, THIMONIER, 1996, LINCOLN e CLARKE, 1997, KLEIN *et al.*, 1997, WEHR, 1997, VIVIEN-ROELS *et al.*, 1999, MESSENGER *et al.*, 2000, GOLDMAN, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, LINCOLN *et al.*, 2002, MIGAUD *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002, TRICOIRE *et al.*, 2002, TRICOIRE *et al.*, 2003, ROSA e BRYANT, 2003 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003).

1 – Ritmos endógenos, com uma duração diferentes das 24 horas, que surgem em animais mantidos em ambientes luminosos constantes, dizem-se *free-run* (MATTHEWS *et al.*, 1993 e DILEO *et al.*, 2002).

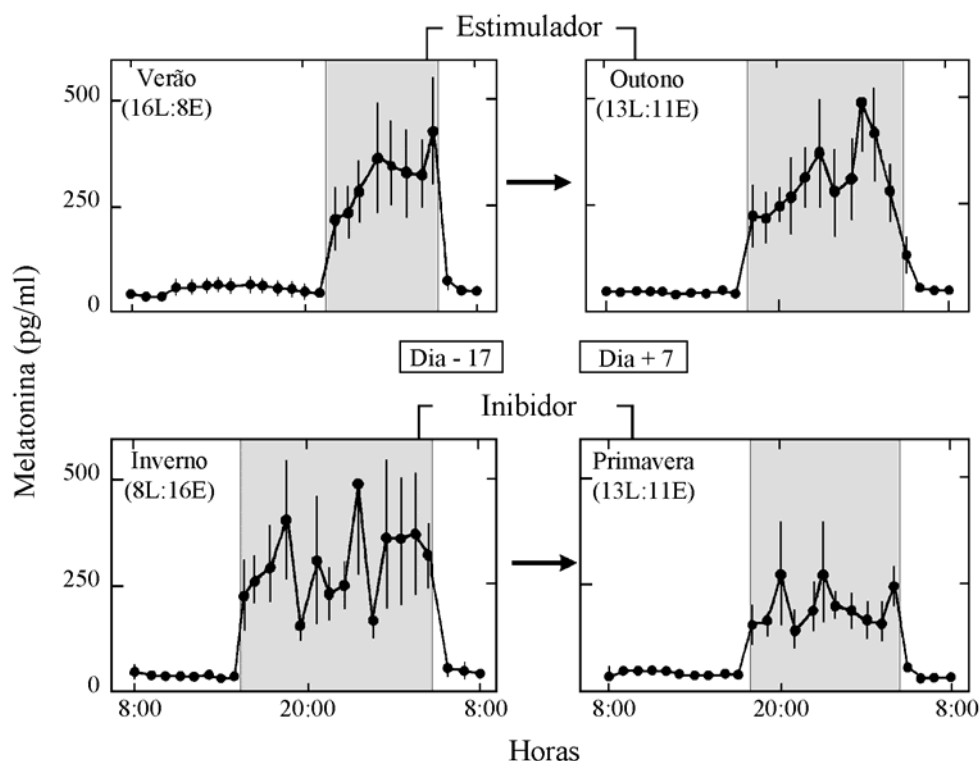


FIGURA 7 – Perfis nectiméricos dos níveis séricos de melatonina, em ovelhas ovariectomizadas e tratadas com implantes de estradiol, determinados 17 dias antes dos solstícios (painéis da esquerda) ou 7 dias após os equinócios (painéis da direita). O período noturno encontra-se representado a escuro (ROBINSON e KARSCH, 1987).

Nos ovinos, as concentrações diurnas desta hormona são extremamente baixas (SEAMARK *et al.*, 1981, LOPEZ SEBASTIAN, 1989, LINCOLN, 1992, THATCHER e HANSEN, 1993, TUREK e VAN CAUTER, 1994, BORGHESE *et al.*, 1996, CHEMINEAU *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996b e NELSON e DEMAS, 1997), salvo raras exceções são mesmo indetermináveis (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993 e KLEIN *et al.*, 1997) (Figura 7). Pelo contrário, as concentrações noturnas de melatonina são elevadas (LINCOLN, 1992, REITER, 1993, THATCHER e HANSEN, 1993, TUREK e VAN CAUTER, 1994, NONNO *et al.*, 1995, BORGHESE *et al.*, 1996, CHEMINEAU *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996b, NELSON e DEMAS, 1997 e MALPAUX *et al.*, 2001) e variam entre os 20-30 pg/ml, nos suínos, os 50-100 pg/ml, nos seres humanos, os 50-150 pg/ml, nos caprinos, e os 100-500 pg/ml, nos ovinos (MALPAUX *et al.*, 1996b). Nestes últimos animais, os níveis circulantes de melatonina elevam-se 10-20 vezes quando da passagem da fase luminosa para a fase escura do dia (CALLAGHAN

et al., 1993). CHEMINEAU *et al.* (1996) referem que esta elevação pode ser mesmo de, pelo menos, 50 vezes.

3.3.1 – SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA MELATONINA

A melatonina é uma indolamina, sintetizada nos pinealócitos a partir do triptofano (MALPAUX *et al.*, 1996b, CASSONE e NATESAN, 1997, PRIVAT *et al.*, 1999 e TOSINI, 2000). Ao contrário da maioria das hormonas, a melatonina não é armazenada em vesículas antes de ser libertada (REITER, 1993, MALPAUX *et al.*, 1996b e TOSINI, 2000). Neste sentido, REITER (1993) considera que os níveis circulantes desta hormona reflectem, com exactidão, a quantidade de melatonina que é produzida pela glândula pineal. Por outro lado, uma vez que a semi-vida da melatonina é muito curta, o perfil circadiano de secreção desta hormona torna-se claro (WIESENBERG *et al.*, 1998).

De acordo com ILLNEROVÁ e SUMOVA (1997), MENAKER (1997), GERLACH e AURICH (2000) e SCHWARTZ *et al.* (2001), a luz suprime a produção de melatonina através da modulação da actividade das enzimas envolvidas na sua biossíntese (Figura 8). A via de síntese desta hormona inclui, sucessivamente, o triptofano, o 5-hidroxitriptofano, a 5-HT, a N-acetilserotonina e finalmente a melatonina (MALPAUX *et al.*, 1996b, DREW *et al.*, 1998, PRIVAT *et al.*, 1999 e TOSINI, 2000).

A transformação do triptofano em 5-hidroxitriptofano, feita pela triptofano hidroxilase (TH), é uma etapa limitante da síntese de 5-HT, ainda que a regulação circadiana da secreção de melatonina pareça ser feita, antes de mais, pela N-acetil-transferase (NAT), que catalisa a transformação da 5-HT em N-acetilserotonina (MALPAUX *et al.*, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, DE ANGELIS *et al.*, 1998, KHALIL *et al.*, 1998, FLEMING *et al.*, 1999, HICKMAN *et al.*, 1999, KHALIL *et al.*, 1999, PRIVAT *et al.*, 1999, TAKEKIDA *et al.*, 2000 e SPESSERT *et al.*, 2001), numa reacção em que está envolvida a acetil coenzima A (DE ANGELIS *et al.*, 1998 e HICKMAN *et al.*, 1999). Nos ovinos, alguns trabalhos indiciam a existência de um mecanismo de regulação da secreção da melatonina independente da NAT, mas dependente do cálcio (MALPAUX *et al.*, 1996b). Esta enzima pode igualmente ser encontrada na hipófise anterior, nomeadamente em *PT* e em menor grau em *pars distalis* (*PD*), embora não exista qualquer dado que indique que estas estruturas estão envolvidas na produção de melatonina (FLEMING *et al.*, 1999). A conversão da N-acetilserotonina em melatonina envolve a enzima hidroxil-indol-O-metiltransferase (KLEIN *et al.*, 1997).

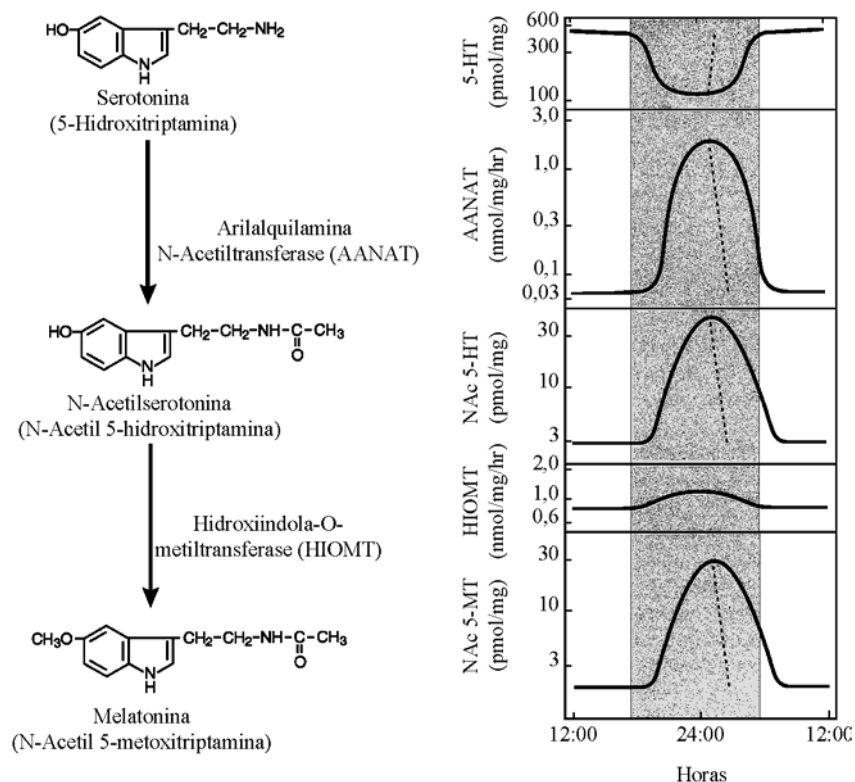


FIGURA 8 – Ritmos do metabolismo da melatonina. O espaço sombreado corresponde ao período noturno. A linha a tracejado representa os efeitos de uma inesperada exposição noturna à luz (KLEIN *et al.*, 1997).

Em todos os vertebrados, a actividade das enzimas anteriormente mencionadas é maior durante o período noturno (ILLNEROVÁ e SUMOVA, 1997, KLEIN *et al.*, 1997, BORJIGIN *et al.*, 1999, KHALIL *et al.*, 1999 e SCHOMERUS *et al.*, 2000). Para KLEIN *et al.* (1997), este facto reflecte a influência conjunta do “relógio” interno e da luz. Nos vertebrados, a actividade enzimática noturna é 7 a 150 vezes superior à diurna, dependendo da espécie em causa (KLEIN *et al.*, 1997 e BORJIGIN *et al.*, 1999). Porém, independentemente da espécie considerada, a actividade da NAT diminui, rapidamente, após o aparecimento da luz (ILLNEROVÁ e SUMOVA, 1997, KLEIN *et al.*, 1997, MENAKER, 1997 e SCHOMERUS *et al.*, 2000). Esta enzima apresenta características comuns às várias espécies, como sejam a sua estrutura espacial, a sua distribuição tecidular e uma estreita associação entre a sua actividade enzimática e a sua porção proteica (KLEIN *et al.*, 1997). Mais, em todas as espécies de mamíferos estudadas, durante os “longos” dias de Verão, enquanto que a presença de luz, no início da noite, causa um atraso de fase, identificável através da demora no começo da

actividade da NAT e da secreção de melatonina, a presença de luz, um pouco antes do amanhecer, determina uma antecipação de fase, uma vez que o período diário de luz tem início mais cedo (ILLNEROVÁ e SUMOVA, 1997). Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da NAT podem variar marcadamente de uma espécie para outra (KLEIN *et al.*, 1997, BORJIGIN *et al.*, 1999 e SCHOMERUS *et al.*, 2000). Nos roedores, a actividade da NAT é fundamentalmente ditada por alterações transcricionais (ILLNEROVÁ e SUMOVA, 1997, BORJIGIN *et al.*, 1999, BURKE *et al.*, 1999 e SCHOMERUS *et al.*, 2000). Pelo contrário, nos ovinos, o controlo da actividade desta enzima é feito pós-transcrição (BORJIGIN *et al.*, 1999 e SCHOMERUS *et al.*, 2000).

Nos ovinos, a produção da NAT varia pouco ao longo das 24 horas do dia e a sua actividade depende, fundamentalmente, da porção proteica (KLEIN *et al.*, 1997 e SCHOMERUS *et al.*, 2000). Do dia para a noite, a porção proteica desta enzima aumenta 10 vezes (KLEIN *et al.*, 1997). De acordo com PRIVAT *et al.* (1999), o aumento da expressão nocturna do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) da TH e da NAT não explica a elevação nocturna dos níveis plasmáticos de melatonina (700%). Segundo KLEIN *et al.* (1997) e TAKEKIDA *et al.* (2000), a adenosina monofosfato cíclica¹ (AMP_c) regula a actividade da NAT, através de um mecanismo que requer nova síntese de proteína e não de ARNm (KLEIN *et al.*, 1997 e TAKEKIDA *et al.*, 2000). Nos ovinos, os elevados níveis diurnos de ARNm da NAT, observáveis a nível da glândula pineal, podem explicar porque é que nestes animais as concentrações de melatonina se elevam rapidamente após o anoitecer e se mantêm elevadas por períodos relativamente longos da noite (KLEIN *et al.*, 1997). Nos bovinos, parece existir um segundo mecanismo noradrenalina (NOR)/AMP_c-dependente envolvido na regulação da actividade da NAT e que passa pela inibição da proteólise proteosomal desta enzima (SCHOMERUS *et al.*, 2000). Quando bloqueado, ele determina o desligar da actividade da NAT (SCHOMERUS *et al.*, 2000).

Nas ratazanas, embora a actividade da NAT seja igualmente regulada pela sua porção proteica, os níveis de ARNm apresentam uma amplitude de variação diária de 150 vezes, o

1 – A via de sinalização, centrada num antigo e dos mais importantes mensageiros secundários – a AMP_c –, é responsável pela regulação de vários processos dentro do CNS: transcrição de genes, plasticidade sináptica, sobrevivência neural e síntese nocturna de melatonina (CHAN *et al.*, 2001 e STEHLE *et al.*, 2001).

que reflecte uma regulação AMP_c-dependente da expressão do gene da NAT (KLEIN *et al.*, 1997, BURKE *et al.*, 1999 e SCHOMERUS *et al.*, 2000). Nestes animais, os níveis diurnos de ARNm não são detectáveis (KLEIN *et al.*, 1997). Na verdade, a luz bloqueia a síntese de ARNm, o que impede a transmissão dos sinais estimuladores dos SCN à glândula pineal (KLEIN *et al.*, 1997). Por outro lado, a exposição destes animais à luz, durante o período nocturno, determina um rápido decréscimo da actividade enzimática (ILLNEROVÁ e SUMOVA, 1997, KLEIN *et al.*, 1997 e SCHOMERUS *et al.*, 2000) e da porção proteica desta enzima (KLEIN *et al.*, 1997 e SCHOMERUS *et al.*, 2000). Nas ratazanas, ao contrário do que sucede nos ovinos, a actividade da NAT não depende da ressíntese de um factor de transcrição, mas sim da fosforilação AMP_c-dependente de um factor de transcrição que se liga ao promotor da NAT (KLEIN *et al.*, 1997, BURKE *et al.*, 1999 e SCHOMERUS *et al.*, 2000). Nas ratazanas, o mecanismo NOR/AMP_c-dependente inibe igualmente a proteólise proteossomal da NAT, embora não se sabe ainda se ele está envolvido no “ligar” do mecanismo NOR-dependente que estimula a actividade da NAT, pouco tempo após o anoitecer (SCHOMERUS *et al.*, 2000).

Tal como a melatonina, a actividade circadiana da NAT é regulada pelo “relógio” endógeno (dos SCN) e pela luz (PICAZO e LINCOLN, 1995, ILLNEROVÁ e SUMOVA, 1997, BORJIGIN *et al.*, 1999, SCHOMERUS *et al.*, 2000 e SCHWARTZ *et al.*, 2001). O início da noite determina um rápido aumento da libertação de NOR, a nível da glândula pineal (REITER, 1993, MALPAUX *et al.*, 1996b, ILLNEROVÁ e SUMOVA, 1997, KLEIN *et al.*, 1997, BORJIGIN *et al.*, 1999, SPESSERT *et al.*, 2001 e STEHLE *et al.*, 2001), feita a partir das terminações intrapineais do simpático (REITER, 1993, MALPAUX *et al.*, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, BORJIGIN *et al.*, 1999 e SCHOMERUS *et al.*, 2000), em resposta a sinais nervosos provenientes dos SCN (SCHOMERUS *et al.*, 2000). Nos pinealócitos, a NOR liga-se aos receptores membranares adrenérgicos α_1 e β (MALPAUX *et al.*, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, PFEFFER *et al.*, 1998, BORJIGIN *et al.*, 1999, SIMONNEAUX *et al.*, 1999, SPESSERT *et al.*, 2001 e TROADEC *et al.*, 2001), levando a adenilciclase a estimular a produção de AMP_c (REITER, 1993, MALPAUX *et al.*, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, PFEFFER *et al.*, 1998, BORJIGIN *et al.*, 1999, SIMONNEAUX *et al.*, 1999, SPESSERT *et al.*, 2001, STEHLE *et al.*, 2001 e TROADEC *et al.*, 2001). Nas ratazanas, enquanto que da ligação da NOR aos receptores β -adrenérgicos resulta um aumento da síntese de AMP_c, da ligação deste neurotransmissor aos receptores α -

adrenérgicos resulta uma estimulação da fosfolipase C, acompanhada de um aumento das concentrações intracelulares de cálcio e da activação da proteína quinase C, o que determina uma potencialização da síntese de AMP_c (SIMONNEAUX *et al.*, 1999). De seguida, à AMP_c cabe o papel de estimular a actividade da NAT (MALPAUX *et al.*, 1996b, PFEFFER *et al.*, 1998, SIMONNEAUX *et al.*, 1999, HAZLERIGG *et al.*, 2001 e SPESSERT *et al.*, 2001) e, consequentemente, a secreção de melatonina (REITER, 1993, PFEFFER *et al.*, 1998 e SIMONNEAUX *et al.*, 1999).

A melatonina entra na circulação sanguínea a nível da veia Galeno (MALPAUX *et al.*, 1996b, SKINNER e MALPAUX, 1999, TRICOIRE *et al.*, 2002 e TRICOIRE *et al.*, 2003). Uma vez que esta hormona é uma molécula lipossolúvel, não existem barreiras à sua difusão, o que lhe permite alcançar todas as regiões corporais (MENAKER, 1997, PANG, 1998, WIESENBERG *et al.*, 1998 e EL-SHERIF *et al.*, 2002). Neste sentido, os níveis plasmáticos de melatonina transportam rapidamente a informação fotoperiódica ambiental a todos os tecidos e órgãos, desempenhando um papel muito importante na sincronização de ritmos corporais diários e anuais (Figura 9) (MENAKER, 1997 e PANG, 1998).

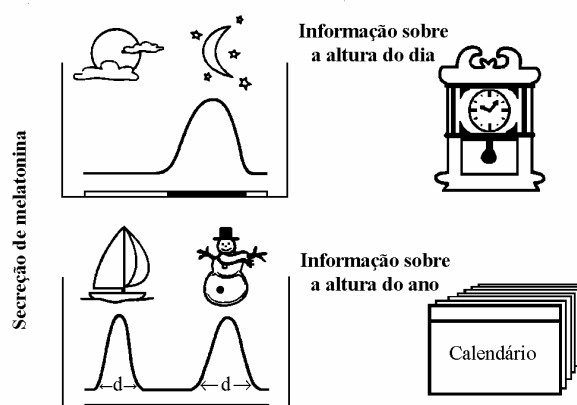


FIGURA 9 – Representação dos dois tipos de sinal que a secreção de melatonina fornece a um animal: “relógio” e “calendário”. A diferença dia - noite dos níveis circulantes de melatonina dá aos órgãos, capazes de a “ler”, a informação relativa à altura do dia, enquanto que a variação sazonal do fotoperíodo, com a consequente alteração da duração do período diário de secreção de melatonina, fornece a informação relativa à altura do ano (REITER, 1993).

O líquido céfalo-raquidiano é uma solução clara e incolor que enche os ventrículos e envolve a superfície externa do encéfalo, totalizando 60-150 ml nos seres humanos e 15 ml nos ovinos (TRICOIRE *et al.*, 2002 e TRICOIRE *et al.*, 2003). Este líquido é basicamente produzido a nível do plexo coroide, uma expansão vascular localizada a nível dos ventrículos laterais (TRICOIRE *et al.*, 2002 e TRICOIRE *et al.*, 2003). Dos ventrículos laterais, este líquido circula em direcção ao terceiro e quarto ventrículos, antes de entrar no espaço subaracnoideu e fluir para baixo, em direcção à espinal-medula (TRICOIRE *et al.*, 2002). Ao líquido céfalo-raquidiano são atribuídas várias funções, incluindo o revestimento líquido e a protecção do cérebro, a excreção de metabolitos e o controlo homeostático do meio químico cerebral (TRICOIRE *et al.*, 2002 e TRICOIRE *et al.*, 2003). Pensa-se também que fornece nutrientes, tanto aos neurónios como às células gliais (TRICOIRE *et al.*, 2003). Mais recentemente, foi sugerido que ele pode constituir uma via intracerebral de transporte de hormonas (TRICOIRE *et al.*, 2002 e TRICOIRE *et al.*, 2003). MALPAUX *et al.* (1998), MALPAUX *et al.* (2001), TRICOIRE *et al.* (2002) e TRICOIRE *et al.* (2003) acreditam mesmo que esta é a principal via através da qual a melatonina alcança os seus tecidos-alvo dentro do hipotálamo. De facto, algumas áreas hipotalâmicas possuem receptores de melatonina facilmente alcançáveis (por simples difusão) pela melatonina transportada no líquido céfalo-raquidiano (TRICOIRE *et al.*, 2002 e TRICOIRE *et al.*, 2003). Por outro lado, sabe-se hoje que a melatonina está presente no líquido céfalo-raquidiano, em concentrações 2-10 vezes (MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 2001 e TRICOIRE *et al.*, 2002) ou até 20 vezes (SKINNER e MALPAUX, 1999 e TRICOIRE *et al.*, 2003) superiores às encontradas na circulação periférica. TRICOIRE *et al.* (2002) demonstraram que a melatonina alcança o líquido céfalo-raquidiano através do recesso pineal, uma evaginação do terceiro ventrículo que penetra na glândula pineal. Ao que tudo indica, a melatonina existente no líquido céfalo-raquidiano tem origem em pinealócitos localizados na porção basal da glândula pineal (justaposta ao recesso pineal), enquanto que a melatonina presente na corrente sanguínea provém de pinealócitos localizados nas imediações dos vasos sanguíneos, que se distribuem por toda a glândula pineal (TRICOIRE *et al.*, 2003).

De acordo com SKINNER e MALPAUX (1999) e TRICOIRE *et al.* (2003), tal como as concentrações plasmáticas, as concentrações de melatonina no líquido céfalo-raquidiano reflectem, com precisão, a duração da noite e são rapidamente suprimidas pela luz. Uma

vez que o volume do líquido céfalo-raquidiano é reduzido, a quantidade de melatonina nele depositada é muito pequena (MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 2001 e TRICOIRE *et al.*, 2003), cerca de 0,1% da que é libertada para a corrente sanguínea (MALPAUX *et al.*, 1996b e MALPAUX *et al.*, 2001). Aparentemente, a melatonina presente no líquido céfalo-raquidiano não desempenha um papel crítico na interpretação, por parte dos animais, da duração do período diário de luz (TRICOIRE *et al.*, 2003). Porém, as elevadas concentrações de melatonina presentes no líquido céfalo-raquidiano estão envolvidas em várias funções mediadas pelo CNS (SKINNER e MALPAUX, 1999 e TRICOIRE *et al.*, 2002). Assim, por exemplo, para além de afectar a secreção pulsátil de LH, esta hormona possui efeitos protectores relativamente a processos neurodegenerativos (como os que se produzem nas doenças de Alzheimer ou de Parkinson) e melhora o sono e o funcionamento do sistema imunitário (BORJIGIN *et al.*, 1999, DAUVILLIERS, 2002, DILEO *et al.*, 2002, PANDIPERUMAL *et al.*, 2002 e TRICOIRE *et al.*, 2002).

Nos ovinos, ainda que a melatonina seja segregada noutras estruturas para além da glândula pineal (retina, glândulas de Harder, intestino, ...), a pinealectomia conduz a taxas nocturnas de melatonina não detectáveis, o que indica que, nestes animais, esta glândula constitui a principal fonte de secreção desta hormona (MALPAUX *et al.*, 1996b, KVETNOY *et al.*, 1997, TOSINI, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003). Embora não se conheça exactamente o papel da melatonina retiniana, sabe-se que ela se encontra profusamente distribuída entre os vertebrados e é filogeneticamente bastante antiga (WARREN e CASSONE, 1995 e TOSINI, 2000). Nos mamíferos, sabe-se que a melatonina retiniana está sob o controlo de um oscilador circadiano local – *Xenopus laevis* (HASEGAWA e CAHILL, 1999) –, que é segregado segundo um ritmo nectimérico idêntico ao da glândula pineal (HASEGAWA e CAHILL, 1999 e GUIDO *et al.*, 2001) e que actua, *in situ*, como um neuromodulador (TOSINI, 2000 e GUIDO *et al.*, 2001). Nos animais de laboratório, curiosamente, o número total de células secretoras de melatonina (células enterocromafínicas) presentes no intestino é claramente superior ao número de possíveis pinealócitos (KVETNOY *et al.*, 1997). Tendo em conta estes dados, KVETNOY *et al.* (1997) admitem existir, pelo menos a nível dos animais de laboratório, um sistema neuroendócrino difuso, extrapineal, de secreção de melatonina.

Nos mamíferos, a melatonina é metabolizada em 6-hidroxi-melatonina a nível do fígado (MALPAUX *et al.*, 1996b e BORJIGIN *et al.*, 1999) e dos rins (MALPAUX *et al.*, 1996b).

Este metabolito é então excretado pela urina, sob formas sulfatadas ou glucuronoconjugadas (MALPAUX *et al.*, 1996b e BORJIGIN *et al.*, 1999). A melatonina é ainda metabolizada, a nível do cérebro, em N-acetil-5-metoxiquenurenamina (MALPAUX *et al.*, 1996b).

3.3.2 – RITMO DE SECREÇÃO DA MELATONINA

Nos seres humanos e nos ovinos, a concentração nocturna de melatonina constitui uma característica individual muito estável (ZARAZAGA *et al.*, 1998a), o que parece indicar que tem origem numa forte e antiga base genética (MALPAUX *et al.*, 1996b, ZARAZAGA *et al.*, 1998a, COON *et al.*, 1999 e VIVIEN-ROELS *et al.*, 1999). Nos ovinos, os níveis sanguíneos desta hormona constituem uma característica de elevada hereditabilidade (0,45) (ZARAZAGA *et al.*, 1998a) e repetibilidade (0,6-0,7) (MALPAUX *et al.*, 1996b e ZARAZAGA *et al.*, 1998a). Pelo contrário, esta concentração varia muito de animal para animal (NELSON e DEMAS, 1997, ZARAZAGA *et al.*, 1998a, VIVIEN-ROELS *et al.*, 1999 e MALPAUX *et al.*, 2001). A origem fisiológica deste fenómeno não é totalmente clara, embora pareça relacionar-se com os mecanismos de degradação (fundamentalmente no fígado) ou de síntese (glândula pineal) (ZARAZAGA *et al.*, 1998). A apoiar a primeira hipótese, trabalhos realizados com vacas e pôneis-fêmea detectaram uma elevada variabilidade entre animais, no que diz respeito à semivida da melatonina (ZARAZAGA *et al.*, 1998a). A apoiar a segunda hipótese encontram-se os resultados alcançados por Rollag *et al.* (1978) (citados por ZARAZAGA *et al.*, 1998a), ZARAZAGA *et al.* (1998b) e VIVIEN-ROELS *et al.* (1999). Trabalhando com ovinos, estes autores observaram uma elevada variação entre animais na síntese nocturna de melatonina. Neste sentido, ZARAZAGA *et al.* (1998b) e VIVIEN-ROELS *et al.* (1999) acreditam que, nos ovinos, os processos catabólicos da melatonina não afectam, significativamente, esta variação. É possível que a variação, inter-ovinos, da síntese nocturna de melatonina resulte de diferenças no desenvolvimento da glândula pineal, uma vez que o peso desta glândula varia muito de animal para animal (ZARAZAGA *et al.*, 1998a), ou de diferenças individuais no pacote de enzimas necessárias à transformação do triptofano em melatonina (ZARAZAGA *et al.*, 1998a). No trabalho realizado por COON *et al.* (1999), a variação inter-animais da secreção nocturna de melatonina resultou de diferenças no peso da glândula pineal e não de diferenças individuais no pacote de enzimas necessárias à produção de melatonina. Qualquer que seja a sua origem, a variação, entre animais, da concentração

nocturna de melatonina está fortemente relacionada com o seu património genético (ZARAZAGA *et al.*, 1998a, COON *et al.*, 1999 e VIVIEN-ROELS *et al.*, 1999).

O perfil de secreção da melatonina varia de acordo com a espécie animal (REITER, 1993, MALPAUX *et al.*, 1996b e MALPAUX *et al.*, 2001). Segundo REITER (1993), existem três padrões distintos de produção de melatonina – A, B e C. O padrão A caracteriza-se por um atraso de várias horas na síntese de melatonina, relativamente ao estabelecimento do período escuro (REITER, 1993). Começado o período de síntese, os níveis de melatonina elevam-se rapidamente até aos seus valores máximos, após o que voltam aos seus valores típicos do período luminoso, sensivelmente na mesma altura em que aparece a luz do dia (REITER, 1993). Os animais que apresentam este padrão nocturno de secreção de melatonina, apenas por um breve período de tempo, possuem normalmente níveis de melatonina superiores aos basais (REITER, 1993). Os hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) manifestam este padrão de secreção de melatonina (REITER, 1993). Os animais com o padrão B de produção de melatonina experimentam uma elevação gradual (lenta) da secreção desta hormona, sensivelmente desde que a luz desaparece (REITER, 1993 e MALPAUX *et al.*, 1996b). O pico da secreção de melatonina é alcançado a meio do período nocturno (REITER, 1993 e MALPAUX *et al.*, 1996b). A segunda metade do período nocturno, caracteriza-se por uma queda gradual da secreção desta hormona (REITER, 1993). O homem, o rato doméstico (*Rattus norvegicus*) e o hamster dourado são três exemplos de espécies que apresentam este padrão de secreção de melatonina (REITER, 1993, MALPAUX *et al.*, 1996b e MALPAUX *et al.*, 2001). O padrão C de produção nocturna de melatonina é marcado pela elevada secreção desta hormona, virtualmente ao longo de todo o período nocturno (REITER, 1993 e MALPAUX *et al.*, 1996b). Na verdade, nos primeiros trinta minutos deste período, é alcançado o máximo de secreção de melatonina (REITER, 1993). Este máximo mantém-se ao longo de quase todo o período escuro e apenas na sua fase final se produz um decréscimo brusco da produção de melatonina (REITER, 1993 e MALPAUX *et al.*, 1996b). Este padrão pode ser encontrado entre os ovinos, os caprinos e o rato do algodão (REITER, 1993, MALPAUX *et al.*, 1996b e MALPAUX *et al.*, 2001). De acordo com KENNAWAY e ROWE (1995), qualquer que seja o padrão de secreção de melatonina apresentado, as concentrações nocturnas máximas de melatonina não variam significativamente ao longo do ano.

Nos ovinos e nos caprinos, após o início da noite, a secreção de melatonina eleva-se muito rapidamente – menos de 10 minutos depois (MALPAUX *et al.*, 1996b). Segundo RAVAUULT e CHESNEAU (1999), o começo da secreção nocturna desta hormona depende do regime luminoso a que os ovinos estiverem sujeitos. Sob um fotoperíodo de “dias longos”, a secreção de melatonina começa 11 minutos após o escurecer, enquanto que sob um fotoperíodo de “dias curtos” a sua secreção só tem início 20 minutos após o anoitecer (RAVAULT e CHESNEAU, 1999). Posteriormente, durante o resto da noite, a secreção de melatonina mantém-se elevada (MALPAUX *et al.*, 1988 e MALPAUX *et al.*, 1996b), embora oscile consideravelmente, o que sugere que ela é libertada de uma forma episódica (MALPAUX *et al.*, 1988 e MALPAUX *et al.*, 1996b). Nesta altura do dia, a exposição dos ovinos à luz conduz, rapidamente, à diminuição dos níveis desta hormona presentes na glândula pineal e em circulação (CALLAGHAN *et al.*, 1993, CHEMINEAU *et al.*, 1996 e KLEIN *et al.*, 1997).

Nos pequenos ruminantes, a extensão do período nocturno do dia dita a duração da fase de secreção máxima de melatonina (ORTAVANT *et al.*, 1988, LOPEZ SEBASTIAN, 1989, LINCOLN, 1992, MATTHEWS *et al.*, 1993, REITER, 1993, THATCHER e HANSEN, 1993, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, TUREK e VAN CAUTER, 1994, CHEMINEAU *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996a, THIMONIER, 1996, LINCOLN e CLARKE, 1997, WEHR, 1997 e MALPAUX *et al.*, 1998). A fim de mimetizar a duração desta fase de secreção máxima, vários trabalhos demonstraram já que é indiferente administrar melatonina de uma forma contínua (através de implantes subcutâneos, que não mimetizam a situação fisiológica natural) ou de uma forma descontínua (através de injeção ou de incorporação nos alimentos) (LINCOLN, 1992, HARESIGN, 1993 e MALPAUX *et al.*, 1996b). Em ambos os casos, os níveis circulantes de melatonina resultam do somatório das contribuições endógena e exógena (STAPLES *et al.*, 1992, GOLDMAN, 2001 e FORCADA *et al.*, 2002). Na verdade, esta hormona parece não possuir qualquer mecanismo de retroacção negativa sobre a sua própria secreção, nem a sua taxa de destruição parece variar significativamente ao longo do dia (STAPLES *et al.*, 1992).

3.3.3 – PARÂMETROS CHAVE DO RITMO DE SECREÇÃO DA MELATONINA

Tal como já foi anteriormente referido, os efeitos do fotoperíodo sobre a actividade reprodutora são traduzidos pelo ritmo circadiano de secreção de melatonina (ROBINSON *et*

al., 1986, LINCOLN, 1992, MALPAUX *et al.*, 1996a,b, THIMONIER, 1996, YELLON, 1996a,b, GUERIN e MATTHEWS, 1998, PANG, 1998, MALPAUX *et al.*, 2001, WEHR, 2001 e THIÉRY *et al.*, 2002). Contudo, não se sabe ainda, com exactidão, qual o parâmetro chave do ritmo de secreção da melatonina. Três parâmetros principais têm sido considerados: a amplitude, a duração da secreção ou a fase. A hipótese da amplitude tem por base as diferenças observadas entre os níveis nocturnos e diurnos da secreção de melatonina (Figura 10) (MALPAUX *et al.*, 1996b). Esta hipótese não tem sido muito considerada, uma vez que ela não varia, significativamente, em função da duração do período diário de luz (KENNAWAY e HUGEL, 1992 e MALPAUX *et al.*, 1996b). Por outro lado, ela varia demasiado entre animais para poder constituir uma característica fiável de avaliação deste mesmo ritmo (MALPAUX *et al.*, 1996b).

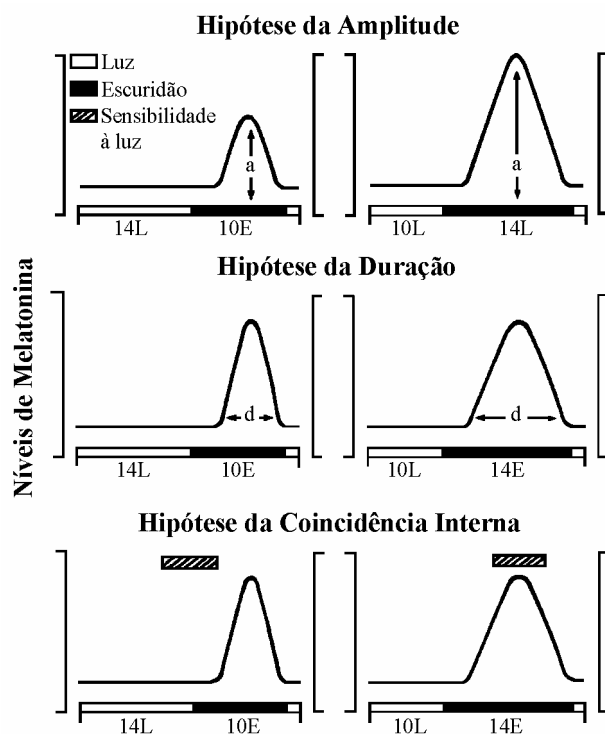


FIGURA 10 – Representação esquemática das hipóteses da amplitude, da duração e da fase (ou coincidência interna) (REITER, 1993).

Para MATTHEWS *et al.* (1993), WILLIAMS e HELLIWELL (1993), MALPAUX *et al.* (1996b), GUERIN e MATTHEWS (1998), MALPAUX *et al.* (2001) e ROSA e BRYANT (2003), a maior parte dos dados disponíveis é favorável à hipótese da duração. De acordo com esta

hipótese, a resposta fotoperiódica de um animal depende do tempo de exposição a um sinal contínuo de melatonina, independentemente deste ocorrer durante a noite ou durante o dia (LINCOLN, 1992, THATCHER e HANSEN, 1993, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, CORREIA, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996b, THIMONIER, 1996, WEHR, 1997, HAZLERIGG *et al.*, 2001 e MALPAUX *et al.*, 2001). A administração de melatonina exógena (via oral, através de injeções ou da aplicação de implantes subcutâneos) ao longo de um dia leva a que, durante a fase luminosa do dia, se elevem os níveis circulantes de melatonina e que, durante a fase noturna do mesmo, não diminua a secreção endógena desta hormona (ELDON, 1993). Nos hamsters, a melatonina é lida como um sinal contínuo, desde que o intervalo entre diferentes presenças desta hormona em circulação não exceda as duas horas (WEHR, 1997). Estes dados indicam que, nestes animais, o mecanismo que mede a duração da secreção de melatonina é levado à posição “zero”, sempre que a melatonina não está presente por um período de tempo superior a duas horas (WEHR, 1997).

Os resultados que mais suportam a hipótese da duração provêm de trabalhos em que foram administradas infusões de melatonina a animais pinealectomizados (KENNAWAY e HUGEL, 1992, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993 e WEHR, 1997). Particularmente, nos ovinos e nos hamsters siberianos, a infusão de melatonina produz sempre uma resposta relacionada com a duração desta mesma infusão e independente da duração do período diário de luz ou da relação de fase entre o ciclo luminoso e o momento da infusão (CORREIA, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996b e MALPAUX *et al.*, 2001). A sazonalidade reprodutiva pode ser estabelecida em animais pinealectomizados, através da administração programada de melatonina, que deverá variar apenas em termos de duração e não de amplitude (KENNAWAY e HUGEL, 1992). Nos ovinos inteiros, a administração de melatonina exógena produz uma nova sincronização da posição de fase do ritmo circadiano endógeno (WARREN e CASSONE, 1995 e GUERIN e MATTHEWS, 1998). Na verdade, a melatonina possibilita mesmo a alteração da relação natural entre o ritmo circadiano endógeno e o fotoperíodo a que o animal está presentemente sujeito (GUERIN e MATTHEWS, 1998). Por outro lado, há que não esquecer que a definição de duração não é absoluta, mas sim relativa (MALPAUX *et al.*, 2001). Na verdade, a interpretação da duração da secreção de melatonina depende da história fotoperiódica dos animais (GOLDMAN, 2001 e MALPAUX *et al.*, 2001). A resposta fisiológica é mais afectada pelas alterações de sentido na secreção desta hormona do que pela duração em si (MALPAUX *et al.*, 2001).

De acordo com a hipótese da fase, formulada originalmente para plantas por Bünning (1936) (citado por FOLCH, 1983, KUMAR e FOLLETT, 1993, MATTHEWS *et al.*, 1993 e CORREIA, 1996), nos animais há um ritmo circadiano de fotossensibilidade (SEAMARK *et al.*, 1981, HANSEN, 1985, ORTAVANT *et al.*, 1988, VIJIL, 1989, KUMAR e FOLLETT, 1993, MATTHEWS *et al.*, 1993 e GOLDMAN, 2001), ajustado pelos ciclos de luz/escuridão (VIJIL, 1989, KUMAR e FOLLETT, 1993, MATTHEWS *et al.*, 1993 e GOLDMAN, 2001). Dependendo da coincidência ou não da presença de luz com a fase foto-indutível, assim será ou não estimulada uma determinada resposta fisiológica (FOLCH, 1983, VIJIL, 1989, ORTAVANT *et al.*, 1988, ELDON, 1993, KUMAR e FOLLETT, 1993, THIMONIER, 1996, GOLDMAN, 2001 e HAZLERIGG *et al.*, 2001). Por outras palavras, TUREK e VAN CAUTER (1994), MALPAUX *et al.* (1996b) e HAZLERIGG *et al.* (2001) afirmam que a existência desta estimulação depende da presença de melatonina num dado momento nictemérico, que coincida com um período de sensibilidade a esta hormona.

Modificando a hipótese de Bünning (1936), Pittendrigh e Minis (1964) procuraram explicar a sazonalidade reprodutiva através da evocação de dois modelos de coincidência – uma externa e outra interna (MATTHEWS *et al.*, 1993 e GOLDMAN, 2001). O modelo de coincidência externa propõe uma fase de sensibilidade à luz (com poderes para evocar uma resposta fisiológica) coincidente ou não, alternadamente e em função da estação do ano, com alguma porção do ciclo diário de luz (MATTHEWS *et al.*, 1993, GUERIN *et al.*, 2000 e GOLDMAN, 2001); o modelo de coincidência interna proposto por Pittendrigh e Minis (1964), sozinho, nada acrescenta à hipótese de Bünning (1936) (MATTHEWS *et al.*, 1993 e GOLDMAN, 2001). Neste modelo, existe apenas um oscilador circadiano (GOLDMAN, 2001). O modelo de coincidência interna postula dois osciladores circadianos, cada um com o seu período próprio de sensibilidade, mas com relações de alteração de fase que variam ao longo do ano (MATTHEWS *et al.*, 1993, REDMAN, 1997 e GOLDMAN, 2001). Sob uma determinada relação produz-se uma indução da actividade reprodutora e, sob a outra, uma regressão desta mesma actividade (MATTHEWS *et al.*, 1993). No hamster dourado, a injeção de melatonina, ao fim da tarde, determina um efeito “dias curtos” (inibe a actividade reprodutora), enquanto que, em qualquer outro momento do dia, tal efeito não se observa (MATTHEWS *et al.*, 1993, KENNAWAY e ROWE, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b e REDMAN, 1997). No hamster Sírio, sujeito a um fotoperíodo de “dias longos”, a administração de

melatonina, ao fim da tarde ou na fase final da noite, determina a inibição da actividade reprodutora; nenhum efeito foi encontrado quando a administração de melatonina foi feita durante a fase inicial do dia ou durante a maior parte da noite (REDMAN, 1997 e GOLDMAN, 2001). Segundo GUERIN e MATTHEWS (1998), nos ovinos Romney Marsh, o ritmo endógeno de secreção de melatonina (usualmente referido como estreitamente ligado à duração da noite) não representa completamente o sinal do CNS, mas reflecte apenas uma versão mascarada ou limitada (pelo fotoperíodo natural) do “relógio” interno. Sob um regime luminoso constante de escuridão (a fim de se evitarem os efeitos da sincronização), os níveis de melatonina sugerem a existência de um tempo circadiano crítico, particularmente durante a Primavera-Verão, em que a luz natural do pôr-do-sol delimita a plena expressão do ritmo de melatonina (MATTHEWS e GUERIN, 1995, GUERIN e MATTHEWS, 1998 e GUERIN *et al.*, 2000). Assim, na Primavera-Verão, a recepção de luz nesta possível fase de fotossensibilidade fornecerá o sinal “dias longos”, fundamental ao arranque da actividade reprodutora no Outono (MATTHEWS e GUERIN, 1995, GUERIN e MATTHEWS, 1998 e GUERIN *et al.*, 2000). Nos “dias curtos” do Outono-Inverno, este intervalo de tempo crítico localiza-se dentro do período de escuridão natural e poderá constituir o sinal “dias curtos”, crucial à indução da resposta reprodutiva (GUERIN e MATTHEWS, 1998 e GUERIN *et al.*, 2000). De acordo com MATTHEWS e GUERIN (1995), antes do solstício de Verão, a administração de melatonina exógena, ao anoitecer, simula o sinal “escuridão” e determina um atraso no recomeço da estação reprodutiva. Depois do solstício de Verão, esta mesma administração de melatonina exógena determina a antecipação da estação reprodutiva (MATTHEWS e GUERIN, 1995). Para MATTHEWS e GUERIN (1995) e GUERIN e MATTHEWS (1998), estes resultados confirmam, claramente, o modelo de coincidência externa de Pittendrigh e Minis (1964). De igual modo, LINCOLN *et al.* (2002) acreditam que o modelo de coincidência externa explica a variação sazonal da actividade reprodutora dos ovinos Soay.

Nos ovinos, até há muito pouco tempo atrás, a hipótese da fase era fundamentalmente suportada por resultados obtidos em trabalhos nos quais foram usados ciclos luminosos, denominados por interrupções nocturnas ou *flashes* (ORTAVANT *et al.*, 1988, THIMONIER, 1996 e GOLDMAN, 2001). Destas e de outras experiências surgiu a hipótese da duração do período diário de luz não ser medida em termos de exposição total à luz, mas sim através da

presença da luz em dois momentos fixos, em que um deles provavelmente ajusta o ritmo circadiano de fotossensibilidade e o outro determina a resposta fisiológica, de acordo com a sua posição em relação ao ritmo circadiano endógeno e à fase foto-indutível (ORTAVANT *et al.*, 1988 e GOLDMAN, 2001). Assim, a presença de luz, numa determinada altura da fase de escuridão, é suficiente para levar os animais a interpretar o regime luminoso como sendo de “dias longos” (LINCOLN, 1992, KUMAR e FOLLETT, 1993, CORREIA, 1996 e GOLDMAN, 2001). A repartição do período de iluminação diária por duas fases, consistindo a primeira num período contínuo de 7 horas de luz e a segunda num período de 1 hora de luz, aplicado entre a 16^a e a 17^a hora “pós-amanhecer”, é entendida pelos ovinos como correspondendo a “dias longos” (LINCOLN, 1992 e CORREIA, 1996). A exposição dos ovinos a *flashes* nocturnos de luz causa um rápido decréscimo da concentração circulante de melatonina, independentemente do momento da noite em que esta é feita (LINCOLN, 1992). Porém, LINCOLN (1992) afirma que, apenas quando o período nocturno da secreção de melatonina é dividido a meio (*flash* de luz feito entre as 16 e as 17 horas “pós-amanhecer”), se produz um encurtamento do período de secreção de melatonina – resposta típica de “dias longos”. Assim, por exemplo, no trabalho realizado por LINCOLN (1978), a aplicação de um regime luminoso de 11L:1E:5L:7E foi interpretada por um grupo de carneiros Soay como sendo um regime luminoso de “dias curtos”.

Mais recentemente, num estudo em que foram utilizadas ovelhas da raça Soay, LINCOLN *et al.* (2002) verificaram que a expressão dos genes “relógio”, a nível dos SCN, é consentânea com o modelo de coincidência externa. Na verdade, a única variação significativa da expressão dos genes “relógio” foi observada após o “amanhecer” e apenas no que concerne aos genes *Per* (LINCOLN *et al.*, 2002). Por seu turno, a expressão dos genes “relógio”, a nível de *PT*, é melhor explicada pelo modelo de coincidência interna (LINCOLN *et al.*, 2002). Neste caso, o “amanhecer” marca um aumento significativo da expressão dos genes *Per* e o pôr-do-sol um aumento significativo da expressão dos genes *Cry* (LINCOLN *et al.*, 2002).

Ainda que a duração ou a fase sejam as características chave do ritmo de secreção da melatonina, elas não são absolutas (MALPAUX *et al.*, 1996b, GOLDMAN, 2001 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Com efeito, foi demonstrado, em várias situações fisiológicas, que os perfis de melatonina, caracterizados por uma duração e uma fase idênticas,

podem levar a respostas opostas (KENNAWAY e ROWE, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b, THIMONIER, 1996 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Por exemplo, se ovelhas ovariectomizadas e tratadas com implantes de estradiol, inicialmente expostas a um regime de “dias longos” (16L), forem submetidas a um regime luminoso de 13L, nelas acaba por se produzir um aumento da secreção de LH (KENNAWAY e ROWE, 1995 e MALPAUX *et al.*, 1996b). Pelo contrário, se as ovelhas tiverem estado inicialmente sujeitas a um regime de “dias curtos” (10L), a sua exposição a 13L traduz-se numa inibição da secreção de LH (ROBINSON e KARSCH, 1987). Consequentemente, o mesmo sinal fotoperiódico induz efeitos estimulantes ou inibidores, em função do regime fotoperiódico a que os animais estavam anteriormente submetidos (MATTHEWS *et al.*, 1993 e MALPAUX *et al.*, 1996b). Os perfis de secreção da melatonina medidos nesta experiência indicam que, em ambas as situações, a secreção de melatonina se prolonga por toda a noite (MALPAUX *et al.*, 1996b). Os animais responderam, assim, de forma diferente ao mesmo sinal – melatonina –, segundo a natureza da sua exposição prévia (MALPAUX *et al.*, 1996b e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Num dado momento, o animal não interpreta uma duração ou uma fase do ritmo de secreção de melatonina no absoluto, mas sim relativamente àquela que o precedeu (MALPAUX *et al.*, 1996b). MATTHEWS *et al.* (1993) e SIMONNEAUX e RIBELAYGA (2003) acreditam que estes dados indicam que, de algum modo, a informação temporal é armazenada, medida e referenciada, por forma a comparar a informação fotoperiódica de hoje com a de ontem ou a de há um mês atrás.

Segundo Pittendrigh (1988) (citado por WEHR, 1997), no CNS localizam-se realmente programas temporais que regulam a duração da secreção de melatonina e a ajustam às variações sazonais da duração da noite. O período noturno da secreção de melatonina não é mais do que uma manifestação de um programa mais geral do CNS, que cria no organismo uma “noite biológica” e um “dia biológico” (WEHR, 1997). Adicionalmente, à plasticidade inerente às suas respostas, face às alterações do fotoperíodo, os programas do CNS têm igualmente propriedades de inércia (WEHR, 1997). Quando as células do CNS modificam a duração da “noite biológica” (e consequentemente a secreção noturna de melatonina), em função das variações do período fotossensível, estas modificações persistem por um ou mais ciclos, sob condições então tornadas constantes (WEHR, 1997).

3.3.4 – SINCRONIZAÇÃO DO “RELÓGIO” INTERNO COM O FOTOPERÍODO DIÁRIO

Segundo KENNAWAY (2002), a homeostasia é um conceito fisiológico duradouro que implica estabilidade, embora reconheça a existência de uma grande variedade de sistemas fisiológicos que estão longe de ser imutáveis e que apresentam mesmo uma ritmicidade diária ou circanual. Moore-Ede (1986) (citado por KENNAWAY, 2002) sugere que o conceito de homeostasia seja repensado, de forma a incorporar o conceito de ritmicidade e propõe a adoção dos termos de “homeostasia reactiva” e de “homeostasia predictiva”. De acordo com este autor, o primeiro termo relaciona-se com respostas reactivas a modificações de parâmetros fisiológicos que já ocorreram, enquanto que o segundo diz respeito a reacções fisiológicas que têm início antes do tempo previsto para a sua ocorrência. Em várias espécies animais, os ritmos circanuais bioquímicos, nervosos, endócrinos e comportamentais desempenham um papel central em muitos aspectos da actividade reprodutora (CASSONE *et al.*, 1993 e TUREK e VAN CAUTER, 1994). Estes ritmos fornecem as bases da organização temporal das funções reprodutivas de cada animal (CASSONE *et al.*, 1993 e TUREK e VAN CAUTER, 1994), permitindo-lhes prever e desta forma preparar-se para as alterações sazonais das condições ambientais (TUREK e VAN CAUTER, 1994, WOODFILL *et al.*, 1994, THRUN e MOENTER, 1995, SONG e BARTNESS, 1996 e THIÉRY *et al.*, 2002). Para serem mais eficazes, os ritmos circanuais têm de estar em sintonia perfeita com as condições ambientais locais (WOODFILL *et al.*, 1994, THRUN e MOENTER, 1995, SONG e BARTNESS, 1996 e GERLACH e AURICH, 2000). O fotoperíodo é, claramente, uma fonte externa de informação, fiável e estável, da estação do ano e, por isso mesmo, constitui o principal factor ambiental responsável pela sincronização dos ritmos circanuais com o ano geofísico (WOODFILL *et al.*, 1994, KARSCH *et al.*, 1995, SWEENEY *et al.*, 1997, RIBELAYGA *et al.*, 1999, GERLACH e AURICH, 2000, GOLDMAN, 2001, DILEO *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002). Na verdade, em todas as latitudes, os momentos do amanhecer e do pôr-do-sol diferem precisa e sistematicamente ao longo do ano e, como tal, podem ser usados como marcadores de um calendário definidor de eventos como a reprodução, a migração, o crescimento, a alteração das reservas corporais de gordura e as modificações no pêlo ou nas penas (VIJIL, 1989, KUMAR e FOLLETT, 1993, LINCOLN e CLARKE, 1997, NELSON e DEMAS, 1997, WEHR, 1997, ROSS *et al.*, 1998, GÜNDÜZ, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Muito antes dos seres humanos possuírem os conhecimentos necessários

para “ordenar” as estações do ano em 365 dias, 5 horas, 48 minutos e 46 segundos, já os animais utilizavam um verdadeiro “calendário” interno (MATTHEWS *et al.*, 1993).

De acordo com LINCOLN (1992), PICAZO e LINCOLN (1995) e GOLDMAN (2001), existem dois modelos conceptuais do modo como a luz condiciona a secreção diária da melatonina. No primeiro (consentâneo com o modelo de coincidência externo), à luz cabe o papel de sincronizar o ritmo endógeno com as 24 horas de um dia (RUSAK *et al.*, 1990, LINCOLN, 1992, KUMAR e FOLLETT, 1993, MATTHEWS *et al.*, 1993, THATCHER e HANSEN, 1993, PICAZO e LINCOLN, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b, KLEIN *et al.*, 1997, GOLDMAN, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, WEHR, 2001, DILEO *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003) e de inibir a secreção de melatonina (LINCOLN, 1992, MATTHEWS *et al.*, 1993, PICAZO e LINCOLN, 1995, KLEIN *et al.*, 1997 e GOLDMAN, 2001). Esta sincronização é feita através de pequenos reajustes diários na secreção de melatonina (resultantes da variação diária dos momentos do amanhecer e do pôr-do-sol), o que permite ao “relógio” interno manter-se certo ao longo de todo o ano (MATTHEWS *et al.*, 1993, NELSON e DEMAS, 1997, MALPAUX *et al.*, 2001 e WEHR, 2001). De acordo com LINCOLN (1992) e MATTHEWS *et al.* (1993), a generalidade da literatura disponível referente aos ovinos é consentânea com este primeiro modelo.

No segundo modelo (consentâneo com o modelo de coincidência interna), a luz actua apenas de modo a sincronizar o sinal endógeno do CNS, através de múltiplos osciladores circadianos (LINCOLN, 1992, PICAZO e LINCOLN, 1995 e GOLDMAN, 2001). Contudo, o modelo deixa em aberto a forma como a relação de fase entre os múltiplos osciladores traduz a informação fotoperiódica (GOLDMAN, 2001). Este modelo baseia-se em estudos detalhados realizados com ratos, os quais indicam que o início e o fim do período de produção de melatonina são definidos por dois osciladores circadianos (RUSAK *et al.*, 1990, WEHR, 1997 e GOLDMAN, 2001). Um, ligado ao anoitecer, que, sincronizado pelo pôr-do-sol, controla o início da actividade nocturna e outro, ao amanhecer, que, sincronizado pelo nascer do dia, determina o fim desta mesma actividade (Figura 11) (LINCOLN, 1992, KALSBECK *et al.*, 2000a e GOLDMAN, 2001). Segundo MATTHEWS *et al.* (1993) e LINCOLN *et al.* (2002), o mecanismo fisiológico subjacente à acção do amanhecer e do anoitecer, sobre a sincronização do ritmo circadiano endógeno às 24 horas do dia, é explicável através da curva de resposta à fase (PRC), a qual prevê a resposta do “relógio” de fase à luz. A PRC postula a

existência de dois períodos aproximadamente iguais, mas com diferentes respostas à luz (MATTHEWS *et al.*, 1993 e GUERIN e MATTHEWS, 1998). O primeiro (“dia subjectivo”), é a parte das 24 horas do dia em que a luz não exerce qualquer efeito sobre o movimento do “relógio” interno (MATTHEWS *et al.*, 1993). No segundo período (“noite subjectiva”), a luz induz alterações de fase dependentes do momento exacto em que ela é recebida (MATTHEWS *et al.*, 1993, GOLDMAN, 2001 e KOPP *et al.*, 2001). Na primeira parte da “noite subjectiva”, a luz produz um atraso da fase (tende a atrasar os eventos endógenos), enquanto que na parte final da “noite subjectiva” a luz promove uma antecipação da fase (MATTHEWS *et al.*, 1993, KOHLER *et al.*, 2000 e REA e PICKARD, 2000).

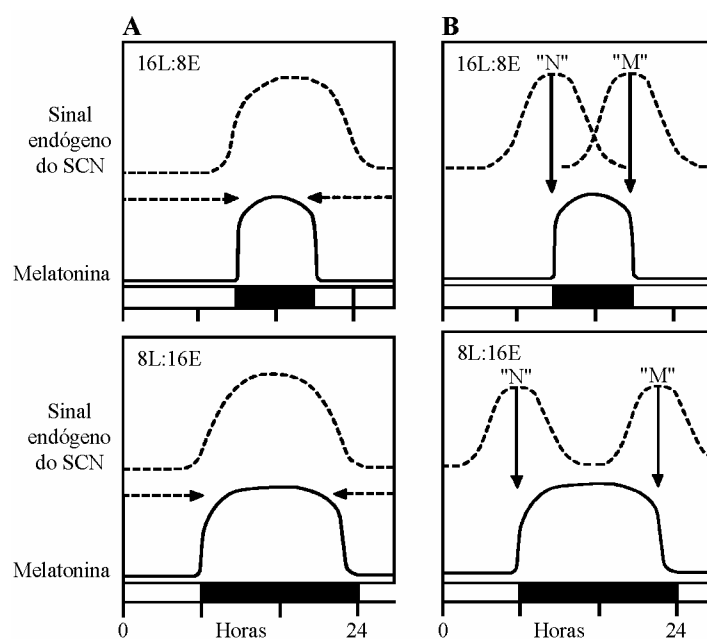


FIGURA 11 – Modelos de formação do sinal da melatonina sob “dias longos” (16L:8E) e sob “dias curtos” (8L:16E). (A) A luz actua tanto na sincronização do sinal circadiano endógeno, com origem nos núcleos supraquiasmáticos (SCN), como na supressão da secreção de melatonina. (B) A luz actua sincronizando dois sinais circadianos endógenos (provenientes dos SCN) que, independentemente, controlam o início (oscilador nocturno, N) e o fim (oscilador matinal, M) da secreção da melatonina (LINCOLN, 1992).

Do organismo mais simples ao mais complexo, ainda que varie de espécie para espécie e até de indivíduo para indivíduo, o “relógio” interno tem, invariavelmente, uma dura-

ção próxima das 24 horas – período τ (tau) (RUSAK *et al.*, 1990, MATTHEWS *et al.*, 1993, HOLLANDER, 2001 e DAUVILLIERS, 2002). Actualmente, sabe-se que o período τ dos ovinos Romney Marsh (MATTHEWS *et al.*, 1993 e GUERIN e MATTHEWS, 1998), das ovelhas Suffolk e dos carneiros Ile-de-France (MATTHEWS *et al.*, 1993) é ligeiramente superior a 24 horas, enquanto que o dos carneiros Soay é um pouco inferior a 24 horas (LINCOLN, 1992). Para MATTHEWS *et al.* (1993), nos animais com um τ superior às 24 horas, a sincronização diária do ritmo endógeno, com o período de 24 horas do dia, depende mais do adiantamento causado pela luz do amanhecer do que do atraso promovido pelo crepúsculo. Assim, por exemplo, nos ovinos Romney Marsh, esta sincronização diária resulta, fundamentalmente, da acção da luz do amanhecer, a qual determina o avanço diário do “relógio” interno (MATTHEWS *et al.*, 1993). Pelo contrário, nos carneiros Soay, a sincronização diária do ritmo endógeno, com o período de 24 horas do dia, resulta essencialmente do atraso diário do “relógio” interno, promovido pelo crepúsculo (MATTHEWS *et al.*, 1993).

A sincronização do ritmo endógeno de secreção da melatonina pela luz, e em especial pela luz do amanhecer, tem importantes implicações (MATTHEWS *et al.*, 1993). No Inverno (“dias curtos”) a porção “subjectiva” da noite é atrasada (τ superior às 24 horas) e por isso sobrepõe-se ao amanhecer (MATTHEWS *et al.*, 1993). À medida que o fotoperíodo diário aumenta (encurtamento das noites), o momento do amanhecer produz-se cada vez mais cedo e aproxima-se progressivamente da porção da PRC que determina um avanço da fase, ou seja, o “relógio” interno adianta-se gradualmente (Figura 12) (MATTHEWS *et al.*, 1993). Quando o adiantamento é tal que a “noite subjectiva” fica exposta ao crepúsculo, este “relógio” começa a atrasar-se (MATTHEWS *et al.*, 1993).

Embora se saiba que a sucessão de “dias longos” e de “dias curtos” desempenha um papel fundamental na iniciação da actividade reprodutora, muitas características importantes do sinal fotoperiódico permanecem desconhecidas (SWEENEY *et al.*, 1997). Curiosamente, para que se produza a sincronização do “relógio” endógeno não é necessário que os animais sejam sujeitos à totalidade do ciclo anual de alteração do período diário de luz (WOODFILL *et al.*, 1994, SWEENEY *et al.*, 1997, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Na verdade, algumas porções deste ciclo parecem ser mais importantes do que outras na consecução desse objectivo (THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Nos ovinos, a sincronização dos ritmos circadianos é feita de uma forma mais eficaz quando os animais

são submetidos à evolução do fotoperíodo que se produz naturalmente entre o solstício de Verão e o equinócio do Outono (WOODFILL *et al.*, 1994). Porém, nestes mesmos animais, os “dias longos” parecem desempenhar um papel fundamental no controlo da génese dos ritmos circadianos e circanuais (GODDARD, 1991, MATTHEWS e GUERIN, 1995, CHEMINEAU *et al.*, 1996, KLEIN *et al.*, 1997, GUERIN e MATTHEWS, 1998, SKINNER e MALPAUX, 1999 e ROSA e BRYANT, 2003). Neste sentido, THIÉRY *et al.* (2002) e ROSA e BRYANT (2003) afirmam que o arranque de uma nova estação reprodutiva depende tanto do fotoperíodo “crescente” observado no Inverno-Primavera, como do fotoperíodo “decrecente” registado no final do Verão e no Outono.

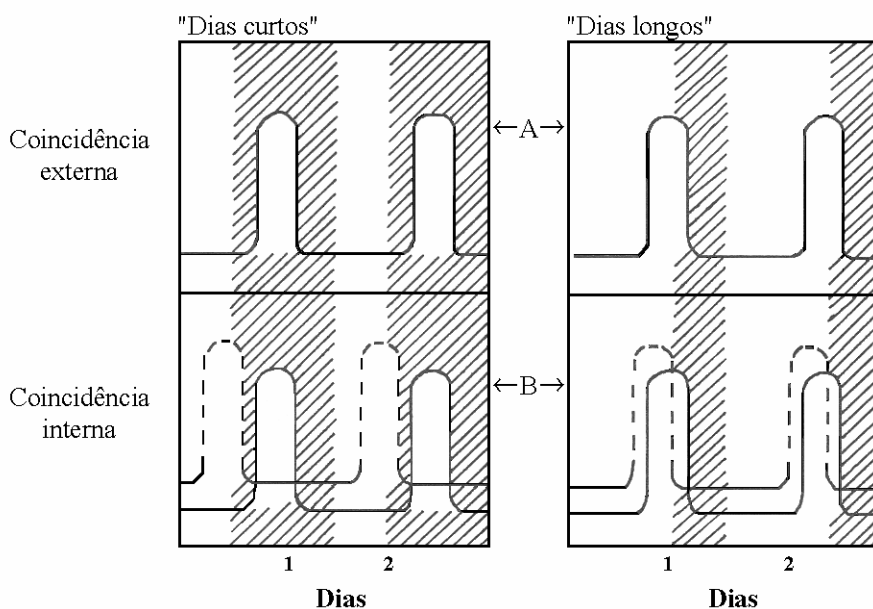


FIGURA 12 – Modelos dos mecanismos envolvidos na medição do tempo fotoperiódico de animais de “dias longos”. No modelo de coincidência externa (A), a luz coincide com a fase foto-indutível (ϕ_i), originando uma resposta fotoperiódica típica dos “dias longos”. No modelo de coincidência interna (B), a estimulação fotoperiódica normal dos “dias longos” ocorre devido a modificações da relação de fase (que se torna assim coincidente) entre dois osciladores circadianos. A falta de estimulação sob um fotoperíodo de “dias curtos” resulta da não coincidência da luz com a ϕ_i (modelo de coincidência externo) ou de uma diferente relação entre dois ou mais osciladores circadianos (modelo de coincidência interna) (KUMAR e FOLLETT, 1993).

3.4 – ESTADOS REFRACTÁRIOS

Sob condições naturais, a duração do período diário de luz varia de uma forma sinusoidal ao longo do ano, ocorrendo a mesma duração do período diário de luz duas vezes por ano (ROBINSON e KARSCH, 1987, SWEENEY *et al.*, 1997, ALILA-JOHANSSON *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003). Desta forma, era de esperar que a época de reprodução se estendesse simetricamente entre os solstícios, o que normalmente não acontece (ROBINSON e KARSCH, 1987, MATTHEWS *et al.*, 1993 e ROSA e BRYANT, 2003). Muitas raças de ovinos, reprodutivamente estimuladas numa determinada época do ano, são inibidas na outra em que o fotoperíodo é exactamente o mesmo (KENNAWAY e HUGEL, 1992, CORREIA, 1996 e ROSA e BRYANT, 2003). Assim, a resposta dos mamíferos ao fotoperíodo não se baseia apenas na duração do período diário de luz, mas depende também da existência de um “relógio” circanual ou da “memorização” da história fotoperiódica dos animais (SEAMARK *et al.*, 1981, ALILA-JOHANSSON *et al.*, 2001, GOLDMAN, 2001, HASTINGS e FOLLETT, 2001 e MALPAUX *et al.*, 2001). De acordo com LINDSAY *et al.* (1984), as variações sazonais da actividade reprodutora são máximas nos equinócios e mínimas nos solstícios. De um modo geral, um maior contraste entre as fases luminosa e escura do dia leva a que os animais fiquem sujeitos a uma menor variação da relação luz/escuridão (LINDSAY *et al.*, 1984). Nas ovelhas, o estabelecimento do anestro sazonal é proporcional ao incremento da relação luz/escuridão (PELLETIER, 1986). Pelo contrário, um menor incremento desta relação traduz-se normalmente num retorno à actividade reprodutora (PELLETIER, 1986).

A transição entre as épocas reprodutiva e de anestro e vice-versa resulta da acção de fenómenos inibidores e estimuladores (MALPAUX *et al.*, 1989), com um claro predomínio dos primeiros (THIÉRY *et al.*, 1995). Quando um animal deixa de responder ao fotoperíodo anterior, diz-se que se tornou fotorrefractário (WILLIAMS e HELLIWELL, 1983, KHALID e JACKSON, 1991, TUREK e VAN CAUTER, 1994, CHEMINEAU *et al.*, 1996, GOLDMAN, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003). Este estado não surge devido à alteração da secreção circadiana de melatonina (MALPAUX *et al.*, 1988), nem resulta da instalação de uma falta de sensibilidade dos animais face à acção da melatonina (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993). De acordo com FOLCH (1993), GOLDMAN (2001) e ROSA e BRYANT (2003) o início da estação de anestro, no fim do Inverno-início da Primavera, não ocorre em resposta à chegada dos “dias longos”, mas sim porque os ovinos se tornam insensíveis à estimulação dos “dias curtos”.

Do mesmo modo, os ovinos iniciam a sua actividade éstrica no fim do Verão-início do Outono, não por causa do começo dos “dias curtos”, mas porque deixam de responder ao efeito inibidor dos “dias longos” (FOLCH, 1993, THATCHER e HANSEN, 1993, CORREIA, 1996, NELSON e DEMAS, 1997 e GOLDMAN, 2001).

Segundo WILLIAMS e HELLIWELL (1993), a magnitude da resposta neuroendócrina reprodutiva das ovelhas depende de um sinal fotoperiódico considerado estranho. Para ROBINSON e KARSCH (1987), MALPAUX *et al.* (1989), WEHR (1997) e GERLACH e AURICH (2000), as ovelhas são reprodutivamente sensíveis à mudança de direcção do fotoperíodo e à consequente alteração da secreção de melatonina. Ovinos mantidos permanentemente sob um regime de “dias longos”, após algum tempo tornam-se reprodutivamente activos (MALPAUX *et al.*, 1988, MALPAUX *et al.*, 1989, MATTHEWS *et al.*, 1993, THATCHER e HANSEN, 1993, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, CHEMINEAU *et al.*, 1996, WEHR, 1997, GOLDMAN, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003), enquanto que ovinos submetidos permanentemente a um regime de “dias curtos”, depois de algum tempo tornam-se reprodutivamente inactivos (MALPAUX *et al.*, 1988, MATTHEWS *et al.*, 1993, THATCHER e HANSEN, 1993, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, LINCOLN e CLARKE, 1997, WEHR, 1997, GOLDMAN, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003). Neste caso, uma forma de ultrapassar o estado fotorrefractário passa pela aplicação de uma diminuição ainda mais acentuada do período diário de luz (dias ainda mais “curtos”) (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993 e ROSA e BRYANT, 2003).

Sob condições naturais, os ovinos são expostos a um aumento da duração do período diário de luz entre o solstício de Inverno e o solstício de Verão, ou seja, ao longo dos meses de Inverno e de Primavera. Este aumento natural do fotoperíodo é responsável pelo facto do ritmo circanual endógeno dos ovinos ter uma duração próxima dos 365 dias (MALPAUX *et al.*, 2001). Na verdade, os “dias longos” cumprem as importantes funções de inibir a ciclicidade reprodutiva das ovelhas e de ressensibilizar o seu sistema neuroendócrino relativamente aos “dias curtos” do Outono (KHALID e JACKSON, 1991, MATTHEWS *et al.*, 1993, MATTHEWS e GUERIN, 1995, CHEMINEAU *et al.*, 1996, GUERIN e MATTHEWS, 1998, GOLDMAN, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). O trabalho de SWEENEY *et al.* (1997) mostrou que estas duas funções não são simultâneas, ou seja, primeiro os “dias longos” têm de “desligar” a actividade reprodutora, para depois o

sistema nervoso se tornar novamente sensível ao sinal estimulante dos “dias curtos”. De acordo com KHALID e JACKSON (1991), esta ressensibilização pode também ser definida como um quebrar do estado refractário, devido a uma diminuição gradual do período diário de luz ou a uma transição abrupta de “dias longos” para “dias curtos”. Contudo, a estação reprodutiva das ovelhas mantidas em salas com controlo de luz, sob um regime luminoso constante, é consideravelmente inferior à de ovelhas exploradas sob condições de fotoperíodo naturais (variações diárias) – 2 a 3 meses vs. 5 a 6 meses (MALPAUX *et al.*, 1988). MALPAUX *et al.* (1988) pensam que o decréscimo progressivo da duração do período diário de luz constitui um sinal indutor da actividade reprodutora mais potente do que o decréscimo abrupto desta mesma duração, seguido de um fotoperíodo constante. Os resultados alcançados por MALPAUX *et al.* (1989) apontam no mesmo sentido. Assim, a diminuição outonal da duração do período diário de luz resulta num atraso do desenvolvimento do estado refractário (MALPAUX *et al.*, 1988), o que permite a manutenção de uma estação reprodutiva de duração normal (MALPAUX *et al.*, 1989).

Segundo alguns estudos, realizados com ovelhas das raças Dorset, Rambouillet e Rambouillet x Dorset, parte da variação racial da sazonalidade reprodutiva reside no grau do estado refractário existente no fim da estação reprodutiva (CORREIA, 1996). Nesta altura, o grau do estado refractário ao fotoperíodo anterior é elevado nas ovelhas Suffolk e reduzido nas ovelhas Dorset Horn (CORREIA, 1996). Assim, é possível que os animais de algumas raças ou cruzamentos continuem reprodutivamente receptivos, quando expostos a períodos prolongados e constantes de “dias curtos” (CORREIA, 1996). Mais, é de considerar a hipótese destas ovelhas não se tornarem nunca refractárias, mesmo que se prolongasse ainda mais o regime de “dias curtos” (CORREIA, 1996). Desta forma, há que admitir a hipótese de, em raças com uma sazonalidade pouco marcada, o estado refractário não ter qualquer significado biológico.

A eficácia da exposição aos “dias longos”, com o intuito de poder ressensibilizar o sistema endócrino face ao efeito indutivo dos “dias curtos” (MALPAUX *et al.*, 1989, KHALID e JACKSON, 1991, MATTHEWS *et al.*, 1993, CHEMINEAU *et al.*, 1996, SWEENEY *et al.*, 1997, WEHR, 1997 e GUERIN e MATTHEWS *et al.*, 1998) ou da melatonina (WEHR, 1997), depende da altura do ano em que esta é realizada. Assim, por exemplo, no estudo levado a cabo por SWEENEY *et al.* (1997) verificou-se que, entre o equinócio de Outono e o solstício

de Inverno, o eixo neuroendócrino das ovelhas da raça Galway é insensível à aplicação deste regime luminoso. Por outro lado, os resultados registados noutros estudos indicam que o efeito inibidor dos “dias longos” sobre a actividade reprodutora (SWEENEY *et al.*, 1997 e THIÉRY *et al.*, 2002) depende do tipo e da duração do regime luminoso a que os ovinos estiveram previamente sujeitos (KHALID e JACKSON, 1991, SWEENEY *et al.*, 1997 e MALPAUX *et al.*, 2001). No trabalho realizado por MALPAUX *et al.* (1989), estes autores observaram que a época reprodutiva das ovelhas Suffolk variou em função do momento em que se iniciou a sua exposição ao aumento do fotoperíodo – fim do Inverno *vs.* fim da Primavera.

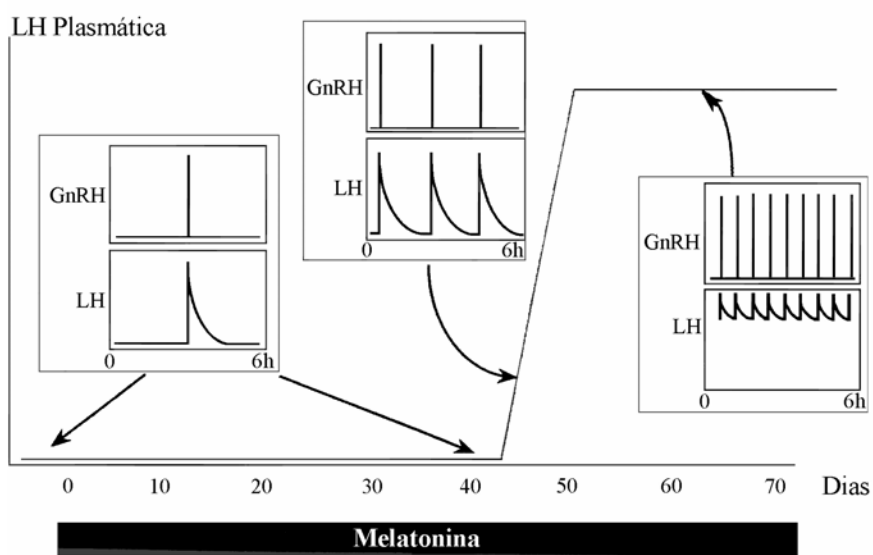


FIGURA 13 – Modificação da secreção pulsátil de LH determinada pela melatonina, em ovelhas da raça Ile-de-France. O tratamento de ovelhas ovariectomizadas, com implantes subcutâneos de estradiol e de melatonina, induz, após 40 a 60 dias, um aumento da frequência de libertação da GnRH e da LH e, consequentemente, dos níveis plasmáticos médios de LH (MALPAUX *et al.*, 1996b).

A elevação do fotoperíodo, no fim do Inverno, permitiu antecipar o início da época reprodutiva, enquanto que a elevação do fotoperíodo, no fim da Primavera, a atrasou (MALPAUX *et al.*, 1989). KHALID e JACKSON (1991), trabalhando com ovelhas Suffolk, procuraram determinar, um mês antes e aquando do solstício de Inverno, o número mínimo de dias de exposição a um regime luminoso de 16 horas de luz: 8 horas de escuridão

(16L:8E) necessário à ressensibilização do sistema endócrino, face ao efeito indutor dos “dias curtos”. Estes autores verificaram serem necessários, em ambas as situações, entre 30 a 60 dias (Figura 13). Resultado idêntico foi observado por VIGUIÉ *et al.* (1995). Outros autores afirmam serem necessários, independentemente da altura do ano, aproximadamente 150 dias, depois de uma transição de fotoperíodo, para que se possa expressar o estado refractário ao novo regime luminoso (CORREIA, 1996). Segundo MATTHEWS *et al.* (1993), a administração de melatonina exógena só consegue interromper o anestro sazonal se for feita 2 a 4 semanas antes do fim natural da estação de anestro. Ao que tudo indica, os animais têm a capacidade de memorizar os sinais anteriores da melatonina (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993).

Pelo que foi anteriormente referido, os ovinos tendem a oscilar entre a estação reprodutiva e a estação de anestro, de uma forma que depende, efectivamente, do ritmo reprodutivo endógeno (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993). Este ritmo pode ser modulado, mas nunca ultrapassado, pela melatonina (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993).

3.5 – FORMAS DE ACÇÃO DA MELATONINA

Embora a melatonina possa actuar a vários níveis do eixo reprodutivo, a sua acção envolve, fundamentalmente, eventos que ocorrem dentro do CNS (Figura 14) (CHEMINEAU *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996a,b, MALPAUX *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003). A principal acção da melatonina é modificar a frequência de libertação da GnRH (HANSEN, 1985, ROBINSON *et al.*, 1986, ORTAVANT *et al.*, 1988, LOPEZ SEBASTIAN, 1989, LINCOLN, 1992, MALPAUX *et al.*, 1996a,b, THIMONIER, 1996, LEHMAN *et al.*, 1997, BERGSTROM e HAKANSON, 1998, MALPAUX *et al.*, 1998, ROSS *et al.*, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, MALPAUX *et al.*, 2001, ROMANOWICZ *et al.*, 2001, FORCADA *et al.*, 2002, MISZTAL *et al.*, 2002 e TRICOIRE *et al.*, 2003), a qual, por seu turno, altera a frequência de libertação da LH (FOLCH, 1983, HANSEN, 1985, LINCOLN, 1992, MALPAUX *et al.*, 1996a,b, LEHMAN *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1998, ROSS *et al.*, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, MALPAUX *et al.*, 2001, ROMANOWICZ *et al.*, 2001, FORCADA *et al.*, 2002, MISZTAL *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002) e da FSH (FOLCH, 1983, HANSEN, 1985, LINCOLN, 1992, LEHMAN *et al.*, 1997 e ROSS *et al.*, 1998) e a actividade das gónadas (THATCHER e HANSEN, 1993 e MALPAUX *et al.*, 1996b).

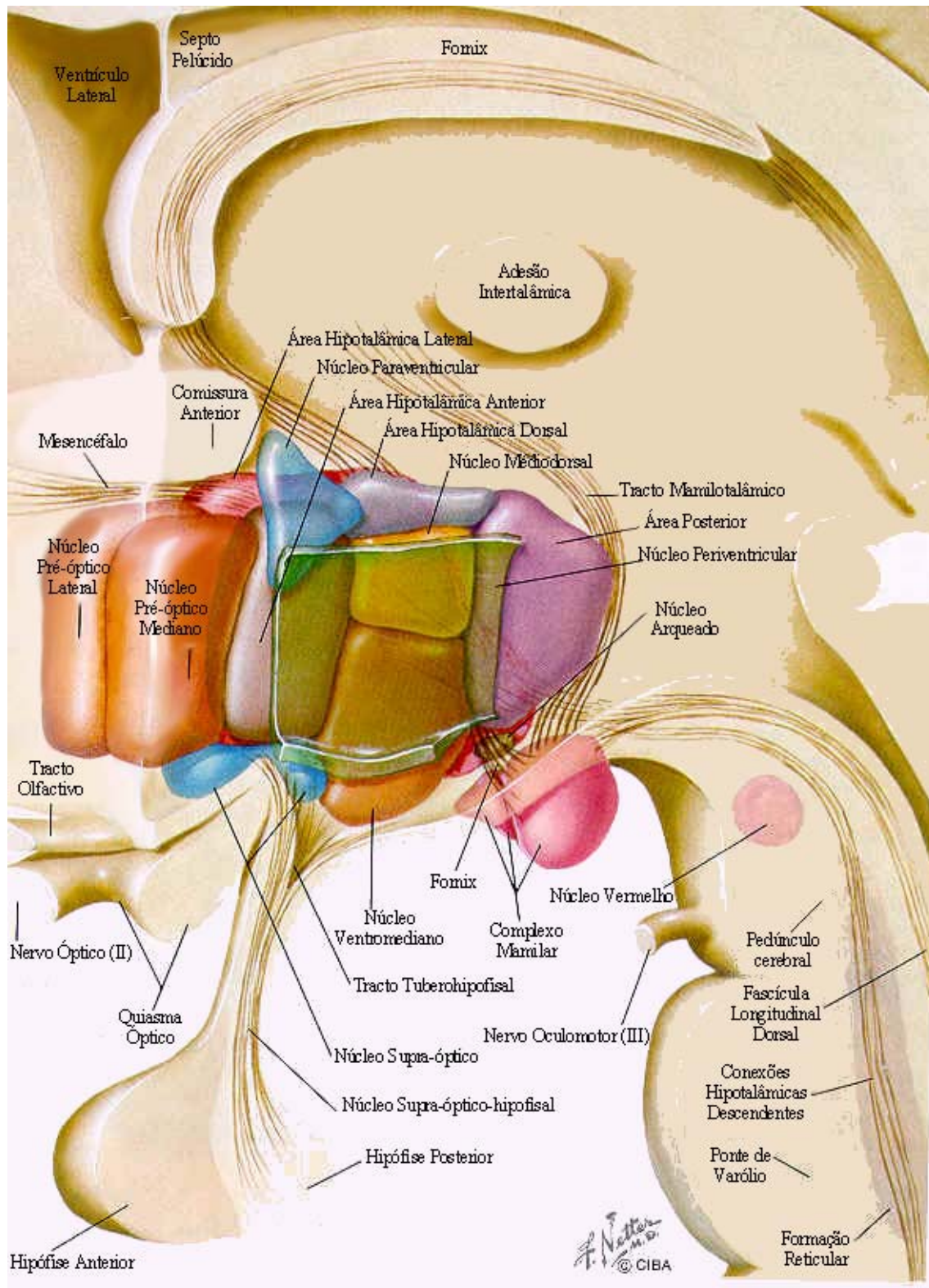


FIGURA 14 – Esquema representativo do hipotálamo e de algumas estruturas adjacentes (NETTER, 2002).

A melatonina controla a secreção pulsátil de GnRH e de LH (GnRH/LH) através de dois mecanismos complementares: modulação directa (esteróide-independente) da secreção de GnRH (BECCA VIN *et al.*, 1998, HILEMAN *et al.*, 1998, MALPAUX *et al.*, 2001, ANDERSON *et al.*, 2003 e ROSA e BRYANT, 2003) e alteração da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário face à retroacção negativa exercida pelos esteróides sexuais (Figura 15) (BITTMAN *et al.*, 1985, HANSEN, 1985, LOPEZ SEBASTIAN, 1989, WEBSTER *et al.*, 1991, FOLCH, 1993, KARSCH *et al.*, 1993, O'CALLAGHAN *et al.*, 1993, THATCHER e HANSEN, 1993, TUREK e VAN CAUTER, 1994, KARSCH *et al.*, 1995, THIÉRY *et al.*, 1995, LEHMAN *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1997, XIONG *et al.*, 1997, BECCA VIN *et al.*, 1998, HILEMAN *et al.*, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, MALPAUX *et al.*, 2001, FORCADA *et al.*, 2002, GOODMAN *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). GERLACH e AURICH (2000), afirmam que a FSH não desempenha um papel significativo no controlo da sazonalidade reprodutiva.

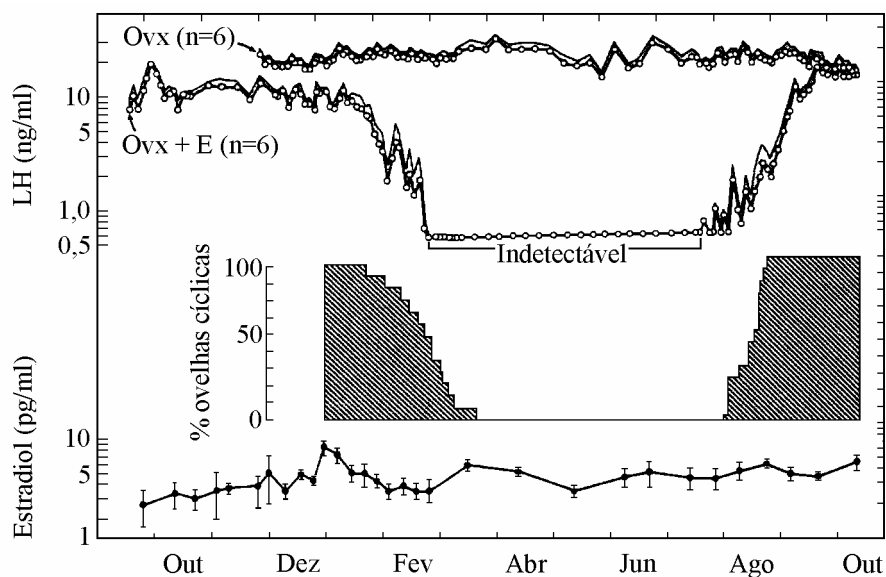


FIGURA 15 – Modificação sazonal da secreção de LH face à retroacção negativa exercida pelo estradiol. Os níveis séricos de LH são apresentados ao longo de um ano, em ovelhas ovariectomizadas com (Ovx+E) ou sem (Ovx) implantes de estradiol (n = 6/grupo). Os níveis séricos de estradiol das ovelhas OvX+E são também apresentados. No histograma estão ainda representadas as estações reprodutiva e de anestro de um outro grupo de 14 ovelhas inteiras, mantidas sob condições fotoperiódicas naturais. Notar as escalas logarítmicas das concentrações hormonais (Redrawn e Legan, 1977; citados por KARSCH *et al.*, 1980).

Durante a estação reprodutiva, tanto nas ovelhas como nos carneiros inteiros (MISZTAL *et al.*, 2002), a secreção pulsátil de LH produz-se segundo um ritmo nictemérico bem definido (ROBINSON *et al.*, 1986, NONNO *et al.*, 1995 e MALPAUX *et al.*, 1996b) e em que o seu ponto máximo coincide com a fase inicial do período nocturno. Sob um regime luminoso de “dias longos”, as ovelhas ovariectomizadas, tratadas com estradiol, produzem, em média, apenas um pulso de GnRH e de LH cada 6 horas (MALPAUX *et al.*, 1996a). Pelo contrário, estas mesmas ovelhas, quando tratadas com um implante subcutâneo de melatonina, produzem, em média, 10 pulsos de GnRH e de LH cada 6 horas (MALPAUX *et al.*, 1996a). Contudo, esta alteração da secreção pulsátil de LH só ocorre 40 a 60 dias após a colocação dos referidos implantes de melatonina (MALPAUX *et al.*, 1996a, MALPAUX *et al.*, 2001, FORCADA *et al.*, 2002, MISZTAL *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). MALPAUX *et al.* (1996b), MALPAUX *et al.* (1997), MALPAUX *et al.* (1998), MALPAUX *et al.* (2001) e ROSA e BRYANT (2003) chamam a atenção para o facto deste intervalo de 40 a 60 dias ser o mesmo que se verifica entre o começo de um tratamento luminoso de “dias curtos” e a elevação da secreção de LH ou a ovulação o que, de acordo com estes autores, demonstra que os mecanismos responsáveis por este período de latência são essencialmente de origem nervosa.

A variação sazonal da actividade das gónadas é, fundamentalmente, uma consequência da alteração sazonal da frequência de libertação de GnRH/LH (HANSEN, 1985, LINCOLN, 1992, MALPAUX *et al.*, 1996a,b, LEHMAN *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1998, ROSS *et al.*, 1998, GERLACH e AURICH, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003). Durante a estação reprodutiva, a frequência de libertação de GnRH é elevada (ROSA e BRYANT, 2003). Pelo contrário, durante o período de anestro, a frequência de libertação de GnRH é reduzida (ROSA e BRYANT, 2003). Nesta altura, a intensa retroacção negativa que os esteróides sexuais exercem sobre a secreção de LH processa-se, essencialmente, através da inibição da secreção pulsátil de GnRH e não da redução acentuada da capacidade de resposta da hipófise, face à acção estimuladora desta gonadoliberina (ROSA e BRYANT, 2003). Nos carneiros, a testosterona, através dos seus principais metabolitos – estradiol e 5 α -dihidrotestosterona –, inibe a secreção pulsátil de LH (TILBROOK e CLARKE, 1995, HILEMAN *et al.*, 1998, HILEMAN e JACKSON, 1999 e O'DONNELL *et al.*, 2001). Este efeito resulta, fundamentalmente, mas não totalmente, de uma inibição da frequência de libertação da GnRH (TILBROOK e CLARKE, 1995, HILEMAN *et al.*, 1998, HILEMAN e JACKSON, 1999 e GERLACH e AURICH, 2000).

Nas ovelhas, o estradiol e a progesterona são os principais esteróides sexuais envolvidos no controlo da secreção de GnRH (LEHMAN *et al.*, 1997, BICKNELL, 1999 e NETT *et al.*, 2002). Enquanto que, no período de anestro sazonal, uma concentração fisiológica de estradiol pode desencadear uma poderosa retroacção negativa sobre a secreção de GnRH/LH (BITTMAN *et al.*, 1985, KARSCH *et al.*, 1993, KARSCH *et al.* 1995, TILBROOK e CLARKE, 1995, LEHMAN *et al.*, 1996, KRIDLI e HALLFORD, 1997, LEHMAN *et al.*, 1997, FORCADA *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003), esta mesma concentração de estradiol, em plena época reprodutiva, produz uma retroacção negativa muito menos eficaz (Figura 16) (BITTMAN *et al.*, 1985, KARSCH *et al.*, 1993, KARSCH *et al.* 1995, TILBROOK e CLARKE, 1995, LEHMAN *et al.*, 1996, LEHMAN *et al.*, 1997, PARVIZI, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003). No primeiro caso, devido à profunda inibição dos pulsos de GnRH/LH, a elevação sustentada do estradiol é bloqueada e o pulso pré-ovulatório de GnRH não se produz (LEHMAN *et al.*, 1997, PARVIZI, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003). É interessante notar que, enquanto que a secreção pulsátil de GnRH está sob controlo sazonal, o “pulso de GnRH”, responsável pela ovulação (retroacção positiva), não varia em função da estação do ano (LEHMAN *et al.*, 1997, FUENTES *et al.*, 2001 e NETT *et al.*, 2002).

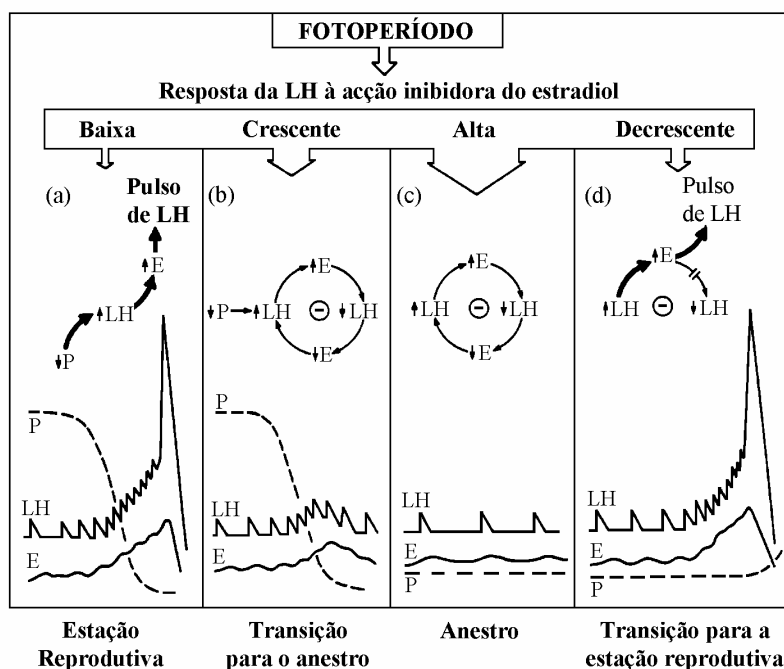


FIGURA 16 – Esquema hipotético de controlo da sazonalidade reprodutiva nas ovelhas (KARSCH *et al.*, 1980).

De acordo com HANSEN (1985), a melatonina consegue modificar o padrão de secreção das gonadotropinas, inclusivamente em carneiros castrados. Na verdade, a transferência de carneiros castrados de um regime luminoso de 8L:16E para um regime luminoso de 16L:8E resulta num declínio das concentrações circulantes de gonadotropinas (HANSEN, 1985 e WEBSTER *et al.*, 1991). Uma transferência inversa traduz-se num aumento das concentrações circulantes de gonadotropinas (HANSEN, 1985). Resultados como estes constituem uma prova clara de que a sazonalidade reprodutiva depende igualmente de mecanismos esteróide-independentes (HANSEN, 1985).

3.5.1 – VIA ESTROGÉNIOS

Na última década, muitos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de identificar, a nível do CNS, os locais através dos quais os estrogénios inibem a secreção de gonadotropinas, particularmente durante o período de anestro sazonal (THIÉRY *et al.*, 2002). É cada vez mais evidente o papel multifacetado que estas hormonas exercem sobre o CNS dos mamíferos (KELLY *et al.*, 2002). Os estrogénios, para além de modificarem a resposta sináptica, através de mecanismos genómicos, tornam também mais rápida a comunicação entre células (KELLY *et al.*, 2002). Estas modificações sinápticas (pré e pós-sinápticas) resultam da alteração da sensibilidade das células nervosas face à activação dos vários sistemas receptores (proteína G dependentes e ionotrópicos), promovida pelos respectivos mensageiros primários (KELLY *et al.*, 2002). Por exemplo, os estrogénios podem alterar a capacidade de ligação de sistemas receptores proteína G dependentes, como sejam os opioidérgicos (μ e κ), o GABAérgico e o dopaminérgico, relativamente aos seus agentes efectores (KELLY *et al.*, 2002). Por outro lado, os estrogénios podem modular a resposta das células nervosas relativamente à activação ionofórica do receptor do glutamato (N-metil-D-aspartato – NMDA – ou não-NMDA) (KELLY *et al.*, 2002). Nos seres humanos, KELLY *et al.* (2002) acreditam mesmo que estes esteróides funcionam como um mensageiro primário, pois activam um receptor estrogénico que se liga directamente a canais de K^+ e de Ca^{2+} , sob a acção de uma proteína G sensível à toxina perussis. A capacidade de coordenar estas diferentes vias de sinalização, dá aos estrogénios a possibilidade de controlar processos fisiológicos tão complexos como a actividade reprodutora, o controlo motor e a memória (KELLY *et al.*, 2002).

Até à data, foram identificados dois tipos de receptores estrogénicos citosólicos – $ER\alpha$ e $ER\beta$ (THIÉRY *et al.*, 2002). Neurónios contendo receptores $ER\alpha$ podem ser encontra-

dos na POA, na área hipotalâmica anterior (AHA), em *septum* ventrolateral, no núcleo basal de *stria terminalis*, no PVN e no núcleo supra-óptico (SON) (SCOTT *et al.*, 2000). Segundo HILEMAN *et al.* (1999), a distribuição cerebral dos receptores estrogénicos ER β é semelhante à dos ER α . Contudo, SCOTT *et al.* (2000) afirmam existir igualmente receptores estrogénicos ER β nos núcleos ventromediano e arqueado, ainda que em número muito reduzido. Desde a sua identificação até muito recentemente, acreditava-se que os neurónios GnRH eram desprovidos de receptores estrogénicos (THIÉRY *et al.*, 2002). Contudo, a recente identificação, em ratos e ratazanas, de receptores do tipo ER β em neurónios hipotalâmicos de GnRH (THIÉRY *et al.*, 2002), abre a possibilidade dos estrogénios exercerem, pelo menos nestes animais, uma acção directa, positiva ou negativa, sobre a secreção de GnRH (THIÉRY *et al.*, 2002). Nas cobaias, a aplicação local de estradiol, sobre os neurónios GnRH, parece igualmente ser capaz de directa, não genomicamente, alterar a actividade eléctrica destes neurónios, constituindo uma via provável de acção da retroacção negativa (THIÉRY *et al.*, 2002). Pelo contrário, nos ovinos, a ausência de colocalização dos dois tipos de receptores estrogénicos nos neurónios GnRH, tanto nas ovelhas como nos carneiros, assim como a escassez de estudos electrofisiológicos realizados nesta espécie não permitem, presentemente, ter em conta esta via (HILEMAN e JACKSON, 1999, ROBINSON *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002).

Nas ovelhas, assim como nas fêmeas de muitos outros mamíferos, a principal acção dos estrogénios sobre os neurónios produtores de GnRH parece ser indirecta, uma vez que a esmagadora maioria deles não possui receptores para estas hormonas (TILBROOK e CLARKE, 1995, LEHMAN *et al.*, 1997, XIONG *et al.*, 1997, BECCA VIN *et al.*, 1998, HILEMAN *et al.*, 1998, CLARKE *et al.*, 1999, BICKNELL, 1999, HILEMAN e JACKSON, 1999, SCOTT *et al.*, 1999, ROBINSON *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Desta forma, para que os neurónios com receptores estrogénicos possam regular a secreção de GnRH, eles têm de emitir projecções até aos neurónios GnRH ou até regiões fortemente implicadas na regulação da secreção desta hormona (TILBROOK e CLARKE, 1995, HILEMAN *et al.*, 1998, CLARKE *et al.*, 1999, SCOTT *et al.*, 1999, SCOTT *et al.*, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003), tal como a área pré-óptica mediana (MPOA) (MCCANN *et al.*, 1998, SCOTT *et al.*, 1999 e SCOTT *et al.*, 2000). Nos ovinos, as células nervosas com receptores ER α , que se projectam até à MPOA, têm origem na POA, em *septum* lateral, no núcleo arqueado, no núcleo ventromediano caudal e na medula ventrolateral do tronco cerebral (SCOTT *et al.*, 2000). Porém, permanece por esclarecer se estes neurónios contactam sinapticamente ou não com os neurónios GnRH

(SCOTT *et al.*, 2000). Por outro lado, é igualmente possível que os estrogénios influenciem a secreção de GnRH através de neurónios que activam e que emitem projecções para dentro da zona neurosecretora da eminência mediana (EM) (Figura 17) (SCOTT *et al.*, 2000). Na verdade, vários grupos de neurónios catecolaminérgicos possuem receptores estrogénicos (BECCA VIN *et al.*, 1998). Assim, por exemplo, cerca de 3-15% dos neurónios dopaminérgicos presentes no núcleo arqueado (A12) possuem receptores estrogénicos (BECCA VIN *et al.*, 1998).

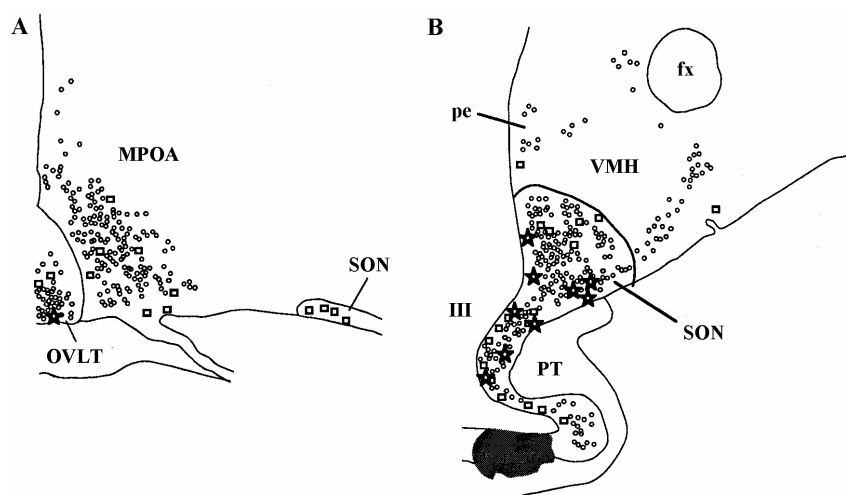


FIGURA 17 – Distribuição das células nervosas com receptores de estrogénios, que emitem projecções para a EM dos ovinos. (A) Desenho feito a nível da área pré-óptica mediana (MPOA) e (B) desenho feito a nível do hipotálamo médio basal (MBH). Nestes esquemas está representada a distribuição dos receptores de estrogénios imunorreactivos (ER-IR, círculos), toxina colérica-imunorreactivos (CT-IR, quadrados) e mistos (estrelas), identificados após injeção de um marcador retrógrado, a subunidade β da toxina da colera, na EM. Cada círculo representa quatro núcleos de ER-IR, com excepção dos desenhados no *organum vasculosum de lamina terminalis*, onde cada círculo representa apenas um ER-IR (SON – núcleo supra-óptico, pe – hipotálamo periventricular, fx – fornix, VMH – núcleo hipotalâmico ventro-mediano, Arc – núcleo arqueado, III – terceiro ventrículo, PT – *pars tuberalis*) (LEHMAN *et al.*, 1997).

Os núcleos hipotalâmicos A14 (MALPAUX *et al.*, 1997) e A15 (MALPAUX *et al.*, 1997, BECCA VIN *et al.*, 1998 e GOODMAN *et al.*, 2002) estão envolvidos na modulação da retroacção negativa que os estrogénios exercem sobre a secreção de GnRH, particularmente durante o período de anestro sazonal. Nas ovelhas em anestro sazonal ou sujeitas a um regime

luminoso de “dias longos”, a utilização de implantes intracranianos de estradiol permite, agindo directamente sobre a área retroquiasmática lateral, mais especificamente a nível do núcleo A15, inibir a secreção pulsátil da LH (BECCA VIN *et al.*, 1998 e THIÉRY *et al.*, 2002). Nestas fêmeas, tanto os implantes intracranianos como os subcutâneos de estradiol, tardam 18-20 horas a inibir a secreção pulsátil de LH (THIÉRY *et al.*, 2002), enquanto que a modificação da actividade eléctrica do núcleo A15 é induzida em apenas 3-4 horas (THIÉRY *et al.*, 2002). Curiosamente, o núcleo A15 das ovelhas possui mais receptores ER β do que o dos carneiros (SCOTT *et al.*, 2000). Porém, uma vez que vários estudos imunoquímicos de identificação não conseguiram detectar receptores estrogénicos nos neurónios GnRH presentes no núcleo A15 (THIÉRY *et al.*, 2002), a acção directa do estradiol sobre estes neurónios deve, pelo menos por agora, ser descartada (BECCA VIN *et al.*, 1998, GOODMAN *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002).

Nos ovinos, a potente retroacção negativa que os estrogénios exercem sobre os neurónios GnRH parece ser basicamente canalizada por vias aferentes (LEHMAN *et al.*, 1997, XIONG *et al.*, 1997, BECCA VIN *et al.*, 1998, MCCANN *et al.*, 1998, BICKNELL, 1999, HILEMAN e JACKSON, 1999, SCOTT *et al.*, 1999, GAZAL *et al.*, 2002, ROBINSON *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Na verdade, os neurónios GnRH destes animais recebem uma impressionante variedade de sinais neuroquímicos (LEHMAN *et al.*, 1997, BICKNELL, 1999, GAZAL *et al.*, 2002, KELLY *et al.*, 2002 e ROBINSON *et al.*, 2002), que incluem o neuropeptídeo Y (NPY) (MALVEN *et al.*, 1995, LEHMAN *et al.*, 1997, SCOTT *et al.*, 1999, SIMONNEAUX *et al.*, 1999, THOMAS *et al.*, 1999 e PARVIZI, 2000), o GABA (LEHMAN *et al.*, 1997, HILEMAN e JACKSON, 1999, SCOTT *et al.*, 1999, PARVIZI, 2000, KELLY *et al.*, 2002 e MIK-LÓS e KOVÁCS, 2002) e substâncias contendo terminais P (MALVEN *et al.*, 1995 e LEHMAN *et al.*, 1997). Por outro lado, os neurónios GnRH dos ovinos contactam intimamente com fibras catecolaminérgicas e β -endorfinérgicas (LEHMAN *et al.*, 1997, BECCA VIN *et al.*, 1998, HILEMAN e JACKSON, 1999, SCOTT *et al.*, 1999 e KELLY *et al.*, 2002). Sabe-se ainda que os neurónios GnRH presentes na EM contactam, axo-axonicamente, com neurónios dopaminérgicos (LEHMAN *et al.*, 1997 e DODGE e BADURA, 2002). GOODMAN *et al.* (2002) acreditam que, durante o período de anestro sazonal, o circuito neuronal que medeia a acção dos estrogénios sobre a secreção de GnRH passa: 1) pela estimulação do parênquima dos neurónios com receptores estrogénicos presentes nas áreas hipotalâmicas pré-óptica ventrome-

diana e retroquiasmática, 2) através das projecções que estes neurónios emitem até ao núcleo hipotalâmico A15, pela estimulação dos neurónios dopaminérgicos presentes no núcleo A15 e 3) pela inibição local da actividade secretora de GnRH dos neurónios.

Dentro do CNS, o processo de sinalização sináptico, promovido pelos neurotransmissores aminérgicos, termina com a sua recaptura (*re-uptake*) por parte do neurónio pré-sináptico (FIGLEWICZ, 1999 e POTHOS, 2002). Esta recaptura é feita por moléculas específicas de transporte de elevada afinidade, que se localizam, predominantemente, na membrana sináptica (FIGLEWICZ, 1999). Existem vários trabalhos que indicam que os esteróides sexuais modulam a acção das proteínas de transporte da NOR, da 5-HT e da dopamina (DA) (FIGLEWICZ, 1999 e KELLY *et al.*, 2002). Assim, por exemplo, o estradiol parece ter um efeito agudo, não genómico, sobre a elevação dos níveis extracelulares de DA, de uma forma consentânea com o estímulo negativo que ele mesmo exerce sobre a recaptura desta catecolamina (FIGLEWICZ, 1999).

3.5.2 – VIA PROGESTERONA

Nas fêmeas, a progesterona exerce um papel chave na regulação da secreção pulsátil de GnRH/LH. A progesterona reduz a frequência de libertação da GnRH e pode mesmo bloquear o pulso pré-ovulatório de GnRH/LH (NETT *et al.*, 2002 e ROBINSON *et al.*, 2002). Nos animais domesticados, a localização cerebral dos receptores de progesterona permanece desconhecida (SCOTT *et al.*, 2000). Nos ovinos, alguns dados experimentais indicam que a progesterona condiciona os níveis circulantes do GABA, na POA, os níveis de DA, na área hipotalâmica médiobasal (MBH), e os de β -endorfina, no núcleo arqueado (SCOTT *et al.*, 2000).

3.5.3 – VIA PROLACTINA

Uma vez que os ovinos apresentam grandes variações sazonais na secreção de PRL (CURLEWIS e MCNEILLY, 1991, CURLEWIS, 1992, LINCOLN, 1994, CURLEWIS *et al.*, 1995, MALPAUX *et al.*, 1997, ROSS *et al.*, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, EL-ALAMY *et al.*, 2001, GREGORY *et al.*, 2000 e BARRETT *et al.*, 2002), vários autores equacionaram a hipótese desta hormona estar directamente envolvida no mecanismo da sazonalidade reprodutiva (ROSA e BRYANT, 2003). Na verdade, os níveis circulantes desta hormona elevam-se na

Primavera (CURLEWIS, 1992, GERLACH e AURICH, 2000 e LINCOLN *et al.*, 2002), atingem os seus valores máximos no início do Verão e os mínimos no início do Inverno (CURLEWIS e MCNEILLY, 1991, CURLEWIS, 1992, LINCOLN, 1992, CURLEWIS *et al.*, 1995, MALPAUX *et al.*, 1997, HARD *et al.*, 2001 e LINCOLN *et al.*, 2002) (Figura 18). Mais, este ciclo sazonal é predominantemente regulado pelo fotoperíodo (FOLCH, 1983, POULTON *et al.*, 1987, CURLEWIS e MCNEILLY, 1991, CURLEWIS, 1992, LINCOLN e BAKER, 1994, LINCOLN *et al.*, 1996, WILLIAMS *et al.*, 1997, O'CALLAGHAN *et al.*, 1999, SWEENEY *et al.*, 1999, GERLACH e AURICH, 2000, GREGORY *et al.*, 2000, HARD *et al.*, 2001 e LINCOLN *et al.*, 2002), via melatonina (CURLEWIS e MCNEILLY, 1991, CURLEWIS, 1992, LINCOLN e CLARKE, 1995, LINCOLN *et al.*, 1996, LINCOLN e CLARKE, 1997, SWEENEY *et al.*, 1999, GERLACH e AURICH, 2000 e LINCOLN *et al.*, 2002).

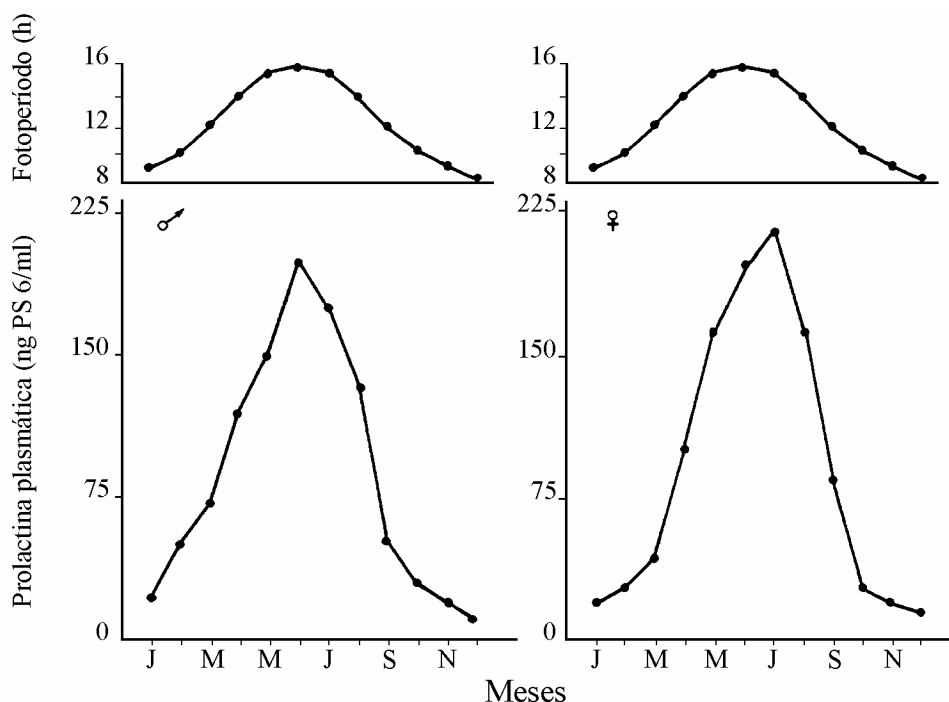


FIGURA 18 – Variação anual dos níveis plasmáticos de prolactina em carneiros e em ovelhas. Os níveis máximos desta hormona são sempre observados no “dia mais longo do ano” (adaptado de ORTAVANT *et al.*, 1985).

Sob um fotoperíodo “crescente”, os níveis circulantes de PRL elevam-se significativamente, enquanto que, sob um fotoperíodo “decrecente”, estes mesmos níveis hormonais diminuem acentuadamente (EL-ALAMY *et al.*, 2001). A administração exógena de melato-

nina determina, igualmente, um decréscimo das concentrações plasmáticas da PRL (POULTON *et al.*, 1987, ROBINSON *et al.*, 1991, LINCOLN e TORTONESE, 1999, GERLACH e AURICH, 2000 e EL-ALAMY *et al.*, 2001) e oblitera o ritmo circadiano de produção desta hormona (ROBINSON *et al.*, 1991). Contudo, POULTON *et al.* (1987), CURLEWIS e MCNEILLY (1991), CURLEWIS (1992), MALPAUX *et al.* (1997), WILLIAMS *et al.* (1997), LINCOLN (1998), LINCOLN (1999), LINCOLN e TORTONESE (1999), GREGORY *et al.* (2000), NOTTER e CHEMINEAU (2001) e THIERY *et al.* (2002) pensam que a variação sazonal da secreção de PRL não desempenha efectivamente um papel relevante na expressão da sazonalidade reprodutiva dos ovinos.

Nestes animais, ao contrário do que sucede com a secreção sazonal de gonadotropinas, a secreção sazonal de PRL não resulta de uma alteração da sensibilidade a um qualquer mecanismo de retroacção (CURLEWIS, 1992). Até há muito pouco tempo atrás, vários autores acreditavam que os efeitos do fotoperíodo sobre a secreção de PRL eram modelados a nível da MBH, embora nunca se tivesse descoberto a ligação entre esta área hipotalâmica e os lactótrofos (CURLEWIS *et al.*, 1995). Por seu turno, CURLEWIS (1992) e CURLEWIS *et al.* (1995) pensavam que, sob um regime luminoso de “dias longos”, a secreção de PRL era estimulada através das vias dopaminérgicas presentes na área hipotalâmica ventro-mediana (VMH). LINCOLN (1998) provou que a melatonina media os efeitos do fotoperíodo sobre a secreção sazonal de PRL, através da acção que exerce sobre *PT*. Segundo LINCOLN *et al.* (2002), o papel central de *PT* na regulação da secreção sazonal de PRL pode ser comprovado pelo facto da destruição da ligação hipotálamo-hipofisária não determinar o fim dos ciclos sazonais de secreção desta hormona e porque esta região da hipófise possui um número muito elevado de receptores membranares de melatonina.

A melatonina actua directamente sobre a hipófise (KENNAWAY e ROWE, 1995, LINCOLN e CLARKE, 1995, PANG, 1998, O'CALLAGHAN *et al.*, 1999, SWEENEY *et al.*, 1999, LINCOLN, 2000, LINCOLN e CLARKE, 2000b, GOLDMAN, 2001, HASTINGS e FOLLETT, 2001, HAZLERIGG *et al.*, 2001, BARRETT *et al.*, 2002 e LINCOLN *et al.*, 2002), através de um mecanismo dopamina-independente (KENNAWAY e ROWE, 1995, LINCOLN e CLARKE, 1995, LINCOLN, 1998 e GREGORY *et al.*, 2000). De acordo com BARRETT *et al.* (1999), HASTINGS e FOLLETT (2001), BARRETT *et al.* (2002), LINCOLN *et al.* (2002) e SIMONNEAUX e RIBELAYGA (2003), a melatonina parece controlar a secreção sazonal de PRL, através da acção inibidora que exerce sobre a via de tradução do sinal AMP_c. Em *PT* dos

ovinos, o principal efeito da aplicação de um tratamento agudo de melatonina consiste na inibição da enzima adenilciclase, a qual determina uma redução dos níveis intracelulares de AMP_c (HAZLERIGG *et al.*, 2001, BARRETT *et al.*, 2002, LINCOLN *et al.*, 2002 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Curiosamente, no final da aplicação de um tratamento crónico de melatonina, esta hormona acaba por estimular a via adenilciclásica (BARRETT *et al.*, 2002, LINCOLN *et al.*, 2002 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Recentemente, BARRETT *et al.* (2002) verificaram que o polipéptido activador da adenilciclase (PACAP, sintetizado no hipotálamo) está envolvido no mecanismo de controlo da secreção sazonal de PRL, ainda que, aparentemente, de uma forma indirecta. Ao que tudo indica, o PACAP induz algumas células da EM (as sensíveis à sua acção) a libertar uma substância (ainda desconhecida) que, a nível das células de *PT*, possuidoras de receptores membranares de melatonina, estimula a actividade AMP_cásica (BARRETT *et al.*, 2002). Consequentemente, estas células passam a segregar mais tuberalina (LINCOLN, 1998, PANG, 1998, LINCOLN, 1999, LINCOLN, 2000, PARVIZI, 2000, HAZLERIGG *et al.*, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001 e BARRETT *et al.*, 2002), o que acaba por estimular as células de *PD* a segregar maiores quantidades de PRL (HAZLERIGG *et al.*, 2001 e BARRETT *et al.*, 2002).

Nos ovinos, outro mecanismo, AMP_c-independente, parece mediar a acção da melatonina sobre as células de *PT* (HAZLERIGG *et al.*, 2001). Nestes animais, a melatonina eleva os níveis intracelulares do cálcio numa pequena proporção de células de *PT* (HAZLERIGG *et al.*, 2001). Segundo KENNAWAY e ROWE (1995) e HAZLERIGG *et al.* (2001), a acção dos receptores membranares de melatonina, localizados a nível da membrana plasmática de células de *PT*, depende do efeito regulador de proteínas G. Estas proteínas, quando na presença do cálcio, condicionam a actividade da enzima transglutaminase, a qual está envolvida no processo de libertação de neurotransmissores (KENNAWAY e ROWE, 1995).

3.5.4 – DISTRIBUIÇÃO DOS NEURÓNIOS GnRH

Tal como já foi anteriormente referido, a melatonina controla a actividade reprodutiva dos ovinos via GnRH/LH. Assim, antes de prosseguir, importa conhecer um pouco melhor a distribuição cerebral dos neurónios responsáveis pela secreção desta hormona.

Fenotipicamente, os neurónios da GnRH têm uma ontogenia notável (BICKNELL, 1999 e ROBINSON *et al.*, 2002). Durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário, as células precursoras destes neurónios diferenciam-se dentro do epitélio sensorial

olfactivo em desenvolvimento, antes de migrarem para o telencéfalo, em estreita associação com o nervo *terminalis* (envoltos pelas raízes do nervo *terminalis*), e se distribuírem pela região hipotalâmica septal (CALDANI *et al.*, 1995 e BICKNELL, 1999). Nos ovinos, esta jornada épica tem início no 30º dia de gestação (CALDANI *et al.*, 1995). Trinta dias mais tarde, as células precursoras dos neurónios GnRH alcançam o seu destino final (ROBINSON *et al.*, 2002). Por volta do 85º dia de gestação, formam-se os neurónios secretores de GnRH típicos dos animais adultos (ROBINSON *et al.*, 2002). Segundo ROBINSON *et al.* (2002), os “neurónios” de GnRH não podem afectar a função reprodutiva enquanto os vasos sanguíneos do sistema porta-hipofisário não estiverem totalmente formados e os seus terminais não estiverem ligados à EM embrionária (o que ocorre por volta do 70º dia de gestação).

Durante a vida fetal, os esteróides sexuais determinam uma organização específica da rede neuronal de GnRH, que condicionará o seu funcionamento no estado adulto (PINCARD *et al.*, 2000 e ROBINSON *et al.*, 2002). Nos mamíferos, especificamente, a testosterona produzida pelos testículos em formação é responsável pelo dimorfismo desta rede neuronal (PINCARD *et al.*, 2000 e ROBINSON *et al.*, 2002). Nos ovinos, o período crítico (ou janela) para a diferenciação sexual da rede neuronal de GnRH ocorre entre o 30-90º dia pós-parto (ROBINSON *et al.*, 2002). De acordo com ROBINSON *et al.* (2002), os androgénios parecem não afectar directamente os neurónios imaturos de GnRH. Ao que tudo indica, eles exercem essencialmente a sua acção diferenciadora sobre a região do hipotálamo em desenvolvimento para a qual os neurónios GnRH vão migrar, condicionando a rede de ligações aferentes que com eles são contactar (ROBINSON *et al.*, 2002). Nos animais adultos, a actividade dos neurónios GnRH é coordenada e modulada por vários sinais que atingem o seu corpo celular (KELLY *et al.*, 2002 e ROBINSON *et al.*, 2002), através de um plexo de neurónios aferentes cuja composição difere em função do sexo (ROBINSON *et al.*, 2002). Consequentemente, por exemplo, o mecanismo de retroacção positiva que os estrogénios exercem sobre a libertação de LH (imediatamente antes da ovulação) pode ser encontrado nas ovelhas “normais”, mas não nos carneiros ou nas ovelhas androgenizadas *in utero* (ROBINSON *et al.*, 2002). Por outro lado, enquanto que nos carneiros a actividade das gónadas é permanente, no caso das ovelhas esta ocorre segundo ciclos repetitivos de aproximadamente 16 dias (ROBINSON *et al.*, 2002). Mais, tal como já foi anteriormente mencionado, as ovelhas são claramente mais sazonais do que os carneiros (ORTAVANT *et al.*, 1988, CHEMINEAU *et al.*, 1996 e GERLACH e AURICH, 2000).

Nos vertebrados superiores, os neurónios que controlam a secreção de gonadotropinas fazem parte do sistema neuro-secretor parvocelular (THIÉRY e MARTIN, 1991 e KIOUSSI *et al.*, 1999). Ao contrário de outros sistemas neuroendócrinos, os neurónios GnRH não se localizam num simples núcleo ou região do cérebro (CALDANI *et al.*, 1995 e LEHMAN *et al.*, 1997), mas encontram-se dispersos pelas áreas telencefálica e diencefálica (CALDANI *et al.*, 1995). Na verdade, a maioria dos 2.500-3.000 (95%) corpos celulares dos neurónios secretores da GnRH, presentes no cérebro dos ovinos, localiza-se em várias regiões do cérebro anterior, desde os bulbos olfactivos (rostralmente) até ao hipotálamo anterior (caudalmente) (THIÉRY e MARTIN, 1991 e LEHMAN *et al.*, 1997) (Figura 19). De uma forma mais particular, os neurónios GnRH podem ser encontrados na POA, na banda diagonal da região septal de Broca/região média (dBB/MS), na área hipotalâmica anterior (AHA) e na área MBH (THIÉRY e MARTIN, 1991, CALDANI *et al.*, 1995, LEHMAN *et al.*, 1997 e THIÉRY *et al.*, 2002). O número médio destes neurónios não se distribui uniformemente por estas áreas cerebrais (THIÉRY e MARTIN, 1991 e LEHMAN *et al.*, 1997). Nos ovinos, 60% dos neurónios GnRH localizam-se na POA-dBB/MS (THIÉRY *et al.*, 2002). A POA, sozinha, possui duas vezes mais neurónios GnRH do que a dBB/MS, a AHA e a MBH em conjunto (LEHMAN *et al.*, 1997). Pelo contrário, a MBH possui apenas 15% dos neurónios GnRH (THIÉRY *et al.*, 2002). Contudo, tanto nos carneiros, como nas ovelhas, as manipulações farmacológicas ou comportamentais da secreção de LH determinam a activação dos neurónios secretores de GnRH presentes nesta área do hipotálamo (THIÉRY *et al.*, 2002). Mais de 50% dos axónios dos neurónios GnRH terminam em *organum vasculosum de lamina terminalis* (OVLT) (THIÉRY e MARTIN, 1991 e THIÉRY e MARTIN, 2002). Outro grupo importante destes axónios termina na EM e forma a via final através da qual diversos factores afectam a secreção das gonadotropinas (THIÉRY e MARTIN, 1991, CALDANI *et al.*, 1995, MCCANN *et al.*, 1998, ESTIENNE *et al.*, 1999, HAZLERIGG *et al.*, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, ROMANOWICZ *et al.*, 2001 e ROBINSON *et al.*, 2002). Adicionalmente, axónios e terminações de neurónios GnRH podem ser encontrados em várias outras áreas cerebrais afastadas (LEHMAN *et al.*, 1997). Pelo menos nalgumas dessas regiões, as terminações dos neurónios GnRH formam sinapses com outros neurónios (LEHMAN *et al.*, 1997), entre os quais há que destacar os opioidérgicos (THIÉRY e MARTIN, 1991).

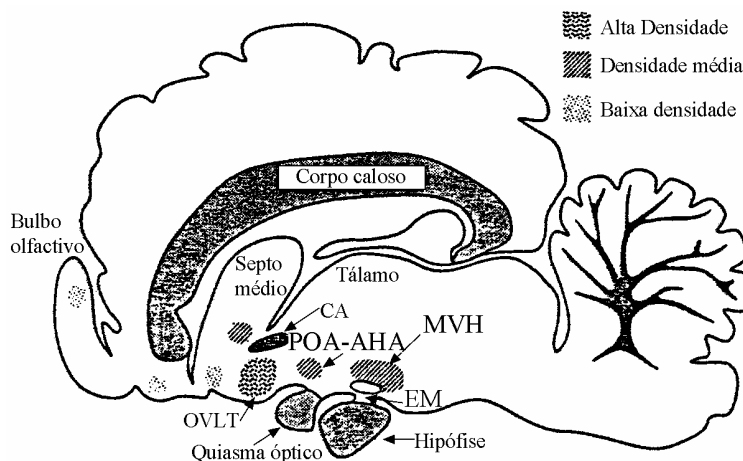


FIGURA 19 – Distribuição hipotalâmica dos neurónios GnRH nas ovelhas. A secreção de gonadotropinas parece ser, basicamente, controlada pelos neurónios GnRH localizados próximo da comissura anterior do septo (CA), nas áreas pré-óptica e do hipotálamo anterior (POA-AHA), assim como no núcleo ventromediano (MVH) do hipotálamo médio basal. Cerca de metade destas células terminam na eminência mediana (EM), localizando-se os seus axónios próximo dos vasos sanguíneos do sistema porta. Os restantes neurónios terminam em *organum vasculosum de lamina terminalis* (OVLT) (THIÉRY e MARTIN, 1991).

Os neurónios GnRH que emitem projecções para outras regiões, como sejam a região média da amígdala, a zona subcalosa ou o núcleo interpeduncular, provêm de populações regionais restritas (THIÉRY e MARTIN, 1991 e LEHMAN *et al.*, 1997). Estes neurónios poderão estar sob um controlo aferente regional mais limitado e reflectirem funções neuroendócrinas específicas, tais como a acção estimuladora que a GnRH exerce sobre o comportamento sexual (LEHMAN *et al.*, 1997) ou o processamento de sinais quimiossensoriais sexualmente relevantes (THIÉRY e MARTIN, 1991 e LEHMAN *et al.*, 1997).

3.5.5 – LOCAIS DE ACÇÃO DA MELATONINA

De acordo com LINCOLN (1992), SKINNER *et al.* (1994), CHEMINEAU *et al.* (1996), LINCOLN e CLARKE (1997), MALPAUX *et al.* (1997), BERGSTROM e HAKANSON (1998), MALPAUX *et al.* (1998), PANG (1998) e POIREL *et al.* (2002), o modo como a melatonina transmite a informação fotoperiódica ao eixo neuroendócrino reprodutivo dos mamíferos sazonais não é ainda totalmente conhecido. Na verdade, a identificação dos locais de acção

da melatonina é uma tarefa difícil de conseguir, uma vez que esta hormona afecta múltiplas funções fisiológicas (MALPAUX *et al.*, 2001). Por outro lado, os receptores membranares da melatonina encontram-se discretamente distribuídos por várias áreas da hipófise e do cérebro (NONNO *et al.*, 1995, WEHR, 1997, CHABOT *et al.*, 1998, MALPAUX *et al.*, 2001 e POIREL *et al.*, 2002) e até de outros tecidos corporais (PANG, 1998, WIESENBERG *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001).

Nos mamíferos superiores, sabe-se hoje que existem dois subtipos de receptores membranares para a melatonina – MET1 e MET2 (MALPAUX *et al.*, 1997, REPPERT, 1997, ROSS *et al.*, 1998, BARRETT *et al.*, 1999, PELLETIER *et al.*, 2000, HOLLANDER, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, MIGAUD *et al.*, 2002 e POIREL *et al.*, 2002). Nos mamíferos, a composição em aminoácidos destes dois subtipos é 80% idêntica (REPPERT, 1997) e as suas características farmacológicas são semelhantes (REPPERT, 1997 e HAZLERIGG *et al.*, 2001). Apenas nos mamíferos inferiores e nas aves pode ser encontrado o subtipo MET3 (BARRETT *et al.*, 1999 e MALPAUX *et al.*, 2001), com duas isoformas: MET3 α e MET3 β (BRYDON *et al.*, 1999). Segundo REPPERT (1997), este subtipo possui uma composição aminoácida 60% idêntica à dos receptores MET1 e MET2 (REPPERT, 1997). Ainda de acordo com este autor, os receptores MET3 têm propriedades farmacológicas e funcionais idênticas às dos receptores MET1 e MET2.

Enquanto que os receptores MET1 podem ser encontrados em várias regiões cerebrais (REPPERT, 1997, RECIO *et al.*, 1998, BORJIGIN *et al.*, 1999, PELLETIER *et al.*, 2000, HAZLERIGG *et al.*, 2001, HOLLANDER, 2001 e POIREL *et al.*, 2002) e da hipófise anterior (REPPERT, 1997, RECIO *et al.*, 1998 e HAZLERIGG *et al.*, 2001), os receptores MET2 localizam-se basicamente na retina (REPPERT, 1997, BORJIGIN *et al.*, 1999 e HAZLERIGG *et al.*, 2001). Nalgumas espécies, níveis muito baixos deste subtipo de receptor podem, no entanto, ser encontrados nalgumas regiões do cérebro e de *PT* (HAZLERIGG *et al.*, 2001). Nos ovinos, até à data, no cérebro e em *PT*, só foram identificados receptores do subtipo MET1 (HAZLERIGG *et al.*, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001 e MIGAUD *et al.*, 2002). Nos hamsters, a “desactivação” natural do gene responsável pela formação dos receptores MET2 não modifica as respostas circadianas destes animais, nem altera o padrão sazonal da sua actividade reprodutora (PELLETIER *et al.*, 2000, HAZLERIGG *et al.*, 2001 e MALPAUX *et al.*, 2001). Por seu turno, nos ratos, a interrupção do funcionamento dos receptores MET1 modifica a regula-

ção dos ritmos circadianos (HAZLERIGG *et al.*, 2001 e MALPAUX *et al.*, 2001). Neste sentido, DREW *et al.* (1998), HOLLANDER (2001), HAZLERIGG *et al.* (2001), MALPAUX *et al.* (2001) e POIREL *et al.* (2002) acreditam que apenas os receptores MET1 estão envolvidos na mediação dos efeitos circadianos e circanuais da melatonina. Aos receptores MET2 pensa-se caber, fundamentalmente, o papel de afectar a sensibilidade das células fotorreceptoras (DREW *et al.*, 1998, HOLLANDER, 2001 e POIREL *et al.*, 2002), nomeadamente através da inibição local da libertação de DA (POIREL *et al.*, 2002).

3.5.5.1 – SOBRE A HIPÓFISE

A hipófise possui relativamente poucos receptores membranares de melatonina (LINCOLN, 1992, MALPAUX *et al.*, 1997 e THIÉRY *et al.*, 2002). Nesta estrutura, a concentração mais elevada destes receptores está presente em *PT* (LINCOLN, 1992, KENNAWAY e HUGEL, 1992, WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, MASSON-PÉVET e GAUER, 1994, KENNAWAY e ROWE, 1995, LINCOLN e CLARKE, 1995, NONNO *et al.*, 1995, CHEMINEAU *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996a, SKINNER e ROBINSON, 1996, MALPAUX *et al.*, 1997, WEHR, 1997, PANG, 1998, RECIO *et al.*, 1998, ROSS *et al.*, 1998, GOLDMAN, 2001, HAZLERIGG *et al.*, 2001, BARRETT *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002, ROSA e BRYANT, 2003 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003), particularmente nas zonas vizinhas da EM e que penetram na adenohipófise ao longo do sistema vascular porta-hipofisário (NONNO *et al.*, 1995). Na verdade, *PT* é a área do sistema hipotálamo-hipofisário que apresenta maior densidade de receptores membranares de melatonina (MALPAUX *et al.*, 2001 e WEHR, 2001). A EM da hipófise possui também receptores membranares de melatonina (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993). Vários autores acreditavam não existir, na adenohipófise, para além de *PT* e da EM, outros locais com estes receptores (MALPAUX *et al.*, 1996a). Porém, no início dos anos 90, diferentes autores afirmavam já que, nalgumas espécies (como nas ratazanas e nos seres humanos), *PD* da adenohipófise era um outro local de ligação da melatonina (Figura 20) (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993 e NONNO *et al.*, 1995). SKINNER e ROBINSON (1996) provaram que, nos ovinos, a administração *in vitro* de GnRH estimula, de igual modo, as células de *PT* e de *PD* no sentido de sintetizar LH. Um ano mais tarde, WILLIAMS *et al.* (1997) identificaram a presença de receptores membranares de melatonina em *PD* destes animais. De acordo com NONNO *et al.* (1995), este tipo de receptores pode mesmo ser encontrados em *pars intermedia (PI)* dos bovinos, cavalos e burros.

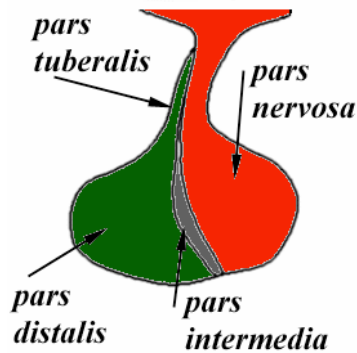


FIGURA 20 – Esquema representativo das diferentes porções da hipófise (WON, 2001).

Nos ovinos, surpreendentemente, *PT* não constitui um alvo directo da acção da melatonina sobre a actividade reprodutora (WILLIAMS e HELLIWELL, 1993, SKINNER *et al.*, 1994, NONNO *et al.*, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996a, MALPAUX *et al.*, 1998, ROSS *et al.*, 1998, HAZLERIGG *et al.*, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, WEHR, 2001 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Efectivamente, nem a colocação de microimplantes de melatonina contra a face anterior de *PT* (MALPAUX *et al.*, 1996a, MALPAUX *et al.*, 2001 e THIÉRY *et al.*, 2002), nem a inserção discreta destes microimplantes em *PT* (MALPAUX *et al.*, 1996a, MALPAUX *et al.*, 2001 e THIÉRY *et al.*, 2002) modificam a secreção de LH. Ao que tudo indica, *PT* está sim envolvida na tradução dos efeitos da melatonina sobre a secreção de PRL (SKINNER *et al.*, 1994, LINCOLN e CLARKE, 1995, LINCOLN *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996a, LINCOLN e CLARKE, 1997, MALPAUX *et al.*, 1997, RECIO *et al.*, 1998, ROSS *et al.*, 1998, LINCOLN, 1998, BORJIGIN *et al.*, 1999, LINCOLN, 1999, LINCOLN e CLARKE, 2000b, GOLDMAN, 2001, HAZLERIGG *et al.*, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, WEHR, 2001, BARRETT *et al.*, 2002, DODGE e BADURA, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003), quer estes sejam agudos (indutíveis) ou crónicos (refractários) (LINCOLN e CLARKE, 2000b). Ao contrário do que sucede relativamente ao controlo da actividade reprodutora, a história fotoperiódica dos animais não afecta significativamente o controlo da secreção de PRL (MALPAUX *et al.*, 2001).

PT dos mamíferos é composta por cordões bi ou multicamada de epitélio glandular, que envolvem o pedúnculo hipofisário e que se estendem até à superfície ventral da EM (na junção do hipotálamo com a hipófise) (KENNAWAY e ROWE, 1995). Durante a fase escura

do dia, a melatonina reduz as células de *PT* a um estado de quiescência (BARRETT *et al.*, 1999). Uma vez que nestas células a melatonina reduz os níveis intracelulares de AMP_c, todos os processos celulares regulados por este mensageiro secundário acabam por ser inibidos: secreção de proteínas, fosforilação da proteína-ligando da AMP_c e transcrição de fenómenos AMP_c-dependentes (PFEFFER *et al.*, 1998 e BARRETT *et al.*, 2002), nomeadamente dos que controlam a expressão dos genes *Per* (HASTINGS e FOLLETT, 2001). Paradoxalmente, nos primeiros momentos da fase luminosa do dia (logo após baixarem as concentrações nocturnas de melatonina), a melatonina parece potencializar os níveis de AMP_c, através da sua capacidade de sensibilização das células de *PT* (BARRETT *et al.*, 1999, HASTINGS e FOLLETT, 2001 e LINCOLN *et al.*, 2002).

Muitas dúvidas, relativamente às causas e ao seu significado biológico, envolvem ainda o fenómeno da sensibilização (HAZLERIGG *et al.*, 2001). Este fenómeno não se limita ao mecanismo de tradução do sinal “melatonina”, bem pelo contrário afecta múltiplos mecanismos mediados por receptores inibidores ligados a proteínas G (HAZLERIGG *et al.*, 2001). Sabe-se, no entanto, que a sensibilização determina a activação da via adenilciclásica (BARRETT *et al.*, 1999, HAZLERIGG *et al.*, 2001, BARRETT *et al.*, 2002 e LINCOLN *et al.*, 2002), pelo menos em parte, através do PACAP (BARRETT *et al.*, 2002). Porém, a melatonina não parece afectar directamente a síntese de PACAP, uma vez que os receptores deste polipéptido e os MET1 não estão coexpressos nas mesmas células de *PT* (BARRETT *et al.*, 2002). Por outro lado, sabe-se que a capacidade da melatonina sensibilizar as células de *PT* depende do período de tempo durante o qual são activados os seus receptores (HAZLERIGG *et al.*, 2001, BARRETT *et al.*, 1999 e BARRETT *et al.*, 2002). A activação dos receptores membranares de melatonina, por um período de 4 horas ou menos, não possui qualquer efeito de sensibilização (BARRETT *et al.*, 1999). Pelo contrário, a activação destes receptores, por um período de 8-16 horas, induz a sensibilização das células de *PT* (BARRETT *et al.*, 1999 e BARRETT *et al.*, 2002). Esta característica, dependente do tempo, vem ao encontro do conceito de que, nos animais sazonais, a duração da secreção nocturna de melatonina determina a sua resposta fisiológica (BARRETT *et al.*, 1999 e HAZLERIGG *et al.*, 2001). De acordo com BARRETT *et al.* (1999) e BARRETT *et al.* (2002), este mecanismo de sensibilização das células de *PT* poderá constituir uma das bases da regulação das respostas adaptativas sazonais.

3.5.5.2 – SOBRE O HIPOTÁLAMO

O hipotálamo possui um elevado número de circuitos neuronais bem conhecidos, que se sabe estarem envolvidos na regulação de diferentes funções vitais – termorregulação (DUNCAN, 1998, KIOUSSI *et al.*, 1999, CESPUGLIO, 2002 e DAUVILLIERS, 2002), pressão sanguínea (KIOUSSI *et al.*, 1999), osmolaridade (KIOUSSI *et al.*, 1999), ingestão e metabolismo da água e dos alimentos sólidos (DUNCAN, 1998, KIOUSSI *et al.*, 1999 e FABRE e BOURGIN, 2002), sono (BORJIGIN *et al.*, 1999, DUNCAN, 1998 e DAUVILLIERS, 2002) e libertação de neuropéptidos reguladores da expressão dos genes, da proliferação e da actividade secretora das células hipofisárias (DUNCAN, 1998 e KIOUSSI *et al.*, 1999). De acordo com os resultados de vários estudos, o hipotálamo (e não *PT* da hipófise) constitui efectivamente o principal alvo de tradução dos efeitos da melatonina sobre o eixo neuroendócrino (HAZLERIGG *et al.*, 2001 e MALPAUX *et al.*, 2001).

Em várias espécies, os SCN do hipotálamo possuem um elevado número de receptores membranares de melatonina (KENNAWAY e HUGEL, 1992, KENNAWAY e ROWE, 1995, WARREN e CASSONE, 1995, YELLON, 1996b, SONG e BARTNESS, 1996, REDMAN, 1997, MALPAUX *et al.*, 1998, BORJIGIN *et al.*, 1999, GOLDMAN, 2001 e BARRETT *et al.*, 2002). Porém, tal não se verifica nos ovinos (MALPAUX *et al.*, 1998). Nestes animais, receptores membranares de melatonina apenas foram encontrados na AHA (MALPAUX *et al.*, 1998) e na área hipotalâmica ventro-mediana (MVH), que se sabe estarem envolvidas no controlo gonadotrópico central (CHABOT *et al.*, 1998 e THIÉRY *et al.*, 2002). Curiosamente, o número de receptores membranares de melatonina presentes nas áreas hipotalâmicas envolvidas na síntese e libertação de GnRH é reduzido (LINCOLN, 1992). Na realidade, a colocação de implantes de melatonina na POA (LINCOLN e MAEDA, 1992a, KENNAWAY e ROWE, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996a e MALPAUX *et al.*, 1997), na AHA ou no hipotálamo dorsolateral não afecta a secreção de LH (LINCOLN e MAEDA, 1992a, MALPAUX *et al.*, 1996a e MALPAUX *et al.*, 1997).

Nos ovinos, a estimulação da secreção de LH, promovida por um antagonista dos péptidos opióides endógenos (EOP) (Figura 21), envolve a activação de um subconjunto de neurónios GnRH, nomeadamente daqueles que se localizam na MBH (THIÉRY e MARTIN, 1991, CHEMINEAU *et al.*, 1996, LEHMAN *et al.*, 1997 e THIÉRY *et al.*, 2002). Na verdade, LEHMAN *et al.* (1997), BECCA VIN *et al.* (1998), SWEENEY *et al.* (1999), GOLDMAN (2001),

ROMANOWICZ *et al.* (2001), KELLY *et al.* (2002) e THIERY *et al.* (2002) afirmam que a alteração sazonal da sensibilidade do hipotálamo, face à retroacção negativa exercida pelos esteróides sexuais, envolve a MBH (Figura 22).

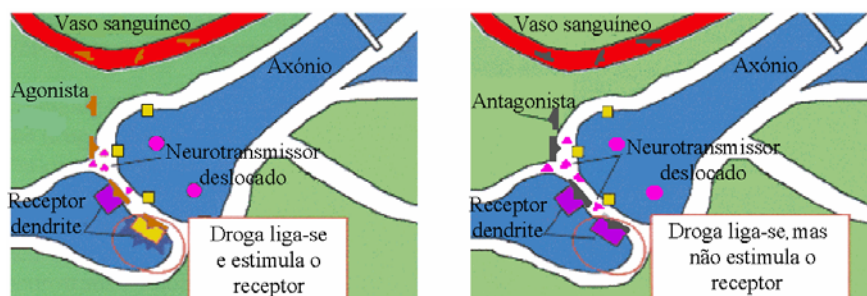


FIGURA 21 – Esquema representativo do modo de acção de agentes agonistas e antagonistas (ANÓNIMO, 2002).

Segundo MALPAUX *et al.* (1996a), MALPAUX *et al.* (1997) e MALPAUX *et al.* (2001), a colocação de implantes de melatonina na MBH ou no terceiro ventrículo dos ovinos estimula a libertação de LH. Até nos carneiros sujeitos a um regime luminoso de “dias longos”, a colocação de implantes desta hormona na MBH determina um aumento prematuro da secreção de LH e de FSH e, conseqüentemente, a “reactivação” do eixo reprodutivo (LINCOLN e MAEDA, 1992b).

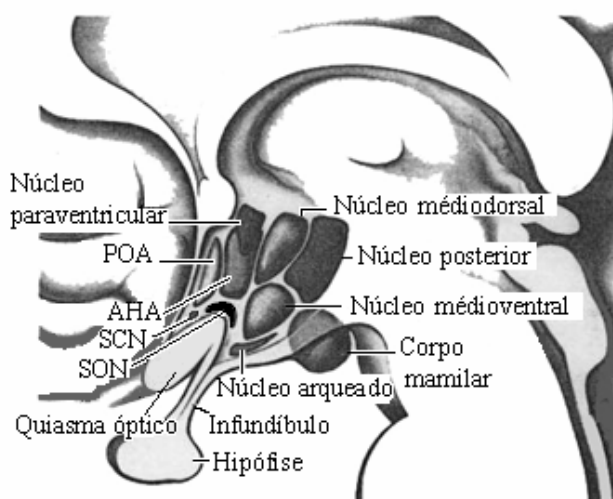


FIGURA 22 – Esquema representativo da área hipotalâmica médio basal (POA – área pré-óptica, AHA – área hipotalâmica anterior, SCN – núcleo supraquiasmático e SON – núcleo supra-óptico) (adaptado de WON, 2001).

Neste caso, tanto o *timing* como a amplitude do aumento da secreção de LH são semelhantes aos de carneiros sujeitos a um regime luminoso de “dias curtos” (LINCOLN, 1994, MALPAUX *et al.*, 1996a e MALPAUX *et al.*, 1997). De acordo com MALPAUX *et al.* (1996a) e MALPAUX *et al.* (1997), estes dados pareciam provar que a MBH era o grande alvo da acção da melatonina, tendo em vista o controlo da actividade reprodutora. Porém, a colocação de microimplantes de melatonina na MBH estimulava a secreção de LH em apenas metade dos ovinos tratados (MALPAUX *et al.*, 1998). Neste sentido, MALPAUX *et al.* (1998) começaram a suspeitar que, nestes animais, o local específico de acção da melatonina não se encontravam na MBH (onde foi detectada a presença de neurónios GnRH), mas sim numa área vizinha para onde a melatonina dos microimplantes se difundia. Na verdade, estes autores identificaram uma pequena área rica em receptores membranares de melatonina no hipotálamo posterior (no entanto, com 20 vezes menos receptores do que PT), mais precisamente na base do cérebro, limitada pelo fornix. Rodeando o terceiro ventrículo, numa extensão de 3 milímetros, esta área localiza-se posteriormente relativamente ao recesso infundibular e é delimitada caudalmente pelos corpos mamilares (MALPAUX *et al.*, 1998). Por esta razão, MALPAUX *et al.* (1998) resolveram denominá-la de área hipotalâmica pré-mamilar (PMH). Investigando esta hipótese, MALPAUX *et al.* (1998) verificaram que, em todas as ovelhas estudadas (ovariectomizadas, tratadas com estradiol e sujeitas a um regime luminoso de “dias longos”), a correcta colocação de implantes de melatonina na PMH estimulou a secreção de LH. Ao que tudo indica, a região caudal do núcleo hipotalâmico arqueado/PMH constitui realmente um importante alvo da acção do fotoperíodo (via melatonina) sobre a actividade reprodutora dos ovinos (MALPAUX *et al.*, 1998, HILEMAN e JACKSON, 1999, LINCOLN e CLARKE, 2000a, HAZLERIGG *et al.*, 2001, MALPAUX *et al.*, 2001, WEHR, 2001, THIÉRY *et al.*, 2002, ROSA e BRYANT, 2003 e TRICOIRE *et al.*, 2003). Contudo, LINCOLN e CLARKE (2000a) pensam que a regulação global do eixo reprodutivo passa pela totalidade do núcleo hipotalâmico arqueado. De um modo mais geral, tendo em conta a dispersão dos receptores membranares de melatonina por várias áreas do cérebro, HAZLERIGG *et al.* (2001) e MALPAUX *et al.* (2001) acreditam que a melatonina afecta a actividade reprodutora (secreção de gonadotropinas, comportamento sexual, comportamento maternal, etc.), actuando sobre diferentes regiões cerebrais.

A presença de um ou de vários locais de acção da melatonina no hipotálamo é muito interessante, dada a baixa densidade de receptores membranares para esta hormona identificados nesta área do cérebro (MALPAUX *et al.*, 1996a e MALPAUX *et al.*, 1997). Contudo, é possível que diferentes subtipos e isoformas de receptores membranares de melatonina possam determinar diferentes graus de intensidade de ligação (MALPAUX *et al.*, 1996a e MALPAUX *et al.*, 1997) e diferentes capacidades de sinalização (BRYDON *et al.*, 1999). Todos os subtipos de receptores membranares de melatonina até agora identificados possuem elevada e idêntica capacidade de ligação (MALPAUX *et al.*, 2001). Num trabalho recente, efectuado com ovelhas da raça Merino d'Arles, foi possível relacionar a presença de diferentes polimorfismos génicos do receptor MET1, com diferenças individuais quanto à sazonalidade reprodutiva (MALPAUX *et al.*, 2001 e MIGAUD *et al.*, 2002). Igual relação não foi encontrada por MIGAUD *et al.* (2002), num estudo em que foram utilizadas cabras das raças Alpina (elevada sazonalidade) e Creola (baixa sazonalidade). Ao que tudo indica, tal como sucede em *PT* da hipófise, a acção dos receptores hipotalâmicos de melatonina depende, igualmente, da mediação exercida pelas proteínas G (KENNAWAY e ROWE, 1995, NONNO *et al.*, 1995, DREW *et al.*, 1998 e HAZLERIGG *et al.*, 2001). Na verdade, estruturalmente, os vários subtipos de receptores de melatonina formam uma família própria, dentro da superfamília dos receptores ligados a proteínas G (HAZLERIGG *et al.*, 2001 e MALPAUX *et al.*, 2001). Por outro lado, é possível que a melatonina exerça alguns dos seus efeitos depois de penetrar nas células (por simples difusão), interagindo com moléculas citoplasmáticas (EL-SHERIF *et al.*, 2002). Há ainda que chamar a atenção para o facto de, já em 1994, Becker-André *et al.* (citados por MALPAUX *et al.*, 1996a) terem identificado, no hipotálamo das ratazanas, um receptor nuclear órfão (*orphan*), ao qual a melatonina se liga em quantidades nanomolares.

3.5.5.3 – SOBRE OUTRAS REGIÕES CEREBRAIS

No cérebro, as regiões do hipocampo (parte integrante do sistema límbico, encarregue da memorização rápida de experiências vivenciais que exigem esforço adaptativo) e do septo lateral são “ricas” em receptores membranares de melatonina (LINCOLN, 1992, LINCOLN, 1994, WEHR, 1997 e WILLIAMS *et al.*, 1997). Em menor grau, podem ainda ser encontrados receptores membranares de melatonina no telencéfalo, no diencéfalo e no cérebro intermédio (MALPAUX *et al.*, 1996a e CHABOT *et al.*, 1998).

3.5.5.4 – SOBRE OUTROS ÓRGÃOS OU TECIDOS

Teoricamente, a melatonina pode também actuar sobre as gónadas (PANG, 1998, KUŞ *et al.*, 2000 e ABECIA *et al.*, 2003), os tractos genitais masculino e feminino, as glândulas acessórias e/ou as glândulas mamárias (PANG, 1998 e KUŞ *et al.*, 2000) (Figura 23).

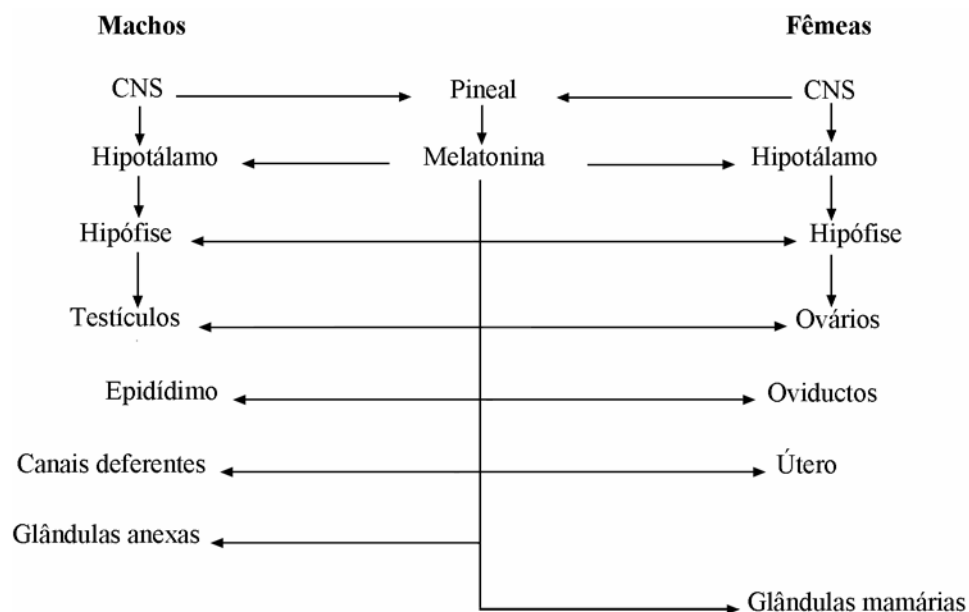


FIGURA 23 – Múltiplos locais de acção da melatonina, desde o sistema nervoso central (CNS) até ao aparelho genital e às glândulas mamárias (adaptado de PANG, 1998).

De acordo com KVETNOY *et al.* (1997), SIROTKIN e SCHAEFFER (1997), PANG (1998) e (KUŞ *et al.*, 2000), existem dados, directos e indirectos, que indiciam que as indolaminas podem afectar os processos reprodutivos, actuando directamente sobre os tecidos gonadais. Na verdade, sendo uma molécula lipossolúvel, a melatonina não possui barreiras à sua difusão e pode alcançar todas as partes do corpo (MENAKER, 1997, PANG, 1998, WIESENBERG *et al.*, 1998 e EL-SHERIF *et al.*, 2002). A melatonina e seus receptores podem efectivamente ser encontrados nos órgãos reprodutivos de vários animais: aves e mamíferos (SIROTKIN e SCHAEFFER, 1997 e KUŞ *et al.*, 2000). Em trabalhos realizados *in vitro*, verificou-se que as indolaminas afectam o funcionamento dos tecidos gonadais de animais de laboratório e dos seres humanos (SIROTKIN e SCHAEFFER, 1997 e PANG, 1998).

Nos animais de laboratório e nos seres humanos, a melatonina e/ou a 5-HT são produzidas em vários tecidos do organismo, para além da glândula pineal: retina, glândula de

Harder, mucosa intestinal, epitélio das vias respiratórias, fígado, rins, glândulas supra-renais, timo, tiróide, pâncreas, corpo carótido, cerebelo, placenta e endométrio (KVETNOY *et al.*, 1997). Contudo, estas indolaminas não são produzidas pelos folículos ovários (SIROTKIN e SCHAEFFER, 1997), nem pelas células testiculares de Leydig (SIROTKIN e SCHAEFFER, 1997).

Nos machos dos animais de laboratório, as indolaminas parecem afectar o funcionamento do epidídimo, dos canais deferentes (a modificação da secreção diária de acetilcolina afecta a contractilidade da musculatura) e das glândulas anexas (PANG, 1998). Por seu turno, nas fêmeas destes animais, estas hormonas parecem condicionar a actividade das células foliculares (da granulosa e da teca), alterando a produção de estrogénios, de oxitocina e de progesterona (SIROTKIN e SCHAEFFER, 1997), do útero (regulando a permeabilidade vascular do endométrio e a decidualização) e da glândula mamária (PANG, 1998). Segundo PANG (1998), a acção da melatonina sobre diferentes regiões do eixo reprodutivo poderá gerar um efeito cooperativo, sinérgico ou aditivo que controle eficazmente a actividade reprodutora dos animais de laboratório.

Nos ovinos, os dados actualmente disponíveis indicam que a produção extrapineal de melatonina é muito reduzida (MALPAUX *et al.*, 1996b). Por outro lado, sabe-se hoje que, nos ovinos, ao contrário do que sucede nos animais de laboratório, a melatonina não exerce qualquer acção directa significativa sobre a produção de estradiol (SIROTKIN e SCHAEFFER, 1997). Contudo, a melatonina parece afectar a actividade lútea e a sobrevivência dos embriões, modificando a relação entre as prostaglandinas PGE₂:PGF_{2α} (ABECIA *et al.*, 2003).

3.5.6 – MECANISMOS DE ACÇÃO DA MELATONINA

3.5.6.1 – SOBRE O SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPOFISÁRIO

O eixo hipotálamo-hipofisário é o alvo clássico de acção da melatonina (HANSEM, 1985, LINCOLN, 1992, MALPAUX *et al.*, 1996a,b, LEHMAN *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1998, PANG, 1998, ROSS, 1998, GERLACH e AURICH, 2000 e MALPAUX *et al.*, 2001). Tal como já foi anteriormente referido, apesar do objectivo final da acção da melatonina sobre o CNS ser a modificação da secreção pulsátil de GnRH, a melatonina não actua directamente sobre os neurónios que a segregam (THIÉRY e MARTIN, 1991, LINCOLN, 1992,

MALPAUX *et al.*, 1996a, MALPAUX *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001). Primeiro, porque a distribuição dos neurónios GnRH não coincide com os locais putativos de acção da melatonina (MALPAUX *et al.*, 1996a e MALPAUX *et al.*, 2001). Os corpos celulares dos neurónios GnRH localizam-se, na sua maioria (60%), na POA-AHA (MALPAUX *et al.*, 1996a,b, MALPAUX *et al.*, 1997, SCOTT *et al.*, 2000 e THIÉRY *et al.*, 2002). Estes neurónios projectam-se para a EM, a fim de libertarem a GnRH no sistema vascular porta hipotálamo-hipofisário (MALPAUX *et al.*, 1996b, LEHMAN *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1997 e ESTIENNE *et al.*, 1999), principal via de comunicação química entre o hipotálamo e a hipófise (Figura 24) (HARD *et al.*, 2001). Segundo, existe um grande período de latência entre o começo da acção da melatonina e a alteração da secreção de GnRH (40 a 60 dias) (MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 2001 e FORCADA *et al.*, 2002). Terceiro, vários neurotransmissores foram já implicados nesta regulação (MALPAUX *et al.*, 1996a e MALPAUX *et al.*, 2001).

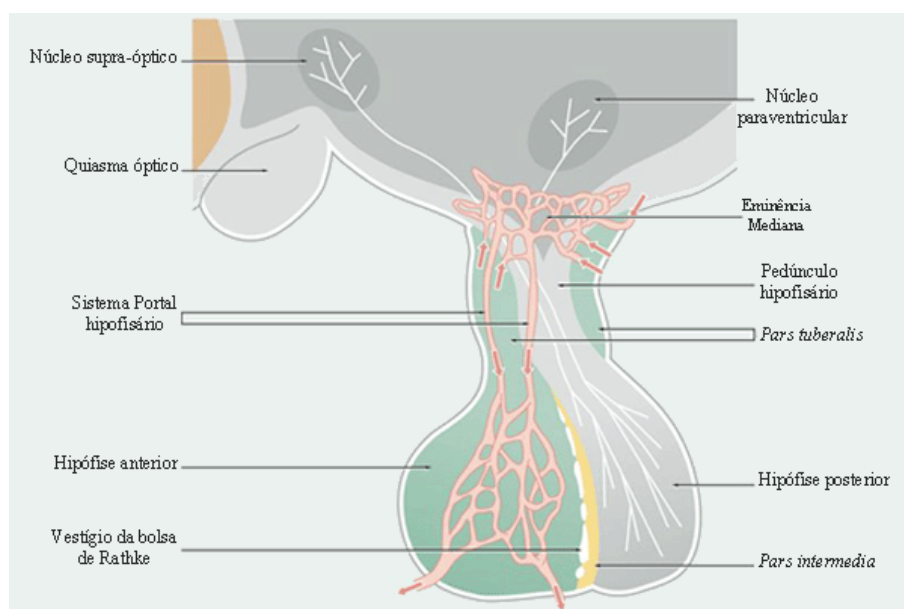


FIGURA 24 – Principais vias de comunicação entre o hipotálamo e a hipófise, para além do líquido céfalo-raquidiano (adaptado de WON, 2001).

Tendo em conta os últimos conhecimentos, MALPAUX *et al.* (1998) acreditam que o conhecimento dos mecanismos, através dos quais a melatonina afecta a secreção de LH, implicará a descrição das vias através das quais a PMH contacta com os neurónios GnRH. Nos ovinos, a informação disponível sobre possíveis projecções da PMH para outras áreas

do cérebro é muito limitada (MALPAUX *et al.*, 1998). Nas ratazanas, os núcleos tuberomamilares projectam-se para porções mais rostrais e caudais do cérebro (MALPAUX *et al.*, 1998). Nestes animais, a região ventral da PMH, onde a melatonina se liga com maior intensidade, emite projecções para a maioria das regiões da zona periventricular do hipotálamo (MALPAUX *et al.*, 1998). Se projecções semelhantes a estas existirem nos ovinos, poderão ligar a PMH às áreas hipotalâmicas envolvidas no controlo da secreção da GnRH (MALPAUX *et al.*, 1998).

Os EOP e/ou as catecolaminas, libertados no sistema sanguíneo porta hipotálamo-hipofisário, regulam a secreção pulsátil de GnRH e, consequentemente, a libertação das gonadotropinas (LINCOLN, 1992 e HONARAMOOZ *et al.*, 2000). Na verdade, são vários os neuromediadores que parecem estar envolvidos na acção indirecta da melatonina sobre os neurónios GnRH que possuem terminações na EM (LINCOLN, 1992 e LEHMAN *et al.* 1997).

3.5.6.1.1 – Péptidos Opióides Endógenos

Nos mamíferos de reprodução sazonal, os EOP (derivados da pró-opiomelanocortina – POMC) estão implicados na modulação sazonal da actividade reprodutora (MALVEN *et al.*, 1984, LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989, SALERI *et al.*, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, JACKSON e KUEHL, 2000, PARVIZI, 2000 e FUENTES *et al.*, 2001), através da sua capacidade de suprimir a secreção de GnRH (BROOKS *et al.*, 1986a, KALRA *et al.*, 1998, SALERI *et al.*, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, JACKSON e KUEHL, 2000 e PARVIZI, 2000) e de LH (BROOKS *et al.*, 1986a,b, CURRIE *et al.*, 1991, KALRA *et al.*, 1998, SALERI *et al.*, 1998, GERLACH e AURICH, 2000, JACKSON e KUEHL, 2000 e PARVIZI, 2000), mas não a de FSH (CURRIE *et al.*, 1991). São afectadas tanto a amplitude como a frequência de secreção da GnRH e da LH (CURRIE *et al.*, 1991 e JACKSON e KUEHL, 2000), embora o efeito principal seja exercido sobre a frequência (BROOKS *et al.*, 1986a e CURRIE *et al.*, 1991).

Os mecanismos opioidérgicos estão activos, fundamentalmente, durante a estação reprodutiva (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989, TORTONESE, 1999 e GERLACH e AURICH, 2000), ainda que a sua acção varie ao longo do ciclo éstrico (CURRIE *et al.*, 1991, SALERI *et al.*, 1998 e ARGOLAS, 1999). Na realidade, a capacidade dos EOP suprimirem a libertação de LH é reduzida durante a fase folicular do ciclo éstrico (CURRIE *et al.*, 1991),

provavelmente porque as concentrações plasmáticas de progesterona são então reduzidas (BROOKS *et al.*, 1986b e CURRIE *et al.*, 1991). Ao que tudo indica, em qualquer altura do ano, a progesterona eleva a capacidade dos EOP suprimirem a secreção de LH (CURRIE *et al.*, 1991).

Em muitas espécies, incluindo a ovina, os EOP funcionam como neurotransmissores ou neuromoduladores (ARGIOLAS, 1999) hipotalâmicos que, actuando directa ou indirectamente sobre os neurónios GnRH, induzem uma diminuição da produção de GnRH/LH (BROOKS *et al.*, 1986a, GERLACH e AURICH, 2000 e PARVIZI, 2000). Ao que tudo indica, eles medeiam a retroacção negativa que os esteróides sexuais exercem sobre a secreção de GnRH (BROOKS *et al.*, 1986a, LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989, THIÉRY e MARTIN, 1991, SALERI *et al.*, 1998 e GERLACH e AURICH, 2000). Contudo, vários autores acreditam que a acção mediadora dos EOP se relaciona, dalguma forma, com as vias catecolaminérgicas do hipotálamo (HONARAMOOZ *et al.*, 2000). Nas ratazanas, tanto a β -endorfina como a encefalina inibem a secreção de LH, diminuindo os efeitos estimuladores da DA (THIÉRY e MARTIN, 1991), da NOR e da adrenalina (sob um fotoperíodo inibidor de “dias curtos”) (THIÉRY e MARTIN, 1991). Nestes animais, os opióides parecem exercer a sua acção através da inibição pré-sináptica do *input* estimulador noradrenérgico (THIÉRY e MARTIN, 1991).

De acordo com os resultados encontrados em vários trabalhos, os neurónios opioidérgicos parecem igualmente controlar a acção dos neurónios GnRH, através de mecanismos esteróides-independentes (THIÉRY e MARTIN, 1991). Nas vacas, nos porcos e nas ratazanas os EOP parecem afectar directamente a secreção de LH (SALERI *et al.*, 1998).

Apesar de ser geralmente aceite que os EOP actuam através de vias neuroendócrinas centrais, alguns dados levantam a hipótese de existirem mecanismos opioidérgicos periféricos capazes de afectar a secreção central de hormonas (PARVIZI, 2000).

3.5.6.1.1.1 – β -endorfina

Nos ovinos, as concentrações hipotalâmicas de β -endorfina não variam significativamente em função do ciclo éstrico (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989 e GERLACH e AURICH, 2000). Nestes animais, as concentrações periféricas de β -endorfina variam sim em função do ciclo reprodutivo, registando-se os valores máximos no Outono (ou após exposi-

ção dos animais a um regime luminoso de “dias curtos”) (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989 e GERLACH e AURICH, 2000). Os neurónios β -endorfinérgicos possuem receptores estrogénicos e inibem a secreção de GnRH/LH (HILEMAN *et al.*, 1998). Contudo, a supressão sazonal da libertação de GnRH, promovida pelos esteróides gonadais, não parece ser mediada pelo aumento da síntese e libertação de β -endorfina (HILEMAN *et al.*, 1998). Neste sentido, LINCOLN e SSEWANNYANA (1989), HILEMAN e JACKSON (1999) e GERLACH e AURICH (2000) acreditam que a β -endorfina não intervém directamente no controlo do ciclo reprodutivo dos ovinos. Na verdade, é pouco provável que os níveis plasmáticos deste opióide afectem o mecanismo central de controlo da secreção de GnRH, uma vez que eles parecem ser incapazes de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989). Ao que tudo indica, ela está sim envolvida no controlo do apetite, do metabolismo dos carboidratos e da deposição de gordura (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989) e na regulação imunitária (BERCZI *et al.*, 1998 e KALRA *et al.*, 1998).

3.5.6.1.1.2 – Naloxona

Nos ovinos, a injeção ou infusão de naloxona (NLX) determina um aumento agudo da secreção de LH (MALVEN *et al.*, 1984, BROOKS *et al.*, 1986b, LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989, GERLACH e AURICH, 2000 e FUENTES *et al.*, 2001). Uma vez que a NLX é um opióide antagonista puramente competitivo (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989), a resposta da LH à sua administração põe a descoberto a actividade que os EOP exercem sobre o hipotálamo, tendo em vista a inibição da libertação de GnRH (MALVEN *et al.*, 1984, LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989, GERLACH e AURICH, 2000 e JACKSON e KUEHL, 2000). Nos ovinos, a acção da NLX varia em função do ciclo reprodutivo (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989). Durante as fases activa e regressiva do ciclo reprodutivo, a NLX eleva a secreção de LH, enquanto que, durante o período de anestro, esta acção é reduzida ou inexistente (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989). Porém, a administração de esteróides sexuais, a animais sexualmente inactivos, não reinstala a resposta da LH face à acção estimuladora da NLX (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989), o que prova que ela não depende apenas da alteração da secreção deste tipo de esteróides (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989). De acordo com LINCOLN e SSEWANNYANA (1989), a alteração da resposta reprodutiva da LH face à NLX pode ser induzida por tratamentos apropriados de melatonina.

3.5.6.1.1.3 – Morfina

Nos carneiros, a morfina (MOR) determina uma diminuição da frequência de secreção de LH (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989). Segundo LINCOLN e SSEWANNYANA (1989), a acção da MOR sobre a secreção de LH depende, pelo menos em parte, dos níveis circulantes de esteróides sexuais. Ao que tudo indica, este opióide só inibe significativamente a secreção de LH durante as fases activa e regressiva do ciclo reprodutivo (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989).

Nos ratos, a aplicação de tratamentos crónicos de MOR modifica a resposta da LH à NLX (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989) e determina um aumento da sensibilidade do hipotálamo face à retroacção negativa exercida pelos esteróides sexuais (LINCOLN e SSEWANNYANA, 1989).

3.5.6.1.2 – Catecolaminas

Tal como já foi várias vezes referido, as modificações sazonais da actividade reprodutora resultam de alterações na secreção das gonadotropinas. Nas ovelhas, durante o período de anestro sazonal, a inibição da actividade reprodutora é fundamentalmente ditada pelo fortalecimento da retroacção negativa que os estrogénios exercem sobre a secreção pulsátil de GnRH (THIÉRY *et al.*, 1995, LEHMAN *et al.*, 1996, BECCA VIN *et al.*, 1998, VIGUIÉ *et al.*, 1998 e THIÉRY *et al.*, 2002). A natureza catecolaminérgica das células inibidoras da secreção de GnRH (THIÉRY *et al.*, 1995) e a descoberta do papel inibidor das catecolaminas sobre a secreção de LH (THIÉRY *et al.*, 1995, LEHMAN *et al.*, 1996, BECCA VIN *et al.*, 1998, VIGUIÉ *et al.*, 1998 e ESTIENNE *et al.*, 1999), constituem provas do seu envolvimento no controlo da actividade reprodutora.

As catecolaminas, que incluem a NOR, a DA e a adrenalina, são sintetizadas em neurónios localizados em várias regiões do CNS (BECCA VIN *et al.*, 1998 e ESTIENNE *et al.*, 1999). Dados farmacológicos sugerem que os sistemas noradrenérgicos e dopaminérgicos estão organizados, sequencialmente, de modo a que os neurónios noradrenérgicos induzam os neurónios dopaminérgicos a inibir a frequência de libertação da GnRH (LEHMAN *et al.*, 1996). A colocação de implantes intracerebrais de antagonistas destas substâncias prova que ambos os sistemas actuam dentro do hipotálamo (LEHMAN *et al.*, 1996). Porém, enquanto

que as fibras noradrenérgicas actuam a nível da POA (LEHMAN *et al.*, 1996), as fibras dopaminérgicas actual sobre a MBH (LEHMAN *et al.*, 1996 e BECCA VIN *et al.*, 1998).

3.5.6.1.2.1 – Noradrenalina

A NOR é uma catecolamina sintetizada a partir da dopamina, através da acção da enzima dopamina β -hidroxilase (ESTIENNE *et al.*, 1999). Ao longo da estação de anestro, a NOR inibe eficazmente a secreção pulsátil de LH (MALPAUX *et al.*, 1996b e THIÉRY *et al.*, 2002). Nesta altura, a injeção intravenosa de um antagonista α -noradrenérgico (fenoxibenzamina) provoca um incremento da secreção pulsátil de LH (MALPAUX *et al.*, 1996b e THIÉRY *et al.*, 2002). Por outro lado, em ovelhas submetidas a um regime luminoso de “dias longos”, o estradiol aumenta as concentrações intra e extra-celulares de um metabolito da NOR (4-hidroxi-3-metoxifenilglicol) no núcleo hipotalâmico A15 (THIÉRY *et al.*, 1995 e MALPAUX *et al.*, 1996b). Segundo MALPAUX *et al.* (1996b) e THIÉRY *et al.* (2002), estes dados indiciam que, sob um regime luminoso de “dias longos”, a NOR está implicada no estabelecimento da retroacção negativa que os estrogénios exercem sobre a secreção de LH.

Para além de actuar como um neurotransmissor clássico, a NOR regula também a diferenciação, a plasticidade e a sobrevivência dos neurónios presentes no CNS dos animais adultos (TROADEC *et al.*, 2001). Ao que tudo indica, tal como a melatonina, a NOR protege os neurónios do CNS do *stress* oxidativo (TROADEC *et al.*, 2001).

3.5.6.1.2.2 – Dopamina

Numerosos estudos científicos comprovam que a DA (Figura 25) está efectivamente envolvida na tradução sazonal da retroacção negativa que os estrogénios exercem sobre a secreção de GnRH (THIÉRY e MARTIN, 1991, MALPAUX *et al.*, 1996a, LEHMAN *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1997, BECCA VIN *et al.*, 1998, GALLEGOS-SANCHEZ *et al.*, 1998, VIGUIÉ *et al.*, 1998, ESTIENNE *et al.*, 1999, GERLACH e AURICH, 2000, PARVIZI, 2000, MALPAUX *et al.*, 2001, ROMANOWICZ *et al.*, 2001, DODGE e BADURA, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002). Nos primeiros trabalhos, realizados com o intuito de estudar a acção da DA sobre a secreção de gonadotropinas, verificou-se que este neurotransmissor afectava sempre positivamente a secreção destas hormonas (THIÉRY e MARTIN, 1991). Trabalhos posteriores revelaram precisamente o contrário (THIÉRY e MARTIN, 1991 e TORTONESE, 1999). Nos

ovinos, ao que tudo indica, os sistemas adrenérgicos estimulam ou inibem a secreção de GnRH em função do *status* endócrino actual (HONARAMOOZ *et al.*, 2000).

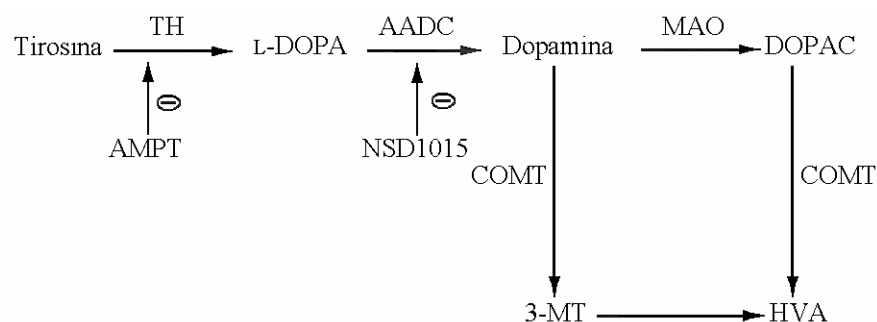


FIGURA 25 – Biossíntese e degradação da dopamina. As enzimas tirosina hidrolase (TH) e L-aromático aminoácido descarboxilase (AADC) actuam, sucessivamente, sobre a tirosina e a L-3-4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), originando a formação da dopamina. Por seu turno, esta molécula é transformada em ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), por duas vias, em que estão envolvidas as enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT). A AMPT (α metil tirosina) e o NSD1015 são inibidores específicos da TH e da AADC, respectivamente (THIÉRY *et al.*, 1995).

De acordo com GERLACH e AURICH (2000), sob um regime de “dias longos”, os sistemas dopaminérgicos inibem a libertação de LH, enquanto que sob um regime de “dias curtos” estes mesmos sistemas estimulam a libertação de LH. Discordando desta ideia, MALPAUX *et al.* (1996b) e VIGUIÉ *et al.* (1998) afirmam que a dopamina inibe sempre, tanto na estação reprodutiva como no período de anestro, a secreção de gonadotropinas, embora esta inibição seja claramente mais marcada durante o período de anestro. Lesões específicas nos núcleos hipotalâmicos dopaminérgicos (MALPAUX *et al.*, 1996b e VIGUIÉ *et al.*, 1998) e a administração de um antagonista da DA a nível da MBH (VIGUIÉ *et al.*, 1998) traduziram-se sempre, independentemente do regime fotoperiódico vigente, numa estimulação da secreção pulsátil de gonadotropinas, tanto em machos como em fêmeas. A exposição dos ovinos a um regime luminoso de “dias curtos” ou a um tratamento com implantes de melatonina inibe a síntese de TH (THIÉRY *et al.*, 1995, MALPAUX *et al.*, 1997, BECCAVIN *et al.*, 1998 e THIÉRY *et al.*, 2002), das concentrações circulantes de DA (THIÉRY *et al.*, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b e VIGUIÉ *et al.*, 1998) e da actividade deste neurotransmissor (MAL-

PAUX *et al.*, 1996b e MALPAUX *et al.*, 1997). Por outro lado, durante a estação sexual, a administração intra cérebro-ventricular de um agonista dopaminérgico inibe a secreção de LH (MALPAUX *et al.*, 1996b). Pelo contrário, durante o período de anestro, a administração sistémica de pimozida (antagonista da dopamina), a ovelhas inteiras ou ovariectomizadas, tratadas com implantes de estradiol, determina um aumento temporário da secreção de LH (MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 1997, VIGUIÉ *et al.*, 1998 e TORTONESE, 1999). Segundo TORTONESE (1999), enquanto que os efeitos inibidores dos sistemas opioidérgicos sobre a secreção de GnRH/LH são detectáveis essencialmente durante a época reprodutiva (“dias curtos”), os efeitos supressivos dos sistemas dopaminérgicos sobre a secreção destas mesmas hormonas manifestam-se fundamentalmente durante o período de anestro (“dias longos”). Neste sentido, este autor acredita que, nos ovinos, tendo em vista o controlo da actividade reprodutora, as vias opioidérgicas interactivam com as vias dopaminérgicas e que esta interacção é modulada pelo fotoperíodo.

Nos ovinos, a modulação da actividade dopaminérgica, a nível da EM (LINCOLN e MAEDA, 1992a, THIÉRY *et al.*, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996a,b, BECCA VIN *et al.*, 1998, VIGUIÉ *et al.*, 1998, DODGE e BADURA, 2002, FORCADA *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002) e da MBH (VIGUIÉ *et al.*, 1998), constitui uma das principais vias de acção da melatonina sobre a secreção de GnRH/LH. A EM é particularmente rica em terminais dopaminérgicos (MALPAUX *et al.*, 1996a,b, LEHMAN *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 2001 e DODGE e BADURA, 2002), embora o parênquima das células nela localizadas não seja imunorreactivo à TH (MALPAUX *et al.*, 2001). Os neurónios dopaminérgicos contactam sinapticamente com os neurónios secretores de GnRH (VIGUIÉ *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001), fornecendo desta forma o suporte anatómico para que a EM constitua o passo final da via reguladora da secreção de GnRH (VIGUIÉ *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001). Segundo THIÉRY *et al.* (1995) e THIÉRY *et al.* (2002), a DA reduz a libertação de GnRH através da inibição pré-sináptica dos neurónios GnRH localizados nesta área hipofisária.

Na EM, o aumento da actividade da TH medeia, efectivamente, a acção inibidora que os “dias longos” exercem sobre a secreção de GnRH (MALPAUX *et al.*, 1996b, BECCA VIN *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001), particularmente na fase inicial do período de inibição (BECCA VIN *et al.*, 1998, VIGUIÉ *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001). Embora a DA medie o mecanismo de retroacção negativa exercido pelos esteróides sexuais sobre a secreção de

GnRH, o controlo da actividade da TH parece ser estrogénio-independente, uma vez que as modificações sazonais da actividade da TH são semelhantes em ovelhas ovariectomizadas e em ovelhas ovariectomizadas tratadas com estradiol (MALPAUX *et al.*, 1996a, MALPAUX *et al.*, 1997, BECCA VIN *et al.*, 1998, VIGUIÉ *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001). De igual modo, os neurónios dopaminérgicos da EM parecem actuar para lá da integração do sinal estrogénico (MALPAUX *et al.*, 1997 e THIÉRY *et al.*, 2002). Por outro lado, há que referir que as alterações da actividade da TH ocorrem independentemente da secreção de PRL (THIÉRY *et al.*, 1995 e MALPAUX *et al.*, 2001). Neste sentido, é possível que a acção dos esteróides sexuais sobre a actividade enzimática da TH seja não-genómica (BECCA VIN *et al.*, 1998 e THIÉRY *et al.*, 2002), mas que resulte da activação desta enzima por fosforilação (BECCA VIN *et al.*, 1998).

Para LEHMAN *et al.* (1996), MALPAUX *et al.* (1996a), LEHMAN *et al.* (1997), BECCA VIN *et al.* (1998) e PARVIZI (2000), os grupos celulares hipotalâmicos – A14 e A15 – são as estruturas dopaminérgicas chave envolvidas no controlo da secreção de LH (via controlo da retroacção negativa exercida pelos esteróides sexuais). A actividade das células destes núcleos diminui imediatamente antes de se produzir um pulso de LH (LEHMAN *et al.*, 1997). Nessa altura, a estimulação eléctrica dos núcleos A14 e A15 inibe o pulso de LH (LEHMAN *et al.*, 1997). Nas ovelhas anéstricas, a lesão neurotóxica do núcleo A15 induz um aumento da frequência de libertação da LH (THIÉRY *et al.*, 1995, MALPAUX *et al.*, 1997 e MALPAUX *et al.*, 2001). Nestas fêmeas, a lesão dos núcleos A14 e A15 reduz a capacidade dos estrogénios inibirem a secreção de LH (LEHMAN *et al.*, 1997 e PARVIZI, 2000). Contudo, quando a lesão destes núcleos é feita durante a estação reprodutiva, a retroacção negativa que os estrogénios exercem sobre a secreção de LH não é afectada (LEHMAN *et al.*, 1997 e PARVIZI, 2000). Nas ovelhas expostas a um regime luminoso de “dias longos”, a administração de estradiol estimula o núcleo A15 a sintetizar e libertar DA (MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 1996a, MALPAUX *et al.*, 1997, BECCA VIN *et al.*, 1998 e GALLEGOS-SANCHEZ *et al.*, 1998). Nestas ovelhas, o estradiol eleva a actividade da TH, numa forma que varia em função da estação do ano (THIÉRY *et al.*, 1995, LEHMAN *et al.*, 1996, BECCA VIN *et al.*, 1998 e THIÉRY *et al.*, 2002). Papel similar foi proposto para o grupo celular dopaminérgico A14 (MALPAUX *et al.*, 1996a, LEHMAN *et al.*, 1997 e MALPAUX *et al.*,

1997). Segundo THIÉRY *et al.* (1995), a capacidade dos estrogénios estimularem a actividade da TH (a nível do núcleo A15) está associada a um aumento específico dos corpos celulares dopaminérgicos e não dos terminais noradrenérgicos presentes neste núcleo. Por outro lado, BECCA VIN *et al.* (1998) afirmam que esta estimulação da actividade da TH não resulta de um aumento da produção desta enzima.

Apesar de se saber que os núcleos dopaminérgicos A14 e A15 estão envolvidos nas diferenças de sensibilidade do hipotálamo face à retroacção negativa exercida pelos esteróides sexuais, continuamos longe de conhecer, com exactidão, o(s) circuito(s) nervoso(s) implicado(s) neste mecanismo. Nos ovinos, parece ser efectivamente pouco provável que os estrogénios estimulem directamente a actividade dopaminérgica (THIÉRY *et al.*, 1995, BECCA VIN *et al.*, 1998 e THIÉRY *et al.*, 2002). Na realidade, apesar dos estrogénios aumentarem a actividade das células dopaminérgicas dos núcleos hipotalâmicos A14 e A15, a maioria destas células, tal como os neurónios GnRH, não possuem receptores para estas hormonas (LEHMAN *et al.*, 1996, LEHMAN *et al.*, 1997, BECCA VIN *et al.*, 1998, PARVIZI, 2000 e SCOTT *et al.*, 2000). Pelo contrário, os neurónios dopaminérgicos e opioidérgicos do grupo celular A12 possuem receptores estrogénicos (BECCA VIN *et al.*, 1998, PARVIZI, 2000 e THIÉRY *et al.*, 2002). Desta forma, é possível que a influencia dos estrogénios sobre os núcleos A14 e A15 se processe via aferências, de neurónios localizados noutras regiões do cérebro (LEHMAN *et al.*, 1996, LEHMAN *et al.*, 1997 e SCOTT *et al.*, 2000). De acordo com THIÉRY *et al.* (1995), os terminais de NOR e de 5-HT são bons candidatos a este papel. Na verdade, o núcleo A15 do hipotálamo é ricamente enervado por células noradrenérgicas e, em menor grau, por células serotoninérgicas (THIÉRY *et al.*, 1995). Após investigações farmacológicas, verificou-se que, durante o período de anestro, os *inputs* noradrenérgicos precedem os *inputs* dopaminérgicos na cascata de eventos que conduz à inibição da secreção de LH (THIÉRY *et al.*, 1995). Ainda que terminais dopaminérgicos entrem em contacto estreito com o corpo celular dos neurónios GnRH localizados na POA (LEHMAN *et al.*, 1996 e LEHMAN *et al.*, 1997), existem estudos que sugerem que eles não têm origem nos núcleos hipotalâmicos A14 e A15 (LEHMAN *et al.*, 1997 e THIÉRY *et al.*, 2002). Na verdade, o núcleo hipotalâmico A15 emite projecções nervosas que apenas foram identificadas na neurohipófise (BECCA VIN *et al.*, 1998 e THIÉRY *et al.*, 2002). O papel destas projecções

permanece desconhecido. THIÉRY *et al.* (2002) levantam a hipótese delas participarem no controlo dopaminérgico de hormonas hipofisárias como a POMC, responsáveis pela possível sincronização de hormonas cuja secreção depende da estação do ano (THIÉRY *et al.*, 2002).

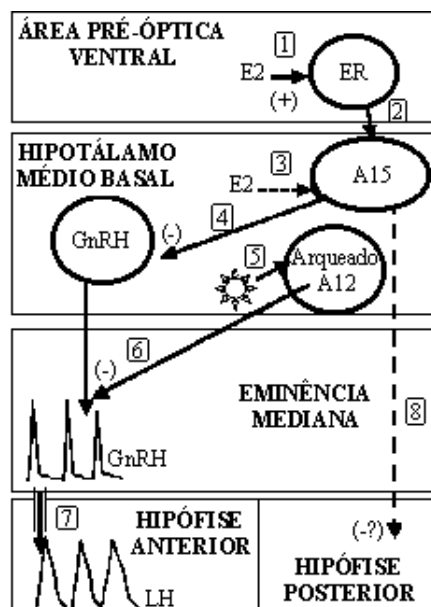


FIGURA 26 – Interações entre sistemas neuronais responsáveis pela inibição da secreção de GnRH/LH em ovelhas sujeitas a um regime fotoperiódico de “dias longos”. O estradiol (E2) actua sobre o núcleo A15, a nível de interneurónios com receptores citosólicos de estradiol (ER), localizados na área pré-óptica ventral (1 e 2) e directamente através de um mecanismo desconhecido (3). Células dopaminérgicas do núcleo A15, depois de activadas, inibem (4) os corpos celulares dos neurónios secretores de GnRH presentes no hipotálamo médio basal e que são responsáveis pela libertação pulsátil de GnRH. Esta via anatómica (4) não foi ainda demonstrada. Sob um regime luminoso de “dias longos”, a activação fotoperiódica das células dopaminérgicas localizadas no hipotálamo médio basal (4), provavelmente das localizadas no núcleo arqueado, inibe a libertação deste péptido a nível dos terminais axónicos (6). A libertação pulsátil de GnRH, sob um controlo dopaminérgico inibidor duplo (4 e 6), determina a libertação pulsátil de LH, a partir da hipófise anterior. A via que liga o núcleo A15 à neurohipófise parece existir (8), mas ainda não lhe foi atribuído qualquer efeito inibidor (THIÉRY *et al.*, 2002).

Nos ovinos, tendo em vista a regulação da secreção pulsátil de LH, o núcleo A15 proporciona possivelmente apenas um sinal *de passage* para a EM (Figura 26), que amplia a actividade inibidora das células dopaminérgicas do núcleo infundibular A12 (mecanismo fotoperíodo-dependente) (THIÉRY *et al.*, 2002). Alternativamente, dados preliminares sugerem a existência de uma ligação entre o núcleo A15 e o corpo celular dos neurónios GnRH localizados na MBH (THIÉRY *et al.*, 2002), potencialmente envolvidos na regulação da secreção pulsátil desta hormona (THIÉRY *et al.*, 2002 e KELLY *et al.*, 2002). A confirmar-se a existência desta ligação, durante o período de anestro sazonal, a inibição da actividade secretora dos neurónios GnRH depende tanto da acção dos seus terminais localizados na EM (provavelmente através de um mecanismo estrogénio-independente), como do efeito que os estrogénios exercem sobre os seus corpos celulares (THIÉRY *et al.*, 2002).

3.5.6.1.2.3 – Serotonina

A 5-HT é um dos neurotransmissores/neuromoduladores cerebrais menos abundante (DIKSIC e YOUNG, 2001). É uma amina biogénica de peso molecular 9,8 pK_a, incapaz de atravessar a barreira hemato-encefálica ou de penetrar nas células, por simples difusão, a partir do meio extracelular (DIKSIC e YOUNG, 2001). Assim, este neurotransmissor tem de ser sintetizado dentro dos neurónios serotoninérgicos (DIKSIC e YOUNG, 2001).

Ao que tudo indica, a 5-HT está envolvida no mecanismo regulador da libertação de LH (THIÉRY *et al.*, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b, KRIDLI e HALLFORD, 1997, KVETNOY *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 2001, FORCADA *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002). Este neurotransmissor estimula a libertação de LH, quando administrado em doses elevadas e inibe-a quando fornecido em doses reduzidas (KRIDLI e HALLFORD, 1997). Nas ovelhas em anestro sazonal, a 5-HT inibe naturalmente a secreção de LH (MALPAUX *et al.*, 1996a,b, MALPAUX *et al.*, 2001, FORCADA *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002). Ao longo desta estação, a injeção intravenosa de um antagonista (ciproheptadina) da 5-HT, a ovelhas ovariectomizadas, não tratadas com estradiol, promove uma estimulação da secreção de LH (THIÉRY *et al.*, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b e KRIDLI e HALLFORD, 1997). Resultados idênticos foram observados em ovelhas ovariectomizadas, tratadas com estradiol (FORCADA *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002). Estes dados sugerem que, ao longo deste período, a 5-HT participa na inibição da secreção de LH através de mecanismos esteróide-dependente (FORCADA *et al.*,

2002) e esteróide-independentes (THIÉRY *et al.*, 1995, FORCADA *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002).

Nos ovinos, o fotoperíodo induz alterações significativas na densidade de receptores serotoninérgicos presentes no hipotálamo (MALPAUX *et al.*, 2001). A ligação da ketanserina tritiada (agente antagonista) é mais elevada na porção ventrolateral do hipotálamo de ovelhas ovariectomizadas, tratadas com um implante de estradiol e sujeitas a um regime luminoso de “dias curtos” (elevada secreção de LH), do que em ovelhas sujeitas a um fotoperíodo de “dias longos” ou refractárias aos “dias curtos” (baixa secreção de LH) (MALPAUX *et al.*, 1996a,b).

Para THIÉRY *et al.* (1995), MALPAUX *et al.* (1996b) e FORCADA *et al.* (2002), a 5-HT parece desempenhar o seu papel inibidor essencialmente durante o estado refractário aos “dias curtos”. Nas ovelhas inteiras, a inibição da síntese de 5-HT provoca um atraso no aparecimento do estado refractário aos “dias curtos” (MALPAUX *et al.*, 1996b). A injeção de ciproheptadina, a ovelhas ovariectomizadas, tratadas com um implante de estradiol e refractárias aos “dias curtos”, estimula a secreção de LH (MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 1996a e KRIDL e HALLFORD, 1997). De igual modo, a injeção de ketanserina a ovelhas refractárias aos “dias curtos” induz uma libertação acentuada de LH (THIÉRY *et al.*, 1995 e MALPAUX *et al.*, 1996a).

3.5.6.1.3 – Ácido- γ -amino-butírico (GABA)

De acordo com KAKEE *et al.* (2001), LYONS *et al.* (2001), GOTTESMANN (2002) e KORPI *et al.* (2002), o GABA é o principal neurotransmissor inibidor do CNS dos mamíferos. A inibição é um processo fundamental da actividade cerebral, pelo que a maior parte das células nervosas cerebrais possuem receptores membranares de GABA (LYONS *et al.*, 2001 e KORPI *et al.*, 2002). O gasto cerebral de energia correlaciona-se negativamente com a activação dos receptores GABA_A (KORPI *et al.*, 2002).

As características secretoras dos neurónios GABAérgicos são influenciadas tanto por factores intrínsecos ao animal (por exemplo, pelas hormonas esteróides), como por factores extrínsecos (dos quais se destaca o fotoperíodo) (ROBINSON, 1995). Contudo, a informação disponível na bibliografia, relativamente aos efeitos da melatonina sobre os neurónios GABAérgicos, é extremamente reduzida. Sabe-se apenas que, nas ratazanas, a administra-

ção de 25-300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de melatonina produz uma acumulação de GABA no hipotálamo, no cerebelo, no córtex cerebral e na glândula pineal (ROSENSTEIN e CARDINAL, 1986). Por outro lado, MORANGOS *et al.* (1981) afirmam que a interacção entre a melatonina e os neurónios GABAérgicos permite explicar alguns dos efeitos farmacológicos desta hormona, como por exemplo o anti-convulsivo, o sedativo e o hipnótico.

Ao que tudo indica, os nervos GABAérgicos participam na mediação dos efeitos que os esteróides sexuais exercem sobre a secreção de GnRH (ROBINSON, 1995, HILEMAN e JACKSON, 1999 e PARVIZI, 2000). Nas ovelhas, os neurónios GABAérgicos presentes na POA possuem receptores estrogénicos (ROBINSON, 1995, PARVIZI, 2000 e KELLY *et al.*, 2002) e formam sinapses com os neurónios GnRH locais (ROBINSON, 1995). Durante o período de anestro, a colocação de implantes subcutâneos de estradiol, em ovelhas inteiras da raça Clun Forest, traduz-se, 13-15 horas mais tarde, na libertação maciça de LH (ROBINSON, 1995). Nestas fêmeas, as concentrações de GABA na POA são muito elevadas nos momentos que se seguem à colocação dos implantes de estradiol, mas caem para valores mínimos nos momentos que antecedem o primeiro aumento da secreção de GnRH/LH (ROBINSON, 1995). Na verdade, Clarke e Robinson (dados não publicados) (citados por ROBINSON, 1995) afirmam que, normalmente, não existe uma associação temporal significativa entre os níveis de GABA na POA e a secreção de LH. Mesmo assim, ROBINSON (1995) e PARVIZI (2000) acreditam que, nas ovelhas, o GABA exerce um efeito inibidor sobre a secreção de LH. Efectivamente, durante a estação reprodutiva, a progesterona parece induzir os neurónios GABAérgicos da POA a inibirem a secreção de LH (PARVIZI, 2000), provavelmente através de um mecanismo mediado pelos EOP (HILEMAN e JACKSON, 1999). De acordo com PARVIZI (2000), estes neurónios medeiam igualmente a acção inibidora dos estrogénios, particularmente importante durante o período de anestro sazonal. Embora se saiba que a testosterona afecta o metabolismo hipotalâmico do GABA na ratazana-macho, esta acção não foi até à data identificada nos carneiros (HILEMAN e JACKSON, 1999).

Nas ratazanas, existe uma via hipotalâmica-GABAérgica directa capaz de condicionar a actividade reprodutora (MARANGOS *et al.*, 1981, MIKLÓS e KOVÁCS, 2002 e MITSUSHIMA *et al.*, 2002). Nestes animais, os neurónios GABAérgicos estão envolvidos na modulação esteróide-dependente da frequência dos pulsos de LH, no controlo prolactinérmico e

na função dos núcleos supraquiasmáticos (particularmente na sincronização dos ritmos reprodutivos endógenos) (MARANGOS *et al.*, 1981 e HILEMAN e JACKSON, 1999). No que concerne à secreção de LH, vários trabalhos permitiram demonstrar que o GABA controla o pulso pré-ovulatório de LH nas ratas fêmeas (MITSUSHIMA *et al.*, 2002).

3.5.6.1.4 – Aminoácidos Excitantes

Ao que tudo indica, nos mamíferos, os aminoácidos excitantes são os principais neurotransmissores estimuladores do CNS (ESTIENNE *et al.*, 1999, STICKER, *et al.*, 2001 e GAZAL *et al.*, 2002). Centralmente, para além de outros efeitos, eles condicionam a secreção hipotalâmica de GnRH e, conseqüentemente, a secreção hipofisária de LH (MALPAUX *et al.*, 1996a, POPWELL *et al.*, 1996, ESTIENNE *et al.*, 1998, ESTIENNE *et al.*, 1999 e GAZAL *et al.*, 2002). Na verdade, os ácidos aspártico (L-aspartato) e glutâmico (L-glutamato), entre outros aminoácidos excitantes, estão envolvidos na tradução da retroacção negativa dos esteróides sexuais e na mediação dos efeitos da melatonina sobre a libertação de GnRH (MALPAUX *et al.*, 1996a, STICKER, *et al.*, 2001 e GAZAL *et al.*, 2002). Nos hamsters, nos ovinos e nos equinos, a injeção de NMDA (agonista dos aminoácidos excitantes) conduz à libertação massiva de LH, quando a actividade gonadotrópica destes animais está a ser inibida pelo fotoperíodo (MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 2001, STICKER *et al.*, 2001, GAZAL *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002). Pelo contrário, a libertação de LH torna-se reduzida ou inexistente, quando o NMDA é injectado em animais que apresentam uma actividade gonadotrópica elevada (MALPAUX *et al.*, 1996b e MALPAUX *et al.*, 2001). Variações idênticas de sensibilidade, face à acção do NMDA, podem ser induzidas através de tratamentos de melatonina (MALPAUX *et al.*, 1996a). Por outro lado, a acção dos aminoácidos excitantes parece ser igualmente esteróide-dependente (ESTIENNE *et al.*, 1999). Enquanto que nos machos inteiros, o N-metil-aspartato (NMA, agonista dos receptores membranares de NMDA) estimula a secreção de LH, nos machos castrados este agonista não produz qualquer efeito significativo (ESTIENNE *et al.*, 1999). Consistentemente, no caso dos machos inteiros, a injeção intravenosa de NMA conduz também a um aumento da secreção de testosterona (mas não de estrogénios) (ESTIENNE *et al.*, 1999).

Nos machos das espécies domesticadas, os aminoácidos excitantes não parecem afectar a secreção de FSH (ESTIENNE *et al.*, 1999). As variações na secreção da LH, em respos-

ta à administração de NMDA, parecem resultar essencialmente de modificações na libertação de GnRH e não de alterações na capacidade de resposta da hipófise face à GnRH (MALPAUX *et al.*, 1996a,b e ESTIENNE *et al.*, 1999). Na realidade, as alterações na libertação de GnRH, induzidas pelo NMDA, poderão apenas significar uma alteração nos *stocks* imediatamente libertáveis de GnRH (estes *stocks* são muito importantes em animais com fraca actividade gonadotrópica) (MALPAUX *et al.*, 1996a,b). Por outro lado, é possível que estas alterações resultem da estimulação endógena dos receptores de NMDA que fazem parte dos mecanismos responsáveis pela acção da melatonina (MALPAUX *et al.*, 1996b). A observação de uma variação na densidade de receptores de NMDA, em resposta ao fotoperíodo, parece favorecer esta segunda possibilidade (MALPAUX *et al.*, 1996b). Alternativamente, ESTIENNE *et al.* (1999) admitem a hipótese dos aminoácidos excitantes condicionarem a secreção de GnRH via outros sistemas neurotransmissores (nomeadamente o catecolamínrgico), igualmente envolvidos no controlo da secreção pulsátil de GnRH.

Os aminoácidos excitantes possuem uma característica comum – uma modificação na sua actividade determina, em poucos minutos, uma alteração na secreção de GnRH (MALPAUX *et al.*, 1996a). Este facto contrasta claramente com o atraso 40-50 dias em relação ao aparecimento dos efeitos da melatonina sobre a secreção de GnRH (MALPAUX *et al.*, 1996a). Assim, ao que tudo indica, este atraso tem origem acima ou dentro dos neurónios GnRH (MALPAUX *et al.*, 1996a). Segundo MALPAUX *et al.* (1996a), uma possível explicação para a ocorrência deste atraso poderá estar relacionada com a existência de modificações estruturais, dentro do CNS, promovidas pela melatonina. Tais rearranjos são sugeridos por diferenças na densidade sináptica dos neurónios da POA (produtores de GnRH), verificada entre as estações reprodutiva e de anestro (MALPAUX *et al.*, 1996a) e pela diferença de densidade dos receptores membranares de 5-HT, observada entre ovelhas foto-estimuladas ou foto-inibidas (MALPAUX *et al.*, 1996a).

3.5.6.1.5 – Hormonas Tiroideias

Nos animais em crescimento, as hormonas tiroideias desempenham um papel crítico na regulação do desenvolvimento de vários órgãos e, posteriormente, no animal adulto, afectam o funcionamento de alguns destes órgãos, através dos efeitos que exercem sobre os processos metabólicos, entre outros (COOKE, 1996). Por exemplo, os testículos são órgãos

cujo desenvolvimento depende da acção directa das hormonas tiroideias (COOKE, 1996 e GERLACH e AURICH, 2000). Nas ratazanas, a 3,5,3'-triiodotironina (T_3) afecta o desenvolvimento neonatal das células de Sertoli (COOKE, 1996). Nestes animais, o hipotiroidismo determina a degenerescência das células germinativas e impede o desenvolvimento destas mesmas células até ao estágio de espermátide (COOKE, 1996). Porém, outros autores afirmam que estas mesmas hormonas não possuem qualquer efeito metabólico sobre os testículos dos animais adultos (COOKE *et al.*, 1996). Na verdade, nestes animais, o hipotiroidismo pouco afecta a morfologia testicular, a produção de testosterona ou o número dos receptores testiculares das hormonas tiroideias (COOKE, 1996). Esta relativa falta de resposta dos testículos dos animais adultos, à acção das hormonas tiroideias, sugere que os conhecidos efeitos inibidores do hipotiroidismo sobre o desenvolvimento testicular (COOKE, 1996) não resultam de uma dependência directa dos testículos relativamente às hormonas tiroideias, mas sim de efeitos secundários relacionados com um decréscimo da secreção de gonadotropinas (COOKE, 1996 e GERLACH e AURICH, 2000).

A T_3 , a tiroxina (T_4), a tireotropina (TRH) e especialmente a hormona estimuladora da tiróide (TSH), exibem um ritmo circadiano de secreção (BARTNESS *et al.*, 2001). Segundo BARTNESS *et al.* (2001), é possível que esta ciclicidade da actividade hormonal relacionada com a tiróide esteja sob o controlo dos SCN. Lesões causadas nos SCN determinam uma redução generalizada dos níveis circulantes de TSH e a alteração do ritmo circadiano de secreção desta hormona (BARTNESS *et al.*, 2001). Os efeitos destas lesões são ainda mais evidentes a nível da secreção de T_3 e T_4 (BARTNESS *et al.*, 2001). Porém, a forma exacta como os SCN afectam a actividade rítmica da tiróide permanece desconhecida (BARTNESS *et al.*, 2001).

Nas aves e nalguns mamíferos (incluindo os ovinos), as hormonas da tiróide são necessárias à cessação da actividade reprodutora sazonal (PARKINSON e FOLLETT, 1994, TUREK e VAN CAUTER, 1994, PARKINSON e FOLLETT, 1995, THRUN *et al.*, 1996, THRUN *et al.*, 1997, TAHA *et al.*, 2000, MALPAUX *et al.*, 2001, THIÉRY *et al.*, 2002, ANDERSON *et al.*, 2003 e ROSA e BRYANT, 2003). De acordo com TUREK e VAN CAUTER (1994) e THRUN *et al.* (1996), as hormonas tiroideias alteram a actividade reprodutora, actuando sobre o sistema neuroendócrino responsável pela secreção de GnRH. Nas ovelhas, a ablação da tiróide mantém a ciclicidade ovárica indefinidamente (PARKINSON e FOLLETT, 1994, KARSCH *et*

al., 1995, PARKINSON e FOLLETT, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b, THRUN *et al.*, 1997, THIÉRY *et al.*, 2002, ANDERSON *et al.*, 2003 e ROSA e BRYANT, 2003). De igual modo, nos carneiros, a tiroidectomia faz desaparecer a sazonalidade reprodutiva (PARKINSON e FOLLETT, 1994, PARKINSON e FOLLETT, 1995, MALPAUX *et al.*, 1996b e ROSA e BRYANT, 2003). No final da estação reprodutiva, a tiroidectomia dos carneiros estimula o crescimento testicular, devido à alteração do padrão de secreção pulsátil de LH e também porque determina uma redução da capacidade da inibina endógena inibir a libertação de FSH (ANDERSON *et al.*, 2003). A administração de T₄ anula os efeitos da tiroidectomia e restabelece a inibição da secreção de LH, no período final da estação sexual (MALPAUX *et al.*, 1996b). Porém, o aumento dos níveis circulantes de T₄ não desencadeia activamente o estabelecimento do anestro (KARSCH *et al.*, 1995). Segundo THRUN *et al.* (1996), para que a estação de reprodução dos ovinos termine, os níveis plasmáticos de hormonas da tiróide têm de ser elevados apenas por um curto período de tempo – no último 1/4-1/5 da estação reprodutiva. Nas ovelhas Suffolk, as concentrações mínimas de tiroxina podem ser observadas no final do Verão e as máximas no final do Inverno, muito próximo do começo do período de anestro (KARSCH *et al.*, 1995). Contudo, a alteração da secreção destas hormonas, *per se*, não determina o fim da estação reprodutiva (THRUN *et al.*, 1996). Por outro lado, as hormonas tiroideias não são necessárias à manutenção do estado de anestro (THRUN *et al.*, 1997). Nas ovelhas, a tiroidectomia, realizada numa fase avançada do período de anestro, não afecta o momento do restabelecimento da época reprodutiva (KARSCH *et al.*, 1995 e THRUN *et al.*, 1997).

A influência da tiroidectomia sobre a actividade reprodutora não parece resultar de alterações no metabolismo dos esteróides sexuais, da perturbação geral dos mecanismos neuroendócrinos de retroacção ligados à reprodução, da disfunção de todos os processos sazonais, da perturbação da via de tradução do sinal fotoperiódico ou da modificação do padrão de secreção da TRH (KARSCH *et al.*, 1995 e ROSA e BRYANT, 2003). Ao que tudo indica, as hormonas tiroideias estão envolvidas no aumento da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário face à retroacção negativa exercida pelos estrogénios (TAHA *et al.*, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003).

As hormonas tiroideias são fundamentais à maturação do sistema nervoso (KARSCH *et al.*, 1995, LEHMAN *et al.*, 1997 e MALPAUX *et al.*, 2001) e estão implicadas em fenómenos

de neuroplasticidade (MALPAUX *et al.*, 1996b, LEHMAN *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003). Segundo MALPAUX *et al.* (1996b) e MALPAUX *et al.* (2001), o papel destas hormonas sobre a regulação sazonal da reprodução poderá ser o de permitir a alteração das estruturas neuronais estimuladas pela acção da melatonina. Contudo, ao que sabemos, o local ou locais de actuação destas hormonas, tendo em vista o controlo da plasticidade sazonal dos neurónios GnRH, permanecem desconhecidos.

3.5.6.1.6 – Plasticidade Sazonal dos Neurónios GnRH

Nas ovelhas, porque a acção dos estrogénios sobre os neurónios GnRH é conduzida por sistemas aferentes, é possível que a transição entre a estação reprodutiva e o período de anestro sazonal e vice-versa esteja ligada a alterações no número de sinapses de entrada nos neurónios GnRH (KENNAWAY e ROWE, 1995, LEHMAN *et al.*, 1997, XIONG *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003). Na POA, efectivamente, os neurónios GnRH recebem mais do dobro do número de sinapses de entrada (por unidade de membrana plasmática) na estação reprodutiva do que no período de anestro (MALPAUX *et al.*, 1996b, LEHMAN *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 2001 e XIONG *et al.*, 1997). Em contraste, neurónios vizinhos não identificados não manifestam qualquer diferença sazonal significativa na sua enervação (LEHMAN *et al.*, 1997 e XIONG *et al.*, 1997).

As modificações sazonais dos neurónios GnRH podem ser observadas tanto em ovelhas intactas como em ovelhas ovariectomizadas tratadas com implantes de estradiol (que fornecem doses constantes de estradiol) (LEHMAN *et al.*, 1997 e XIONG *et al.*, 1997). Neste sentido, estas alterações parecem não estar relacionadas com modificações nos níveis endógenos de esteróides sexuais, mas sim com o fotoperíodo e/ou com um “relógio” circanual endógeno (LEHMAN *et al.*, 1997, XIONG *et al.*, 1997 e MALPAUX *et al.*, 2001). Contudo, LEHMAN *et al.* (1997) admitem a possibilidade dos processos gliais que envolvem os neurónios GnRH participarem em rearranjos morfológicos destes neurónios, induzidos pelos esteróides sexuais.

PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL

1 – MATERIAL E MÉTODOS

1.1 – ESTUDO DA SAZONALIDADE SEXUAL

Durante o ano de 1998, na cidade de Bragança (latitude 41° 49' N, longitude 6° 40' W e altitude 690 metros), mais especificamente na quinta de Santa Apolónia, pertencente à Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB), procurou-se estudar a sazonalidade sexual de 21 carneiros da raça autóctone Churra Galega Bragançana.

Nesta região do país, a curva de variação anual do fotoperíodo é a indicada na Figura 27. Por seu turno, em 1998, a variação mensal da temperatura média do ar foi a indicada na Figura 28. Nesta figura é ainda indicada a variação mensal da temperatura do ar normalizada (médias dos anos de 1951-1980). No Quadro I dos Anexos, são apresentados os valores mensais normalizados da temperatura do ar, da insolação (I), da humidade relativa do ar (HR) e da precipitação total (R) na cidade de Bragança (COSTA, 2003; informação pessoal).

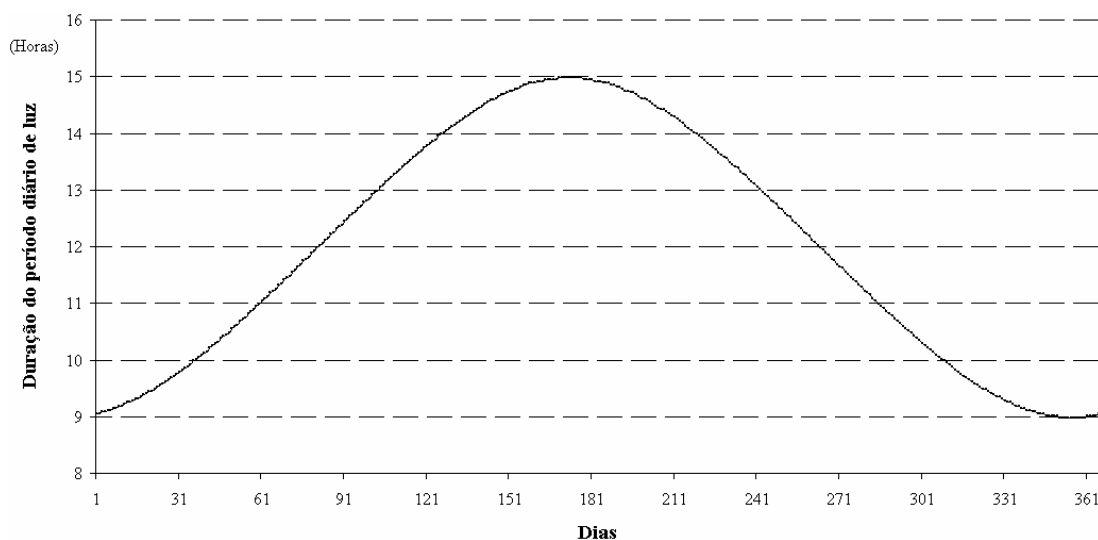


FIGURA 27 – Variação anual do período diário de luz em Bragança.

Todos os carneiros estudados nasceram de parto simples, durante a Primavera. Durante o estabelecimento da puberdade, estes animais foram criados num lote monossexual, separados dos restantes membros do rebanho por cercas de rede, ou seja, sem nunca perderem o contacto visual, olfativo e auditivo com as fêmeas. Com aproximadamente um ano

de idade, estes carneiros começaram a ser treinados, tendo em vista a futura recolha de amostras de sangue e dados relativos ao comportamento sexual e à qualidade seminal. Quando do início deste ensaio, os carneiros tinham cerca de 3 anos de idade.

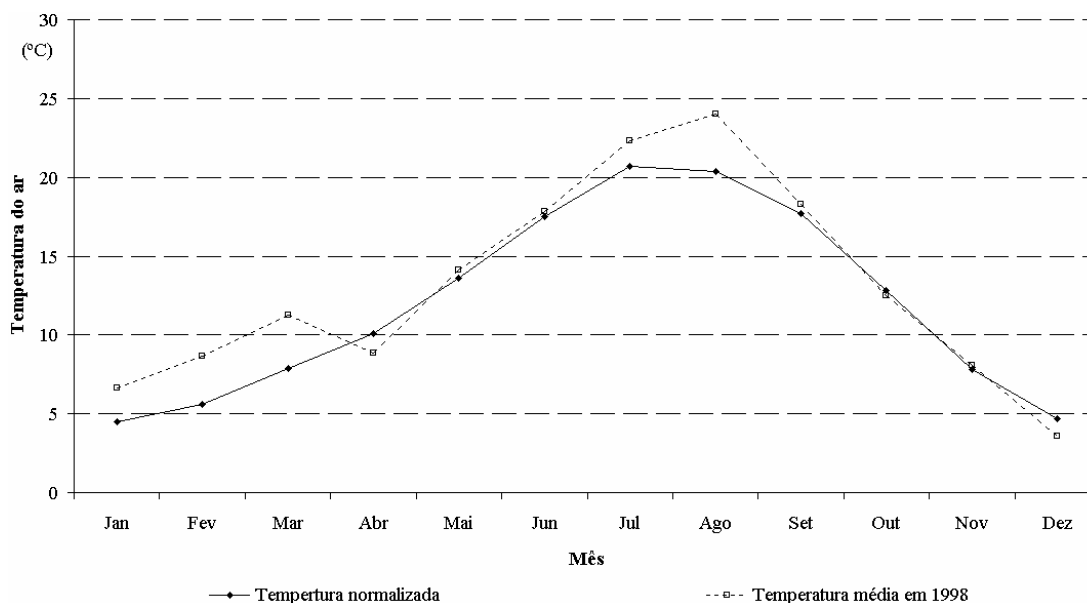


FIGURA 28 – Variação mensal da temperatura média do ar normalizada e no decurso do ano de 1998.

Durante esta parte do ensaio, os carneiros foram alojados num ovelheiro tradicional, num compartimento separado do restante efectivo (com cerca de 100 m²). Estes carneiros foram alimentados, em grupo, com feno de prados naturais (*ad libitum*) e com uma média de 350-400 g/dia de alimento concentrado comercial. A administração do alimento foi sempre feita após a pesagem dos animais e antes de se proceder à recolha de amostras de sangue, à medição do perímetro escrotal e à recolha dos dados relativos às características seminais e ao comportamento sexual. No plano sanitário, os carneiros estudados foram submetidos ao esquema de vacinações e desparasitações em curso na ESAB. A tosquia foi feita na primeira semana do mês de Junho.

1.2 – ESTUDO DA APLICAÇÃO DE TRATAMENTOS DE LUZ E MELATONINA

A fim de estudar os possíveis efeitos da aplicação de um tratamento de luz e de um tratamento com implantes subcutâneos de melatonina, tendo em vista melhorar as capacidades sexuais dos carneiros Churros Bragançanos, no período do ano que se presume ser o

menos favorável (fotoperíodo crescente), procedeu-se ao seu alojamento nas salas com controlo de luz da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). Os carneiros foram transportados para a UTAD no início do mês de Dezembro, cerca de 3 semanas antes do começo da recolha de dados (solstício de Inverno). Desta forma, procurou-se dar aos animais algum tempo para se ambientarem às novas condições de alojamento.

Cada uma das salas com controlo de luz ($\approx 30 \text{ m}^2$) possuía um relógio independente e programável de controlo dos momentos de ligar (amanhecer) e desligar das luzes (pôr-do-sol). Dentro das diferentes salas, a iluminação foi assegurada por lâmpadas de luz branca, que produziam uma intensidade luminosa média, a nível da cabeça dos carneiros, de 300 lux. Cada uma destas salas possuía, igualmente, sistemas independentes de ventilação e de controlo da temperatura do ar, os quais permitiram manter o ambiente dentro das salas “arejado” e com temperaturas que variaram entre os 17 e os 22°C. Por este motivo, no dia seguinte ao da chegada dos carneiros, procedeu-se à sua tosquia completa.

Nos primeiros tempos de permanência na UTAD, o regime alimentar dos carneiros foi igual ao utilizado na ESAB, tal como descrito em 1.1. A partir de 22 de Março, porque se verificou que os carneiros estavam claramente a engordar, reduziu-se o fornecimento de alimento concentrado comercial para uma média de 150-200 g/dia. A administração do alimento foi sempre feita após a pesagem dos animais e antes de se proceder à recolha de amostras de sangue, à medição do perímetro escrotal e à recolha dos dados relativos às características seminais e ao comportamento sexual. No plano sanitário, os carneiros continuaram a ser sujeitos ao esquema de vacinações e desparasitações da ESAB.

1.2.1 – TRATAMENTOS – LUZ E MELATONINA

Entre 1 de Dezembro de 1999 e 21 de Março de 2000, todos os carneiros estudados foram submetidos a um regime luminoso de duração igual à do fotoperíodo natural. Com este procedimento procurou-se prevenir a instalação de um possível estado refractário aos “dias curtos” (ROSA *et al.*, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003).

A partir do dia 22 de Março de 2000, estes carneiros foram divididos em três grupos de 7 animais cada: Testemunha, Luz e Melatonina.

Grupo Testemunha: de 22 de Março a 21 de Junho de 2000, os carneiros continuaram a ser sujeitos a um regime luminoso de duração igual ao do fotoperíodo natural.

Grupo Luz: entre 22 de Março e 21 de Junho de 2000, os carneiros foram submetidos a um regime luminoso de 8 horas de luz : 16 horas de escuridão (8L:16E): “amanhecer” às 7 horas e “pôr-do-sol” às 15 horas.

Grupo Melatonina: a 22 de Março de 2000, cada carneiro deste grupo recebeu três implantes subcutâneos de melatonina (3 x 18 mg; Melovine[®], CEVA Santé Animale S.A., Barcelona, Espanha), conforme indicações especificamente referidas pela CEVA Santé Animale S.A.. Estes carneiros continuaram, no entanto, a ser sujeitos a um regime luminoso de duração igual à do fotoperíodo natural.

1.3 – PESAGEM E DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL

Ao longo deste estudo, os carneiros foram pesados, semanalmente, numa balança com jaula e com uma sensibilidade mínima de 100 gramas.

Quando da realização das pesagens, procedeu-se igualmente à determinação da condição corporal dos carneiros, segundo a técnica de RUSSEL (1969), a qual emprega uma escala que varia entre 1 (extrema magreza) e 5 (obesidade); neste trabalho utilizaram-se intervalos de variação de 0,5 pontos.

1.4 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL

Durante o ano e meio de realização deste ensaio, uma vez por semana, três horas após o amanhecer, a fim de se determinarem os níveis plasmáticos de testosterona total, procedeu-se à recolha de uma amostra de sangue, com o auxílio de tubos de ensaio vacuonizados e heparinizados, através de punção da veia jugular. Nos ovinos, a libertação de LH/testosterona distribui-se igualmente pelas fases luminosa e escura do dia, embora o ritmo de libertação seja baixa ao amanhecer (THIMONIER, 1981 e ORTAVANT *et al.*, 1982) e se eleve nas 3-4 (ORTAVANT *et al.*, 1982) ou 6 horas seguintes (THIMONIER, 1981).

Após a centrifugação do sangue, a 3.000 r.p.m., durante 15 minutos, procedeu-se à separação do sobrenadante, ou seja, do plasma sanguíneo. Este, depois de devidamente identificado e até ao momento do seu processamento, foi armazenado a -80°C. A técnica de RIA utilizada para determinar os níveis plasmáticos de testosterona foi a indicada pelo

fabricante dos *kits* (DPC[®], Los Angeles, EUA). Neste estudo, os coeficientes médios de variação inter e intra-ensaio foram, respectivamente, de 12,8 e 8,3%.

1.5 – DETERMINAÇÃO DO PERÍMETRO ESCROTAL

Neste trabalho o tamanho dos testículos foi estimado através do perímetro escrotal. Este foi determinado, semanalmente, depois de se empurrarem os testículos para o fundo do saco escrotal. Com o auxílio de uma fita métrica flexível envolveram-se ambos os testículos, ao longo do seu eixo antero-posterior, na zona de maior amplitude, incluindo o tecido escrotal (KNIGHT, 1977).

1.6 – DETERMINAÇÃO DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS

Ao longo deste estudo, cada duas semanas, procedeu-se à recolha de uma amostra de sémen por carneiro, com o auxílio de uma vagina artificial. Como modelo utilizou-se uma ovelha ovariectomizada, devidamente imobilizada num tronco de maneio e em cio induzido através da administração intramuscular, cerca de 24 horas antes, de 5 mg de uma suspensão oleosa de benzoato de estradiol (50.000 Unidades Benzóicas Internacionais).

Depois do animal ejacular, o tubo colector foi colocado em banho-maria (37°C), após o que se procedeu ao conjunto de operações descritas nos pontos seguintes.

1.6.1 – VOLUME DO EJACULADO

Como os tubos colectores eram graduados (escala mínima de 0,1 ml), procedeu-se à medição directa do volume de sémen ejaculado.

1.6.2 – CONCENTRAÇÃO DO EJACULADO

Depois de diluído (1:200), o número de espermatozóides existente num mililitro de sémen (concentração espermática) foi estimado com a ajuda de uma câmara de Neubauer melhorada, num microscópio de platina aquecida (37°C), sob uma ampliação de 400X. Posteriormente, multiplicando o volume do ejaculado pela concentração espermática, estimou-se o número total de espermatozóides presentes no ejaculado (concentração do ejaculado).

1.6.3 – MOTILIDADE MASSAL

Depois de colocar uma gota de sémen sobre uma lâmina e de a cobrir com uma lamela de microscópio, sob uma ampliação de 200X, procedeu-se à determinação da motilidade massal (SORENSEN Jr., 1979). A motilidade do sémen foi classificada de acordo com a Tabela 1, proposta por CHEMINEAU *et al.* (1991).

TABELA 1 – Classificação da motilidade massal do sémen

Classificação	Descrição
0	Imobilidade total
1	Movimento individual
2	Movimento massal lento
3	Movimento ondulatório ligeiro, ondas de pequena amplitude
4	Movimento ondulatório rápido, sem redemoinhos
5	Movimento ondulatório rápido, com redemoinhos

1.6.4 – MOTILIDADE INDIVIDUAL

Esta determinação foi realizada sobre uma gota de sémen diluído em soro fisiológico (1:10), colocada entre uma lâmina e uma lamela de microscópio (400X) (SORENSEN Jr., 1979). Pelo menos 100 espermatozóides foram observados e a sua motilidade foi classificada de acordo com a Tabela 2, proposta por CHEMINEAU *et al.* (1991).

TABELA 2 – Classificação da motilidade individual do sémen

Classificação	Descrição
0	Ausência de movimento das células espermáticas
1	Deslocamento muito lento (ou ausência do mesmo), tremura dos espermatozóides, oscilação da cauda
2	Deslocamento muito lento, trémulo, movimentos desorganizados, alguns espermatozóides movendo-se mais depressa
3	Deslocamento curvilíneo dos espermatozóides, sem movimento trémulo
4	Deslocamento rápido, algumas células espermáticas apresentam trajectórias circulares, enquanto que as outras apresentam deslocamentos progressivos
5	Deslocamento rápido e progressivo dos espermatozóides

1.6.5 – PERCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES VIVOS

Depois de se proceder à mistura de uma gota de sémen com duas gotas de corante (eosina-nigrosina), sobre uma lâmina aquecida, procedeu-se à elaboração de um esfregaço (SORENSEN Jr., 1979). A observação deste esfregaço ao microscópio permitiu determinar, por diferença de coloração, a percentagem de espermatozóides vivos (foram aleatoriamente contados, pelo menos, 100 espermatozóides).

1.6.6 – PERCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES NORMAIS

Os espermatozóides foram observados num microscópio de platina aquecida e de contraste de fase, sob uma ampliação de 400X (foram observados, pelo menos, 100 espermatozóides) (SORENSEN Jr., 1979).

1.7 – DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL

Durante este ensaio, quinzenalmente, os carneiros foram colocados individualmente, durante um período 10 minutos, junto de uma ovelha ovariectomizada, devidamente imobilizada num tronco de maneio e com o cio induzido através da administração intramuscular, cerca de 24 horas antes, de 5 mg de uma suspensão oleosa de benzoato de estradiol (50.000 Unidades Benzóicas Internacionais).

Na ESAB, a avaliação do comportamento sexual dos carneiros foi feita num recinto abrigado, com cerca de 50 m². Os carneiros foram introduzidos individualmente junto da ovelha em cio induzido (manequim), aguardando pela sua vez numa manga de maneio que lhes permitia ver antecipadamente o manequim e as cobrições realizadas pelos outros carneiros (a 4-5 metros da fêmea). Dentro do recinto, o manequim foi colocado de modo a que o carneiro em teste ficasse de costas para os restantes carneiros do grupo em estudo.

Na UTAD, o comportamento sexual dos carneiros foi avaliado no corredor que existe fora das salas de controlo de luz (num espaço de 2 x 10 metros). Os carneiros foram introduzidos individualmente junto da ovelha, aguardando pela sua vez dentro das salas com controlo de luz, sem verem antecipadamente a ovelha e as cobrições realizadas pelos outros carneiros. Por outro lado, enquanto realizavam os saltos não viam igualmente os restantes carneiros do grupo.

O tempo de reacção, intervalo de tempo que medeia entre a apresentação da ovelha receptiva e a primeira cópula, foi medido, em segundos, com a ajuda de um cronómetro. Durante os dez minutos que cada carneiro permaneceu, por sessão de recolha de dados, junto da ovelha em cio induzido, foram ainda determinados o número total de cobrições efectuadas, o número de montas realizadas entre as várias cobrições e, com o auxílio de um cronómetro, os intervalos de tempo registados entre cobrições (em segundos).

1.8 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No sentido de identificar diferenças estatisticamente significativas entre parâmetros, efectuaram-se análises de variância (STEEL e TORRIE, 1980). A comparação entre médias realizou-se segundo o teste de Bonferroni/Dunn (DUNN, 1961). Foram ainda feitas análises de regressão e de correlação (STEEL e TORRIE, 1980), a fim de se estabelecerem relações entre alguns dos parâmetros estudados. Com o objectivo de se comparar frequências, utilizou-se o teste de χ^2 (SNEDECOR e COCHRAN, 1980).

2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 – SAZONALIDADE SEXUAL

O estudo da sazonalidade sexual dos carneiros da raça Churra Galega Bragançana foi realizado ao longo do ano de 1998. Durante este período de tempo, estudou-se a variação mensal e sazonal do peso corporal e da condição corporal (CC), dos níveis plasmáticos de testosterona total, do tamanho dos testículos, de várias características seminais e de alguns parâmetros definidores do comportamento sexual destes animais.

2.1.1 – VARIAÇÃO DO PESO E DA CONDIÇÃO CORPORAL

A actividade reprodutora dos animais depende do seu estado nutricional (MARTIN *et al.*, 1990, CURRY *et al.*, 1993, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, PEREZ *et al.*, 1998, CUNNINGHAM *et al.*, 1999, CHILLIARD *et al.*, 1999, BLACHE *et al.*, 2000, HILEMAN *et al.*, 2000, WHITLEY *et al.*, 2000, MARIE *et al.*, 2001, THOMAS *et al.*, 2001, BRANN *et al.*, 2002 e MARTIN *et al.*, 2002). Na verdade, ainda que o fotoperíodo seja o sinal ambiental mais fiável, a pressão selectiva que conduziu à sazonalidade reprodutiva foi exercida pelas disponibilidades naturais de alimentos (MARTIN *et al.*, 1990 e FITZGERALD e MCMANUS, 2000). Uma das formas de avaliar o estado nutricional dos animais é através da determinação do seu peso corporal.

No decurso do ano de 1998, o peso corporal médio dos carneiros Churros Bragançanos foi de $67,0 \pm 10,0$ kg (c.v. = 14,9%). As diferenças de peso corporal observadas entre carneiros revelaram-se estatisticamente significativas ($P \leq 0,001$), ou seja, o grupo de carneiros estudados era, no que a este parâmetro diz respeito, algo heterogéneo. Na realidade, o peso corporal médio do carneiro mais corpulento foi de 82,8 kg, enquanto que o do menos corpulento foi de 45,3 kg. De igual modo, identificaram-se variações mensais (Figura 29) e sazonais (Figura 30) no valor médio deste parâmetro ($P \leq 0,05$). Em termos mensais, o peso corporal médio dos carneiros estudados atingiu o seu valor absoluto máximo em Março e o mínimo em Julho ($72,7 \pm 8,5$ kg vs. $63,1 \pm 10,6$ kg). Entre Janeiro e Março, o peso corporal médio dos carneiros estudados manteve-se elevado ($P > 0,05$). Posteriormente, o valor médio deste parâmetro diminuiu progressivamente, atingindo o seu mínimo no mês de Julho. Nos

meses seguintes verificou-se uma ligeira tendência de recuperação do peso corporal médio, ainda que sem qualquer significado estatístico ($P>0,05$). Nos animais adultos, importantes variações sazonais do peso corporal resultam de alterações nas disponibilidades alimentares (FAULCONNIER *et al.*, 1999 e THIÉRY *et al.*, 2002), no nível de ingestão de alimentos (LINCOLN, 1991, SANZ *et al.*, 1995, FAULCONNIER *et al.*, 1999, PÉNICAUD *et al.*, 2000 e THIÉRY *et al.*, 2002), no metabolismo basal (SANZ *et al.*, 1995 e PÉNICAUD *et al.*, 2000) e/ou nas suas necessidades energéticas (CHILLIARD *et al.*, 1999, FAULCONNIER *et al.*, 1999, DRAZEN *et al.*, 2000, PÉNICAUD *et al.*, 2000 e THIÉRY *et al.*, 2002). Neste trabalho, o manejo alimentar dos carneiros Churros Bragançanos foi sempre o mesmo. Embora possam ter existido variações qualitativas nos alimentos fornecidos, é provável que as pequenas oscilações mensais do peso corporal médio destes carneiros, observadas durante o ano de 1998, se relacionem mais com alterações sazonais nos níveis de ingestão de alimentos, no metabolismo basal ou nas suas necessidades energéticas.

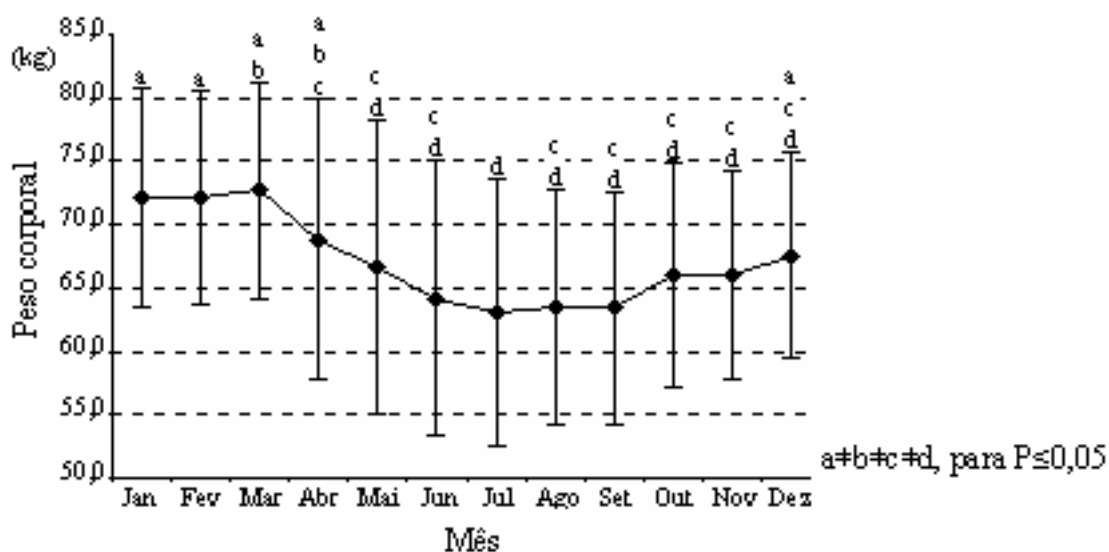


FIGURA 29 – Variação mensal do peso corporal médio (kg) dos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm sd$).

Em muitos mamíferos sazonais, o fotoperíodo afecta os níveis de ingestão de alimentos (FAULCONNIER *et al.*, 1999, LINCOLN, 1991, LINCOLN *et al.*, 2001, MERCER *et al.*, 2001, MARTIN *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e ADAM *et al.*, 2003), a adiposidade (LINCOLN, 1991, MERCER *et al.*, 2001 e THIÉRY *et al.*, 2002) e as necessidades energéticas (FAULCONNIER *et al.*, 1999, LINCOLN *et al.*, 2001 e THIÉRY *et al.*, 2002). Os animais cria-

ram a necessidade adaptativa de armazenarem reservas corporais de energia durante os “dias longos” (Primavera-Verão), fundamentalmente sob a forma de gordura (THIÉRY *et al.*, 2002), quando as disponibilidades naturais de alimento são mais elevadas (BOCQUIER *et al.*, 1998, CHILLIARD *et al.*, 1999, FAULCONNIER *et al.*, 1999 e MERCER *et al.*, 2001). Pelo contrário, durante os “dias curtos” (Outono-Inverno), verifica-se normalmente uma mobilização dessas mesmas reservas (BOCQUIER *et al.*, 1998 e MERCER *et al.*, 2001). À temperatura ambiente cabe igualmente um importante papel na regulação destes mecanismos (SANZ *et al.*, 1995 e VERNON *et al.*, 1999). Nos pequenos ruminantes, o aumento da temperatura ambiente induz um aumento da deposição de gordura (SANZ *et al.*, 1995). Porém, temperaturas muito elevadas, que ultrapassam a zona de conforto térmico, produzem uma redução dos níveis de ingestão voluntária de alimentos (THATCHER e HANSEN, 1993 e SANZ *et al.*, 1995). No presente trabalho, o peso corporal médio dos carneiros Churros Bragançanos foi sempre elevado no Inverno, diminuiu ao longo da Primavera e no início do Verão e só voltou a elevar-se no Outono, altura em que atingiu um valor idêntico ao observado na Primavera (Figura 30).

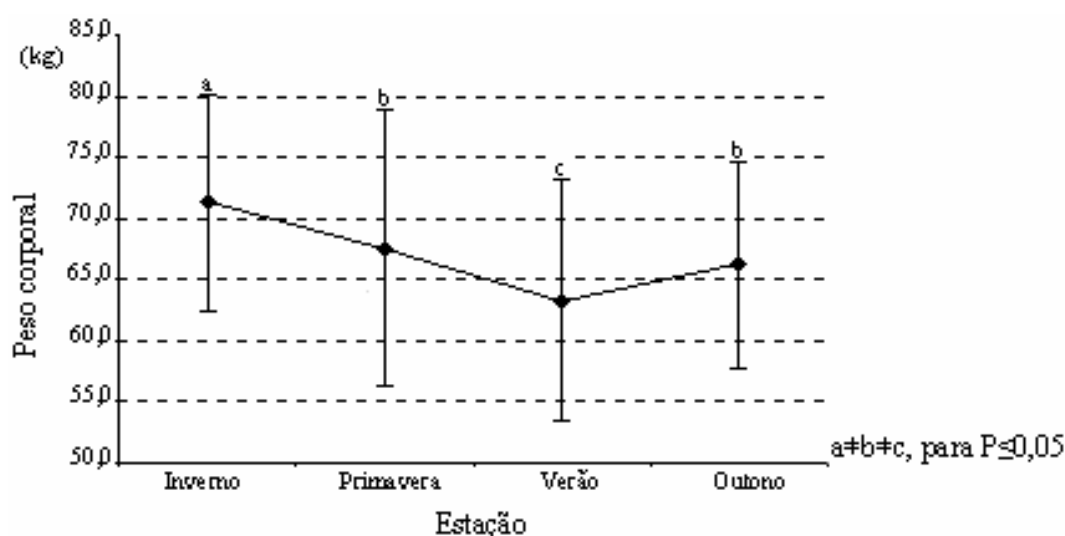


FIGURA 30 – Variação sazonal do peso corporal médio (kg) dos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm sd$).

Estes resultados não se coadunam nada com a tendência de evolução do peso corporal indicada por BOCQUIER *et al.* (1998), FAULCONNIER *et al.* (1999) e CHILLIARD *et al.* (1999), anteriormente descrita. Contudo, há que ter presente que o padrão de adaptação dos

animais ao meio ambiente depende muito deste, ou seja, os mecanismos fisiológicos que permitem aos animais responder aos sinais ambientais estão orientados para a sua sobrevivência e foram incorporados no genoma sob pressão da selecção natural (ORTAVANT *et al.*, 1988 e MARTIN *et al.*, 1990). Mais, ainda que sujeitos às mesmas condições ambientais, os animais de diferentes espécies ou raças podem apresentar diferentes padrões de adaptação (BLACHE *et al.*, 2000). Neste caso, é possível que a curva de variação anual do peso corporal médio dos carneiros estudados, relativamente à dos referidos por BOCQUIER *et al.* (1998), FAULCONNIER *et al.* (1999) e CHILLIARD *et al.* (1999), resulte do facto deles terem sido criados em meios ambientes totalmente distintos (região mediterrânea vs. centro e norte da Europa). Na região mediterrânica, os períodos de maior disponibilidade natural de alimentos são a Primavera e o Outono, pois as temperaturas do ar são mais amenas e a pluviosidade é elevada.

Outra forma de avaliar o estado nutricional de um animal é através da determinação da CC. Em 1998, a CC média dos carneiros estudados foi de 2,9. As variações mensal e sazonal do valor médio deste parâmetro encontram-se representadas na Figura 31.

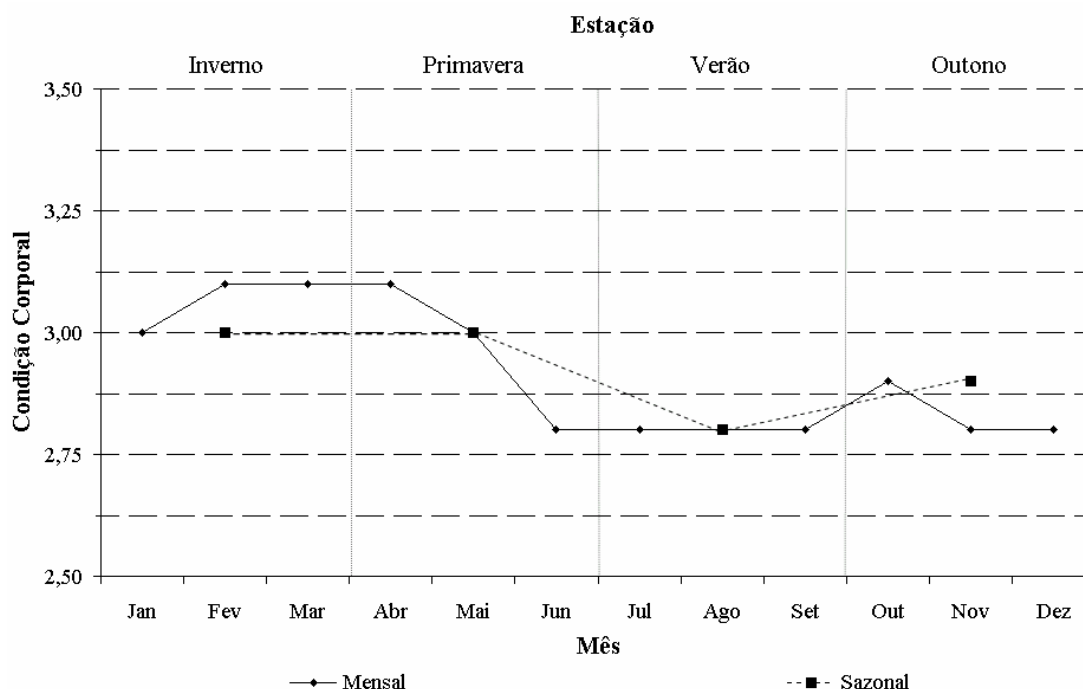


FIGURA 31 – Variação mensal e sazonal da condição corporal média dos carneiros Churros Bragançanos.

Com o intuito de facilitar a análise e a interpretação dos resultados alcançados, procedeu-se ao agrupamento dos carneiros em três classes de CC: $\leq 2,0$ (“magros”), 2,5-3,0 (“normais”) e $\geq 3,5$ (“gordos”). Assim, no decurso do ano de 1998, 0,9% dos registos da CC corresponderam a carneiros “magros”, 88,4% a carneiros “normais” e 10,7% a carneiros “gordos” ($\chi^2 = 203,970$; $P \leq 0,001$), ou seja, na esmagadora maioria das vezes os carneiros apresentaram uma CC “normal”. A CC dos carneiros estudados variou, no entanto, em função do mês e da estação do ano ($P \leq 0,01$). Entre Janeiro e Fevereiro, a CC dos carneiros aumentou de uma forma estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) (Quadro I). De Fevereiro a Abril, as diferenças de CC observadas revelaram-se não significativas ($P > 0,05$). Por seu turno, de Maio a Junho-Julho, registou-se uma diminuição estatisticamente significativa da CC ($P \leq 0,001$). Posteriormente, de Julho a Dezembro, a CC destes carneiros não variou significativamente ($P > 0,05$).

QUADRO I – Variação mensal da distribuição percentual dos carneiros estudados por três classes de condição corporal

Mês	Classes de condição corporal		
	$\leq 2,0$	2,5-3,0	$\geq 3,5$
Janeiro	1,4% ^a	82,6% ^a	16,0% ^a
Fevereiro	0,0% ^b	69,7% ^b	30,3% ^b
Março	1,4% ^c	63,0% ^c	35,6% ^c
Abril	0,0% ^c	66,1% ^c	33,9% ^c
Maio	0,0% ^d	82,1% ^d	17,9% ^d
Junho	4,5% ^e	92,5% ^e	3,0% ^e
Julho	1,1% ^f	98,9% ^f	0,0% ^f
Agosto	0,0% ^g	100,0% ^g	0,0% ^g
Setembro	0,0% ^g	100,0% ^g	0,0% ^g
Outubro	0,0% ^g	100,0% ^g	0,0% ^g
Novembro	0,0% ^g	100,0% ^g	0,0% ^g
Dezembro	2,2% ^h	97,8% ^h	0,0% ^h

a=d, b=c, e=f, e=h, f=g, f=h, g=h, para $P > 0,05$; a≠b, e≠g, c≠d, e≠g, para $P \leq 0,05$; a≠c, a≠d, a≠e, para $P \leq 0,01$; a≠f, a≠g, a≠h, b≠e, b≠f, b≠g, b≠h, c≠e, c≠f, c≠g, c≠h, d≠e, d≠f, d≠g, d≠h, para $P \leq 0,001$ (entre meses).

De acordo com FAULCONNIER *et al.* (1999), a lipogénese eleva-se nos “dias longos” (Primavera-Verão), enquanto que a lipólise aumenta nos “dias curtos” (Outono-Inverno). Em termos de estação do ano, a CC dos carneiros Churros Bragançanos mostrou-se mais elevada no período de Inverno-Primavera (fotoperíodo crescente e temperaturas ambientes mais baixas) do que no de Verão-Outono (fotoperíodo decrescente e temperaturas ambientes mais altas) ($P \leq 0,001$) (Quadro II). Aparentemente, durante o Inverno e início da Primavera (até Abril), as baixas temperaturas ambientes terão contribuído para um aumento dos níveis de ingestão de alimentos e das reservas corporais de energia. Por outro lado, as temperaturas médias do ar, que neste período do ano de 1998 foram ligeiramente superiores às normais e as razoáveis condições de alojamento dos carneiros, terão evitado um aumento mais acentuado das exigências energéticas de manutenção, ajudando à elevação das reservas corporais de energia. A partir de Maio, muito possivelmente devido ao aumento mais marcado da temperatura ambiente, ter-se-á produzido uma redução dos níveis de ingestão de alimentos ou um aumento das exigências energéticas relacionadas com a termorregulação (libertação de calor corporal) e, conseqüentemente, a uma redução das reservas corporais de energia. É provável que estes dados constituam uma resposta adaptativa dos carneiros estudados às condições ambientais locais.

QUADRO II – Variação sazonal da distribuição percentual dos carneiros estudados por três classes de condição corporal

Estação	Classes de condição corporal		
	$\leq 2,0$	2,5-3,0	$\geq 3,5$
Inverno	0,9% ^a	78,5% ^a	20,6% ^a
Primavera	1,4% ^a	75,0% ^a	23,6% ^a
Verão	0,4% ^b	99,6% ^b	0,0% ^b
Outono	0,9% ^b	99,1% ^b	0,0% ^b

a≠b, para $P \leq 0,001$ (entre estações).

No decurso de 1998, às diferentes classes de CC consideradas corresponderam diferentes pesos corporais médios: $\leq 2,0$ – $57,4 \pm 10,1$ kg, 2,5-3,0 – $65,9 \pm 9,7$ kg e $\geq 3,5$ – $77,3 \pm 5,6$ kg ($P \leq 0,001$). Contudo, estes dois parâmetros evoluíram de uma forma algo dife-

rente ao longo do ano. Segundo RUSSEL *et al.* (1969), TEIXEIRA *et al.* (1989) e CALDEIRA (1998), o estado nutricional dos ruminantes é melhor estimado pela CC do que pelo peso corporal, uma vez que este último é influenciado pelo peso dos conteúdos gástricos, particularmente do ruminal. Na verdade, há que não esquecer que os carneiros estudados foram sempre alimentados *ad libitum* com feno de prados naturais.

2.1.1.1 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E SECREÇÃO DE TESTOSTERONA TOTAL

Nos machos, a libertação de um pulso hipotalâmico de GnRH leva a hipófise a segregar um pulso de LH (SIMÕES, 1984, WEBSTER *et al.*, 1991, HILEMAN e JACKSON, 1999, THIÉRY *et al.*, 2002 e ANDERSON *et al.*, 2003) que, por sua vez, estimula os testículos a segregar um pulso de testosterona (PELLETIER *et al.*, 1982, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, GONZALEZ *et al.*, 1988, ORTAVANT *et al.*, 1988, MARTIN *et al.*, 1990, TILBROOK e CAMERON, 1990, WEBSTER *et al.*, 1991, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, GORDON, 1997 e HILEMAN e JACKSON, 1999), cerca de 1 hora mais tarde (THIMONIER, 1981). Contudo, a amplitude da resposta testicular (em termos de secreção de testosterona) à LH varia marcadamente ao longo do ano (FALVO *et al.*, 1975 e PELLETIER e ALMEIDA, 1987). Assim, por exemplo, a altura do ano em que os níveis plasmáticos de LH e de testosterona são máximos não são coincidentes, sendo que os primeiros precedem os segundos (PELLETIER e ALMEIDA, 1987) em algumas semanas.

Nos carneiros, a suplementação alimentar eleva, no prazo de poucos dias, a frequência de secreção de LH (MARTIN *et al.*, 1990, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995 e ADAM *et al.*, 2003). Posteriormente, esta manter-se-á elevada enquanto a dieta administrada continuar a ser de alto valor nutritivo (MARTIN *et al.*, 1990 e MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995). Pelo contrário, baixos planos nutricionais reduzem a secreção de LH (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, CUNNINGHAM *et al.*, 1999 e ADAM *et al.*, 2003) que, no entanto, algumas semanas depois volta aos valores controlo (quando os animais deixam de perder massa corporal) (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995 e CUNNINGHAM *et al.*, 1999). Porém, TILBROOK e CAMERON (1990) e MARTIN e WALKDEN-BROWN (1995) afirmam que a alteração dos níveis nutricionais dos ovinos não modifica os seus níveis plasmáticos de testosterona, excepto em situações extremas (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995).

Neste estudo, efectivamente, nem o peso corporal nem a CC (Quadro III) dos carneiros Churros Bragançanos influenciaram significativamente os níveis plasmáticos de testosterona total ($P > 0,05$).

QUADRO III – Níveis plasmáticos médios de testosterona total (ng/ml) dos carneiros estudados, tendo em conta a sua classe de condição corporal

Condição corporal	Níveis plasmáticos de testosterona total (ng/ml) ($\bar{x} \pm s$) (c.v.)
$\leq 2,0$	$3,6^a \pm 2,6$ (71,6%)
2,5-3,0	$2,5^a \pm 2,4$ (95,0%)
$\geq 3,5$	$1,9^a \pm 2,1$ (109,2%)

a=a, para $P > 0,05$ (entre classes de CC).

2.1.1.2 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E TAMANHO DOS TESTÍCULOS

Nos ovinos, o peso corporal correlaciona-se, positivamente, com o tamanho dos testículos (KNIGHT, 1977, MARTIN *et al.*, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, ROBINSON, 1996, GORDON, 1997, PÉREZ *et al.*, 1998, MARTIN *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e BETTENCOURT *et al.*, 2003), embora o valor desta correlação varie em função da raça considerada (PÉREZ *et al.*, 1998). No trabalho desenvolvido por PÉREZ *et al.* (1998), a relação encontrada entre o peso corporal e o tamanho dos testículos foi mais elevada entre os carneiros Merino ($r^2 = 0,68$) do que entre os carneiros Corriedale ($r^2 = 0,33$) (PÉREZ *et al.*, 1998). Nos carneiros, a modificação do estado nutricional pode rapidamente ditar (em apenas alguns dias) uma alteração da massa testicular, que pode mesmo ser superior à correspondente ao peso corporal (MARTIN *et al.*, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995 e SALHAB *et al.*, 2001). O plano nutricional afecta tanto o desenvolvimento dos tubos seminíferos (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995), como o do próprio parênquima testicular (O'DONNELL *et al.*, 2001). Ao que tudo indica, a nutrição afecta o crescimento testicular, essencialmente, através da denominada via GnRH-dependente, ou seja, alterando sucessivamente a frequência de libertação de GnRH (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, GORDON, 1997 e HILEMAN e JACKSON,

1999), de LH (MARTIN *et al.*, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, GORDON, 1997, HILEMAN e JACKSON, 1999 e BLACHE *et al.*, 2000) e de testosterona (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, GORDON, 1997 e HILEMAN e JACKSON, 1999). Os níveis plasmáticos de FSH também se modificam (MARTIN *et al.*, 1990). Contudo, há também indícios da existência de uma ou mais vias GnRH-independentes (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, MADDOCKS *et al.*, 1995, GORDON, 1997 e MARTIN *et al.*, 2002).

QUADRO IV – Perímetro escrotal médio (cm) dos carneiros estudados, tendo em conta a sua classe de condição corporal

Condição corporal	Perímetro escrotal médio (cm) ($\bar{x} \pm s$) (c.v.)
$\leq 2,0$	$28,4^{a,b} \pm 2,2$ (78,0%)
2,5-3,0	$29,5^a \pm 3,0$ (102,0%)
$\geq 3,5$	$30,6^b \pm 2,1$ (60,0%)

a $\neq$ b, para P>0,05 (entre classes de CC).

Neste ensaio, o peso corporal dos carneiros Churros Bragançanos correlacionou-se, positivamente, com o tamanho dos seus testículos ($r = 0,606$; $P \leq 0,001$), embora a expressividade desta correlação tenha sido algo reduzida (36,7%); semelhante à observada por PÉREZ *et al.* (1998), em carneiros Corriedale (33,0%). De igual modo, a CC afectou significativamente o tamanho dos testículos destes carneiros ($P \leq 0,05$) (Quadro IV).

2.1.1.3 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E PRODUÇÃO SEMINAL

Nos pequenos ruminantes existe uma forte ligação entre o plano nutricional, a massa testicular (LINDSAY *et al.*, 1984, ORTAVANT *et al.*, 1988, CHEMINEAU *et al.*, 1991, MARTIN *et al.*, 1990, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, ROBINSON, 1996 e ROSA e BRYANT, 2003) e a produção espermática (CHEMINEAU *et al.*, 1991, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, ROBINSON, 1996, MARTIN *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Nos carneiros, as alterações nutricionais afectam, não só a massa testicular, como também a

eficiência com que os gâmetas são produzidos (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995 e MARTIN *et al.*, 2002). Este último efeito é mesmo superior ao exercido sobre a massa testicular (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995). Contudo, autores como FERNANDEZ-ABELLA *et al.* (1999) não encontraram qualquer correlação significativa entre o peso corporal e a produção espermática de carneiros Corriedale e Merino Australiano. É que o número de espermatozóides ejaculados só se eleva algumas semanas após a modificação da dieta [5-10 semanas (CHEMINEAU *et al.*, 1991), 6-7 semanas (ROBINSON, 1996) ou 7 semanas (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995)], sugerindo que esta só se faz sentir após a última divisão espermatogónica (COUROT e ORTAVANT, 1981, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995 e ROBINSON, 1996). Ao que tudo indica, a dieta altera a produção espermática através dos efeitos que exerce sobre as células de Sertoli (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995) e consequentemente sobre as células germinativas que suportam (ROBINSON, 1996). Por outro lado, Robinson (1981) (citado por ROSA e BRYANT, 2003) afirma que os efeitos da subalimentação sobre a actividade reprodutora dos ovinos só se tornam detectáveis quando esta é superior a 15% das suas necessidades de manutenção. Se a subalimentação pode afectar seriamente a produção quantitativa de espermatozóides, a qualidade do sémen ejaculado parece não sofrer qualquer tipo de efeito negativo (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

Neste trabalho, o peso corporal dos carneiros Churros Bragançanos não afectou significativamente a generalidade dos parâmetros seminais estudados ($P > 0,05$). Apenas o volume ($r = 0,194$; $P \leq 0,001$) e a concentração do ejaculado ($r = 0,178$; $P \leq 0,001$) se correlacionaram significativamente com o peso corporal determinado na mesma altura; a expressividade destas correlações revelou-se, no entanto, extremamente reduzida (3,8% e 3,2%, respectivamente). Por seu turno, nenhum dos parâmetros seminais avaliados foi significativamente influenciado pelo peso corporal determinado 8 semanas antes ($P > 0,05$). A condição corporal, determinada na mesma altura ou 8 semanas antes, não afectou significativamente a quantidade ou a qualidade do sémen produzido ($P > 0,05$). Neste sentido, os efeitos do estado nutricional sobre a produção seminal terão sido extremamente baixos. Este facto não nos surpreendeu, uma vez que a dieta a que estes animais foram sujeitos parece não ter provocado alterações sérias do seu peso ou da sua CC.

2.1.1.4 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E COMPORTAMENTO SEXUAL

Dos vários parâmetros comportamentais estudados, o peso corporal dos carneiros Churros Bragançanos apenas se correlacionou significativamente com o tempo de reacção médio ($r = 0,114$; $P \leq 0,05$). Porém, a expressividade desta correlação revelou-se extremamente baixa (1,3%). Por seu turno, a CC apresentada pelos carneiros não condicionou significativamente nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados ($P > 0,05$). Estes resultados indicam que os efeitos do estado nutricional sobre o comportamento sexual foram extremamente reduzidos. Esta situação não nos surpreendeu, uma vez que a esmagadora maioria destes carneiros apresentou sistematicamente um estado nutricional “adequado” ao normal desenrolar da actividade sexual. Na verdade, MICKELSEN *et al.* (1982), TILBROOK e CAMERON (1990), FABRE-NYS (2000) e BENCH *et al.* (2001) afirmam que o estado nutricional, de um modo geral, não altera o desempenho sexual dos animais, a menos que estes sejam sujeitos a uma privação severa (TILBROOK e CAMERON, 1990 e CHEMINEAU *et al.*, 1991) ou a um excesso acentuado de nutrientes (TILBROOK e CAMERON, 1990). Nestas situações, a alteração do comportamento sexual resultará, fundamentalmente, de modificações na aptidão física dos carneiros (TILBROOK e CAMERON, 1990). Por outro lado, há que não esquecer que o comportamento sexual é, normalmente, muito variável.

2.1.2 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL

De acordo com os múltiplos estudos realizados por investigadores franceses e australianos, o carneiro é um reprodutor sazonal que apresenta níveis máximos de actividade sexual nos finais do Verão e no Outono (fotoperíodo decrescente) e mínimos no Inverno-Primavera (fotoperíodo crescente) (MASCARANHAS *et al.*, 1980, THIMONIER, 1981, FOLCH, 1983, LINDSAY *et al.*, 1984, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, VIJIL, 1989, MARTIN *et al.*, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, THATCHER e HANSEN, 1993, GERLACH e AURICH, 2000, KAYA *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Os factores ambientais condicionam a fisiologia da reprodução, fundamentalmente, através dos efeitos que exercem sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas.

Em geral, os níveis circulantes de testosterona dos carneiros variam ao longo do ano (DARBEÏDA e BRUDIEUX, 1980, MASCARANHAS *et al.*, 1980, THIMONIER, 1981, FOLCH, 1983, BOLAND *et al.*, 1985, CHEMINEAU *et al.*, 1991, BORQUE e SAGÜÉS, 1993, PÉREZ *et*

al., 1998, HILEMAN e JACKSON, 1999, SÁNCHEZ e FERRERO, 1999, ROSA *et al.*, 2000, TAHA *et al.*, 2000, EL-ALAMY *et al.*, 2001, PARTHASARATHY *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Nestes animais, o fotoperíodo decrescente estimula a secreção de testosterona (MASCARANHAS *et al.*, 1980, GOODMAN e KARSCH, 1981, THIMONIER, 1981, PELLETIER *et al.*, 1982, FOLCH, 1983, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, GERLACH e AURICH, 2000, ROSA *et al.*, 2000, TAHA *et al.*, 2000, EL-ALAMY *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003) e o fotoperíodo crescente inibe-a (MASCARANHAS *et al.*, 1980, GOODMAN e KARSCH, 1981, THIMONIER, 1981, LINCOLN e ALMEIDA, 1982, PELLETIER *et al.*, 1982, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, GERLACH e AURICH, 2000, ROSA *et al.*, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003). Contudo, podem existir importantes variações raciais (DARBEÏDA e BRUDIEUX, 1980, THIMONIER, 1981, PELLETIER *et al.*, 1982, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, PÉREZ *et al.*, 1998, TAHA *et al.*, 2000 e MARTIN *et al.*, 2002). Na verdade, enquanto que nalgumas raças (Ile-de-France e Préalpes-du-Sud) os níveis plasmáticos de testosterona começam a elevar-se sensivelmente a meio da Primavera (fotoperíodo crescente), noutras isso só acontece por volta do solstício de Verão (Suffolk, Merino, Polled Dorset, Romney e Soay) (PELLETIER e ALMEIDA, 1987). No caso dos carneiros Finnish Landrace, os níveis circulantes de testosterona só começam a aumentar em Setembro (PELLETIER e ALMEIDA, 1987). Na Argélia, os níveis plasmáticos de testosterona da raça local Ouled-Djellal começam a elevar-se no Inverno, atingem os seus valores máximos no início do Verão e os mínimos a meio do Outono (DARBEÏDA e BRUDIEUX, 1980 e PELLETIER e ALMEIDA, 1987). No Egipto, os níveis séricos de testosterona dos carneiros Awassi (provenientes de populações sírias e egípcias) e Barki (raça egípcia) elevam-se rápida e acentuadamente na Primavera, atingem os seus valores máximos ainda na Primavera e durante o Verão e são mínimos no Inverno (TAHA *et al.*, 2000). Finalmente, há que referir que, no Uruguai, os níveis séricos de testosterona dos carneiros Corriedale e Merino Australiano não variam significativamente entre a Primavera e o Outono (FERNANDEZ-ABELLA *et al.*, 1999). Estas diferenças podem ser apenas raciais ou resultarem de processos de adaptação dos animais às condições ambientais ou de exploração locais. Assim, por exemplo, refira-se o facto da estação reprodutiva das ovelhas exploradas no Norte de África ser no Verão, para que as crias nasçam no Inverno, altura do ano em que as disponibilidades naturais de alimentos são mais elevadas (TAHA *et al.*, 2000). Para satisfazerem este imperativo, os carneiros Ouled-Djellal e os carneiros Awassi e Barki parecem ter

adoptado diferentes estratégias. Enquanto que os primeiros começam a elevar progressivamente os seus níveis circulantes de testosterona a meio do Inverno, os segundos elevam-nos rápida e drasticamente durante a Primavera (TAHA *et al.*, 2000).

Neste estudo, o valor médio anual dos níveis plasmáticos de testosterona total foi de $2,46 \pm 2,37$ ng/ml (c.v. = 96,1%). As diferenças encontradas entre carneiros mostraram-se sempre muito elevadas ($P \leq 0,001$). Este facto foi igualmente observado por DARBEÏDA e BRUDIEUX (1980), em carneiros da raça argelina Ouled-Djellal. PELLETIER *et al.* (1982) afirmam que a secreção de testosterona é claramente afectada pelo genótipo de cada carneiro. A variação mensal dos níveis plasmáticos médios desta hormona revelou-se, genericamente, estatisticamente não significativa ($P > 0,05$) (Figura 32); apenas o valor observado em Março foi estatisticamente inferior ao registado em Novembro ($1,9 \pm 2,1$ ng/ml vs. $3,2 \pm 2,5$ ng/ml; $P \leq 0,001$). Este resultado pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo facto dos coeficientes de variação mensal deste parâmetro terem sido sempre muito elevados ($73,2 \geq \text{c.v.mensal} \leq 121,5\%$).

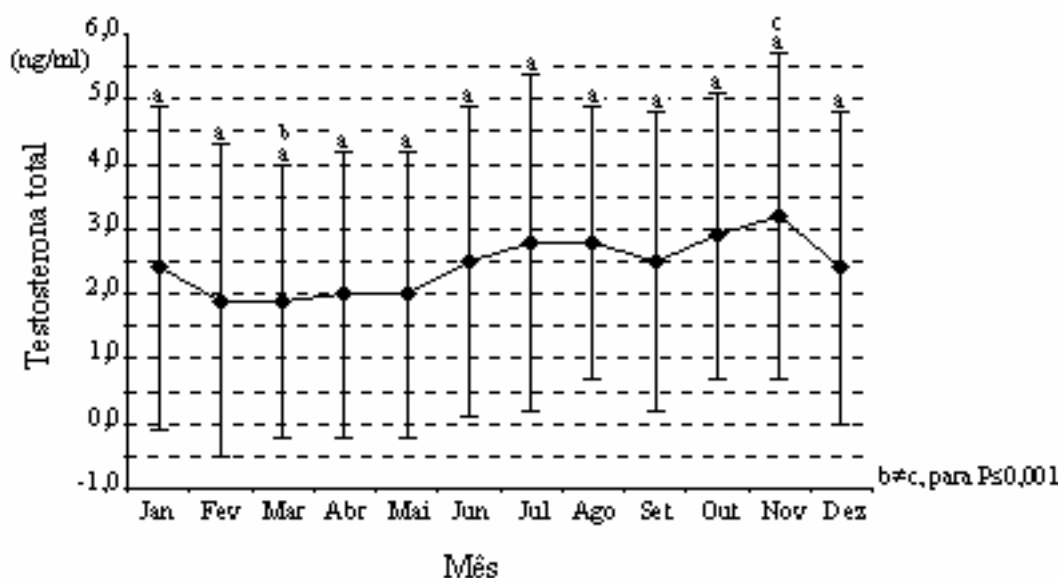


FIGURA 32 – Variação mensal dos níveis plasmáticos médios (ng/ml) de testosterona total dos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm \text{sd}$).

Já do ponto de vista sazonal (Figura 33), os níveis plasmáticos médios de testosterona total mostraram-se estatisticamente mais baixos no Inverno-Primavera (fotoperíodo cres-

cente) do que no Verão-Outono (fotoperíodo decrescente) ($P \leq 0,05$), ou seja, seguindo o padrão de evolução indicado pela generalidade dos autores consultados.

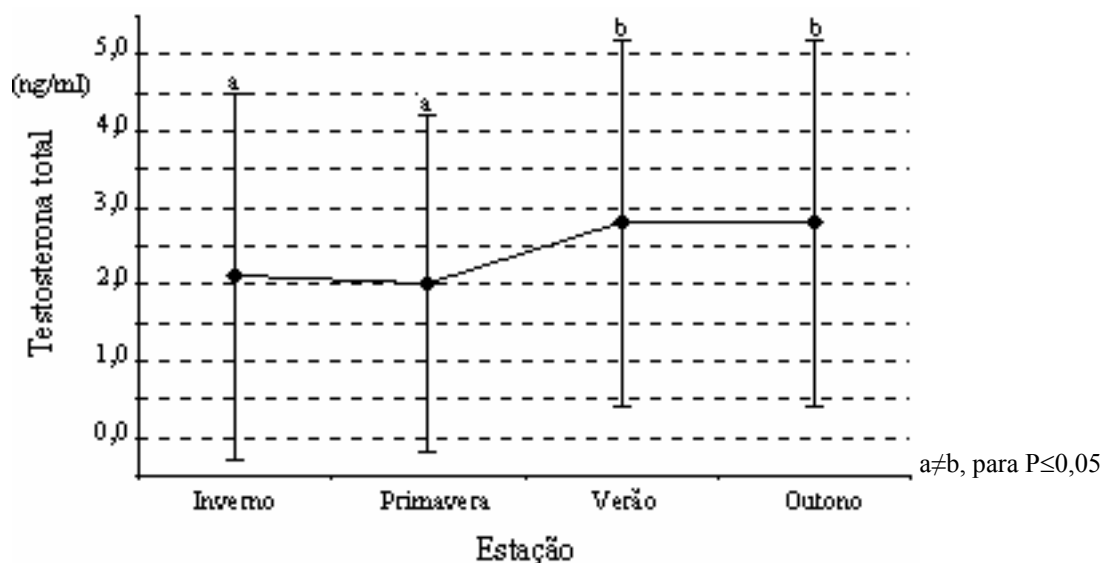


FIGURA 33 – Variação sazonal dos níveis plasmáticos médios (ng/ml) de testosterona total dos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm sd$).

A metodologia usada neste trabalho com o intuito de estudar a variação mensal e sazonal dos níveis plasmáticos de testosterona total (uma recolha de sangue por semana) foi idêntica à utilizada por vários investigadores (DARBEÏDA e BRUDIEUX, 1980, HOWLES *et al.*, 1980, MASCARANHAS *et al.*, 1980, BOLAND *et al.*, 1985 e ROSA *et al.*, 2000). Porém, ela não é particularmente sensível, dado que a secreção desta hormona é pulsátil e produz-se segundo um ritmo circadiano (THIMONIER, 1981 e ORTAVANT *et al.*, 1982). A fim de aumentar esta sensibilidade, diferentes investigadores adoptaram diferentes esquemas temporais de recolha de amostras de sangue. LINCOLN e ALMEIDA (1982) recolheram uma amostra de sangue/carneiro, duas vezes por semana. LINCOLN e DAVIDSON (1977) procederam à recolha de uma amostra de sangue/carneiro, três vezes por semana. PÉREZ *et al.* (1998) recolheram, uma vez por semana, com uma hora de intervalo, 3 amostras de sangue/carneiro. FALVO *et al.* (1975) procederam à recolha, uma vez por semana, cada duas horas, durante 24 horas, de 13 amostras de sangue/carneiro. Por seu turno, PELLETIER *et al.* (1982) e ORTAVANT *et al.* (1982) recolheram, uma vez por semana, de hora a hora, durante 24 horas, 25 amostras de sangue/carneiro. PELLETIER (1986) recolheu uma amostra de san-

gue/carneiro, cada 40 minutos, durante 10 horas consecutivas. EL-ALAMY *et al.* (2001) procederam à recolha, de meia em meia hora, durante 2 horas e meia, de 6 amostras de sangue/carneiro. FERNANDEZ-ABELLA *et al.* (1999) recolheram, de 20 em 20 minutos, durante 4 a 6 horas, 13-19 amostras de sangue/carneiro. POULTON *et al.* (1987) procederam à recolha de uma amostra de sangue/carneiro, cada 20 minutos, durante 8 horas seguidas.

2.1.2.1 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS DE TESTOSTERONA TOTAL E TAMANHO DOS TESTÍCULOS

Nos ovinos, a actividade testicular é fundamentalmente controlada pelas gonadotropinas hipofisárias e também pela testosterona (COUROT e ORTAVANT, 1981, MARTIN *et al.*, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, MADDOCKS *et al.*, 1995, MCLACHLAN *et al.*, 1996 e GORDON, 1997). Nestes animais, as variações sazonais do tamanho dos testículos correlacionam-se significativamente com os níveis circulantes e particularmente com a frequência dos pulsos de LH/testosterona (THIMONIER, 1981, COUROT e ORTAVANT, 1981, ORTAVANT *et al.*, 1982, LINDSAY *et al.*, 1984, SIMÕES, 1984, PELLETIER, 1986, ORTAVANT *et al.*, 1988, CHEMINEAU *et al.*, 1991, XU *et al.*, 1993, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, MARTIN *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002) e menos acentuadamente com os de FSH (COUROT e ORTAVANT, 1981, BARRELL *et al.*, 1985, ORTAVANT *et al.*, 1988 e CHEMINEAU *et al.*, 1991). O aumento do tamanho testicular torna-se detectável 1 (COUROT e ORTAVANT, 1981) a 3 (LINCOLN, 1976, COUROT e ORTAVANT, 1981 e THIMONIER, 1981) semanas após a elevação da frequência de secreção de LH/testosterona, embora a correlação entre estes parâmetros só seja máxima quando se compara o tamanho dos testículos determinado hoje com a frequência de libertação de LH/testosterona de há 6-8 (COUROT e ORTAVANT, 1981) ou 12 semanas atrás (VIJIL, 1986 e VIJIL, 1989). Porém, MARTIN e WALKDEN-BROWN (1995) afirmam que, nos ovinos, não é normalmente possível estabelecer uma relação directa entre os níveis circulantes de testosterona e o tamanho dos testículos. De facto, nestes animais, o crescimento testicular parece não depender da acção exclusiva desta hormona (COUROT e ORTAVANT, 1981 e O'DONNELL *et al.*, 2001), mas sim da acção parácrina e autócrina de múltiplos factores produzidos localmente – androgénios, estrogénios, inhibina, activina, transferrina, IGF-I (factor de crescimento da insulina I), ABP (proteína de ligação aos androgénios), várias outras citocinas, etc. (MADDOCKS *et al.*, 1995). No nos-

so ensaio, o tamanho dos testículos dos carneiros Churros Bragançanos não se correlacionou significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total, determinados na mesma altura ou 8 semanas antes ($P>0,05$).

2.1.2.2 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS DE TESTOSTERONA TOTAL E PRODUÇÃO SEMINAL

Nos carneiros, a espermatogénese é essencialmente controlada pela secreção pulsátil das gonadotropinas hipofisárias FSH e LH (COUROT e ORTAVANT, 1981, GOODMAN e KARSCH, 1981, LINCOLN *et al.*, 1981, SIMÕES, 1984, ORTAVANT *et al.*, 1987, CAMERON e TILBROOK, 1990, THATCHER e HANSEN, 1993, MCLACHLAN *et al.*, 1996, ANDERSON *et al.*, 2003 e SAUNDERS, 2003). Contudo, variadíssimos factores locais exercem igualmente uma forte acção sobre a espermatogénese (MADDOCKS *et al.*, 1995 e JOHNSON *et al.*, 2001). A carência de gonadotropinas determina uma redução acentuada do número de células germinativas (SAUNDERS, 2003). A LH é responsável pela renovação das células germinativas primordiais (CHEMINEAU *et al.*, 1991 e WOOLVERIDGE *et al.*, 1999). Por seu turno, no decurso da espermatogénese, a FSH controla as transformações entre as fases de espermatogónia intermédia e espermátócito primário (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Nos ovinos, a imunização contra a FSH, mas não contra a LH, diminui acentuadamente a produção espermática, pois reduz a produção diária de espermatogónias B2 e de espermátócitos nas fases de leptóteno e de paquíteno (GORDON, 1997). Nestes animais, a testosterona é relativamente ineficaz no suporte das divisões espermatogónicas (COUROT e ORTAVANT, 1981). CHEMINEAU *et al.* (1991) e MCLACHLAN *et al.* (1996) afirmam que esta hormona é responsável pela manutenção da produção de espermátócitos primários e de espermátídeos. Nos carneiros, ao contrário do que sucede nas ratazanas, a testosterona *per se* é incapaz de manter a produção espermática (COUROT e ORTAVANT, 1981 e O'DONNELL *et al.*, 2001).

Nos carneiros Merino Branco, Merino Preto e Campaniça, os níveis séricos de testosterona correlacionam-se significativamente com a concentração do ejaculado, mas não com o volume seminal e as motilidades massal e individual (BETTENCOURT *et al.*, 2003). No presente trabalho, a quantidade e a qualidade do sémen produzido pelos carneiros Churros Bragançanos não foram significativamente condicionadas pelos níveis plasmáticos de testosterona total, determinados na mesma altura ou 8 semanas antes ($P>0,05$).

2.1.2.3 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS MÉDIOS DE TESTOSTERONA TOTAL E COMPORTAMENTO SEXUAL

O controlo neuroendócrino do comportamento sexual continua a ser um assunto pouco conhecido e por isso mesmo muito controverso. Ao certo, sabe-se que ele depende do equilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-testículos (SIMÕES, 1984, MCLACHLAN *et al.*, 1996, GORDON, 1997, SÁNCHEZ e VICENTE, 1999, FABRE-NYS, 2000 e O'DONNELL *et al.*, 2001). Considera-se, há já muito tempo, que a testosterona é a principal hormona controladora do comportamento sexual masculino (FRASER, 1980, SIMÕES, 1984, MATEOS e ZUBIETA, 1990, SIGNORET, 1990, TILBROOK e CAMERON, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, LINDSAY, 1996, SÁNCHEZ e FERRERO, 1999, FABRE-NYS, 2000 e O'DONNELL *et al.*, 2001). Esta hormona parece sensibilizar os centros nervosos superiores, facilitando, ao menor sinal, a manifestação do comportamento sexual (SIGNORET, 1990), nomeadamente da sua vertente motora (FOLCH, 1983 e SIGNORET, 1990). Porém, a testosterona não actua directamente sobre todos os tecidos (FABRE-NYS, 2000). Nalguns deles, ela tem primeiramente de ser transformada num dos seus principais metabolitos – o estradiol (HILEMAN e JACKSON, 1999 e FABRE-NYS, 2000). No SNC foi já detectada a presença da enzima aromatase (ALEXANDER *et al.*, 1999, HILEMAN e JACKSON, 1999, RESKO *et al.*, 1999, PINCKARD *et al.*, 2000b e O'DONNELL *et al.*, 2001) e de receptores membranares de estradiol (ALEXANDER *et al.*, 1999, HILEMAN e JACKSON, 1999, PINCKARD *et al.*, 2000a e O'DONNELL *et al.*, 2001). Segundo SIMÕES (1984), TILBROOK e CLARKE (1995), HILEMAN e JACKSON (1999), O'DONNELL *et al.* (2001) e THIÉRY *et al.* (2002), uma parte significativa da retroacção negativa que a testosterona exerce sobre a secreção de FSH e de LH só se produz depois desta ter sido aromatizada em estrogénios. TILBROOK e CAMERON (1990), RESKO *et al.* (1999) e PINCKARD *et al.* (2000b) acreditam que o estradiol, metabolizado a nível do SNC, a partir da testosterona, está envolvido na manutenção do comportamento sexual masculino. Enquanto que FRASER (1980) afirma que o estradiol é responsável pelo comportamento copulatório, ALEXANDER *et al.* (1994) sugerem que o estradiol afecta o cortejamento e a ejaculação e O'DONNELL *et al.* (2001) garantem que os estrogénios controlam os mecanismos de penetração e de ejaculação. Contudo, há que referir que a administração de níveis fisiológicos de estradiol a carneiros castrados não estimula nem restabelece os níveis de comportamento sexual observados antes da castração (PINCKARD *et al.*,

2000a). Por outras palavras, a expressão completa do comportamento sexual parece depender da sinergia entre androgénios e estrogénios (CHEMINEAU *et al.*, 1991 e PINCKARD *et al.*, 2000b). Existem, no entanto, dados que apontam no sentido deste tipo de comportamento poder ser também afectado por mecanismos esteróide-independentes (TILBROOK e CAMERON, 1990 e FABRE-NYS, 2000).

De um modo geral, os carneiros sexualmente mais activos apresentam níveis plasmáticos de LH (MATEOS e ZUBIETA, 1990, ALEXANDER *et al.*, 1994, FITZGERALD e PERKINS, 1994, ALEXANDER *et al.*, 1999 e PINCKARD *et al.*, 2000b) e de testosterona (PINCKARD *et al.*, 2000b) mais elevados. No presente estudo, os níveis plasmáticos médios de testosterona total correlacionaram-se significativamente com o valor médio do número total de cobrições efectuadas por sessão de recolha de dados ($r = 0,102$; $P \leq 0,05$), embora a expressividade desta correlação tenha sido extremamente reduzida (1,0%). Nenhum dos restantes parâmetros comportamentais analisados foi significativamente influenciado pelos níveis plasmáticos médios de testosterona total ($P > 0,05$). É provável que esta impossibilidade se relacione, pelo menos em parte, com o facto do comportamento sexual ser difícil de avaliar. Por outro lado, tal como já foi anteriormente referido, este tipo de comportamento não é apenas controlado por esta hormona. Noutros trabalhos, igualmente realizados com carneiros, não foi também possível estabelecer qualquer relação directa entre os níveis plasmáticos de testosterona (BOLAND *et al.*, 1985, TILBROOK e CAMERON, 1990, LINDSAY, 1996 e WALKDEN-BROWN *et al.*, 1999) ou de outros androgénios (TILBROOK e CAMERON, 1990) e diferentes graus de actividade sexual. SIMÕES (1984) admite a hipótese de, nos ungulados domesticados, a actividade sexual ter vindo a evoluir mais no sentido da sua maior dependência face a condicionamentos cerebrais, do que à androgenémia. Por seu turno, TILBROOK e CAMERON (1990) acreditam, simplesmente, que o comportamento sexual dos carneiros não pode ser endocrinologicamente diferenciado (pelo menos, no que se refere à testosterona), uma vez que, nos animais inteiros, os níveis circulantes de testosterona são normalmente muito superiores aos biologicamente necessários para o promoverem.

2.1.3 – VARIAÇÃO DO TAMANHO DOS TESTÍCULOS

Neste estudo, o valor médio anual do perímetro escrotal foi de $29,6 \pm 2,9$ cm (c.v. = 99,1%). As diferenças encontradas entre os carneiros Churros Bragançanos revelaram-se estatisticamente significativas ($P \leq 0,001$). Nos carneiros, é normal existirem grandes

variações individuais no tamanho dos testículos (PELLETIER e ALMEIDA, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, CHEMINEAU *et al.*, 1991 e XU *et al.*, 1993). De igual modo, algumas das diferenças mensais do valor médio deste parâmetro revelaram-se estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) (Figura 34). O tamanho testicular médio dos carneiros estudados alcançou o seu valor máximo absoluto em Janeiro e o mínimo em Abril ($31,5 \pm 2,5$ cm vs. $28,0 \pm 3,2$ cm). Entre Janeiro e Abril verificou-se uma diminuição progressiva do tamanho dos testículos, ainda que esta só tenha tido significado estatístico a partir de Março ($P \leq 0,05$). De Maio a Novembro observou-se uma tendência de aumento do tamanho testicular, inicialmente muito pouco marcada e que só adquiriu significado estatístico no último mês ($P \leq 0,05$).

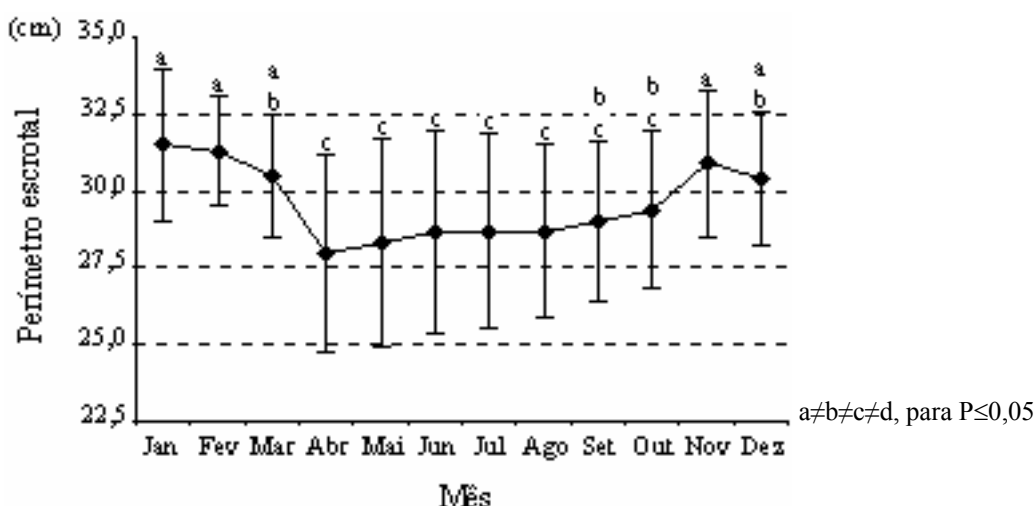


FIGURA 34 – Variação mensal do perímetro escrotal médio (cm) dos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm sd$).

O tamanho dos testículos dos carneiros estudados variou igualmente em função da estação do ano ($P \leq 0,05$) (Figura 35). Na verdade, ele diminuiu do Inverno para a Primavera ($P \leq 0,05$), manteve-se baixo durante o Verão ($P > 0,05$) e só aumentou significativamente no Outono ($P \leq 0,05$). Geralmente, enquanto que o fotoperíodo crescente determina uma redução do tamanho testicular (THIMONIER, 1981, FOLCH, 1984, VIJIL, 1986, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, VIJIL, 1989, CHEMINEAU *et al.*, 1991, GERLACH e AURICH, 2000, ROSA *et al.*, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003), o fotoperíodo decrescente promove um aumento deste mesmo tamanho (BARRELL e LAPWOOD, 1979, THIMONIER, 1981, FOLCH, 1983, FOLCH, 1984, LINDSAY *et al.*, 1984, BOLAND *et al.*, 1985, VIJIL, 1986, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, VIJIL, 1989, CHEMINEAU *et al.*,

1991, WEBSTER *et al.*, 1991, GERLACH e AURICH, 2000, ROSA *et al.*, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003), mais ou menos acentuadamente, em função da raça considerada (FOLCH, 1983, VIJIL, 1986, PELLETIER e ALMEIDA, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, PÉREZ *et al.*, 1998, MARTIN *et al.*, 2002 e THIÉRY *et al.*, 2002). Nalgumas raças (Préalpes-du-Sud, Soay, Awassi e Barki), o tamanho dos testículos começa a aumentar muito antes do solstício de Verão (THIMONIER, 1981, PELLETIER e ALMEIDA, 1987 e TAHA *et al.*, 2000). Noutras (Merino, Finnish Landrace, Ile-de-France e Suffolk), os testículos começam a “crescer” por volta do solstício de Verão (PELLETIER e ALMEIDA, 1987). Nas raças argelinas Barbarine e Noire de Thibar (TAHA *et al.*, 2000) e portuguesa Saloia (CRUZ E SILVA, 1989), o tamanho dos testículos parece não variar significativamente ao longo do ano.

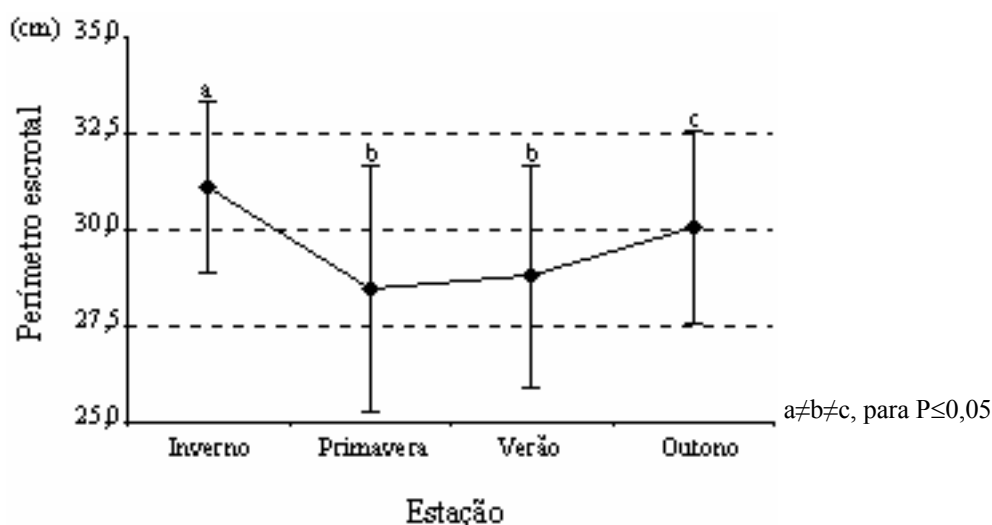


FIGURA 35 – Variação sazonal do perímetro escrotal médio (cm) dos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm sd$).

Neste ensaio, enquanto que o fotoperíodo crescente parece ter realmente inibido o desenvolvimento testicular dos carneiros Churros Bragançanos, o efeito estimulador do fotoperíodo decrescente foi menos evidente. No Verão, o aumento do tamanho dos testículos não teve qualquer significado estatístico ($P>0,05$), ou seja, a passagem para um fotoperíodo decrescente não determinou um aumento notório do tamanho dos testículos destes carneiros. É possível que, dalguma forma, esta ocorrência esteja ligada às elevadas temperaturas do ar que caracterizam o Verão, em Bragança. As elevadas temperaturas do ar reduzem a ingestão voluntária de alimentos (MORAND-FEHR e DOREAU, 2001) e, tal como foi

anteriormente referido, o tamanho dos testículos dos carneiros é fortemente influenciado pelo estado nutricional. Na bibliografia, os dados relativos aos efeitos das elevadas temperaturas do ar sobre a actividade sexual dos machos relacionam-se, essencialmente, com a produção espermática. Porém, num estudo realizado com ratazanas-macho, verificou-se que o aquecimento dos testículos (43°C), mesmo que por um curto período de tempo (30 minutos/dia), determina uma redução significativa da massa testicular (SETCHELL *et al.*, 2002). Curiosamente, VIJIL (1986) afirmam que o tamanho dos testículos dos carneiros da raça espanhola Manchega atinge os seus valores máximos nos meses de Verão (fotoperíodo decrescente e temperaturas elevadas) e os mínimos nos meses de Inverno. É muito provável que esta ocorrência resulte da adaptação específica dos machos desta raça ao sistema de exploração tradicional local. Por outro lado, há que referir que, nas áreas geográficas com condições climáticas extremas, a variação de alguns parâmetros ambientais é superior à do fotoperíodo, o que torna difícil a identificação e a explicação dos efeitos promovidos por este parâmetro em concreto (FOLCH, 1984, VIJIL, 1986, PELLETIER e ALMEIDA, 1987 e VIJIL, 1989). Na Península Ibérica, é clara a existência de casos de ecodependência entre os ovinos (VIJIL, 1986 e VIJIL, 1989).

2.1.3.1 – RELAÇÃO ENTRE TAMANHO DOS TESTÍCULOS E PRODUÇÃO SEMINAL

O desenvolvimento e o funcionamento do epitélio germinativo dependem do desenvolvimento de outros elementos somáticos dos testículos (HOCHEREAU-DE REVIERS *et al.*, 1987). Nos ovinos, o tamanho dos testículos correlaciona-se positivamente com a produção espermática (KNIGHT, 1977, COUROT e ORTAVANT, 1981, THIMONIER, 1981, FOLCH, 1984, HOCHEREAU-DE REVIERS *et al.*, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, VIJIL, 1989, CAMERON e TILBROOK, 1990, MARTIN *et al.*, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, GORDON, 1997 e EL-ALAMY *et al.*, 2001), embora esta correlação seja maior entre os malatos do que entre os carneiros (FOLCH, 1984). Na verdade, o tamanho testicular depende do grau de desenvolvimento dos tubos seminíferos, controlado fundamentalmente pela FSH (COUROT e ORTAVANT, 1981 e THIMONIER, 1981), e do parênquima testicular, controlado essencialmente pela LH/testosterona (O'DONNELL *et al.*, 2001). De acordo com os resultados encontrados nalguns trabalhos, os carneiros com testículos mais pequenos são menos férteis, provavelmente, porque produzem menos espermatozóides (GORDON, 1997). Noutros trabalhos

não foi possível estabelecer qualquer relação entre o tamanho dos testículos e a produção seminal (MICKELSEN *et al.*, 1982, BOLAND *et al.*, 1985 e GORDON, 1997).

Neste ensaio, o tamanho dos testículos dos carneiros Churros Bragançanos correlacionou-se significativamente com todos os parâmetros seminais quantitativos avaliados na mesma altura: volume seminal ($r = 0,198$; para $P \leq 0,001$), concentração espermática ($r = 0,134$; para $P \leq 0,01$) e concentração do ejaculado ($r = 0,096$; para $P \leq 0,05$). Porém, a expressividade destas correlações foi extremamente baixa (3,9%, 1,8% e 0,9%, respectivamente). Não se verificou qualquer correlação estatisticamente significativa entre estes mesmos parâmetros quantitativos e o tamanho testicular determinado 8 semanas antes ($P > 0,05$). Por outro lado, há que referir que nenhum dos parâmetros qualitativos foi significativamente influenciado pelo tamanho dos testículos, medido na mesma altura ou 8 semanas antes ($P > 0,05$). Ao que tudo parece indicar, nos carneiros estudados, os efeitos do tamanho testicular sobre a produção seminal foram extremamente reduzidos. EL-ALAMY *et al.* (2001) afirmam que o tamanho dos testículos só se correlaciona significativamente com a produção espermática, quando a frequência de recolha de amostras de sémen é intensiva e quando os carneiros estudados possuem testículos de tamanhos muito diferentes. Quando a frequência de recolha de amostras de sémen é baixa, o ejaculado obtido permite apenas avaliar a capacidade do carneiro em emitir um determinado subconjunto de espermatozoides (EL-ALAMY *et al.*, 2001).

2.1.3.2 – RELAÇÃO ENTRE TAMANHO DOS TESTÍCULOS E COMPORTAMENTO SEXUAL

Tal como já foi anteriormente referido, tanto a actividade testicular como o comportamento sexual são fortemente afectados pela secreção de LH/testosterona. Contudo, na bibliografia consultada, raras são as referências relativamente à existência de uma possível correlação entre o tamanho dos testículos e o comportamento sexual dos carneiros. Este facto não é surpreendente, pois a LH/testosterona não afecta, simultaneamente com a mesma intensidade, a actividade testicular e a libido. Mais, tanto a actividade testicular como o comportamento sexual parecem sofrer a acção de diferentes mecanismos GnRH-independentes. Por outro lado, o comportamento sexual é extremamente variável, uma vez que é permanentemente influenciado por múltiplos factores intrínsecos e extrínsecos ao próprio animal. Efectivamente, BOLAND *et al.* (1985) e BENCH *et al.* (2001) afirmam que

não é normalmente possível estabelecer qualquer relação de causa e efeito entre o tamanho testicular e a libido. Neste ensaio, o tamanho dos testículos dos carneiros Churros Bragançanos não se correlacionou significativamente com o seu desempenho sexual ($P>0,05$).

2.1.4 – VARIAÇÃO DA PRODUÇÃO SEMINAL

Sob condições naturais, o contributo de um dado carneiro para a fertilidade do rebanho depende do número de ovelhas no interior das quais consegue depositar espermatozóides viáveis em número suficiente para garantir a fecundação (SALMON *et al.*, 1984, VIJIL, 1989, TILBROOK e CAMERON, 1990, GORDON, 1997 e KAYA *et al.*, 2002). A produção seminal é afectada por diferentes factores individuais – genoma, idade e estado de saúde – ambientais – fotoperíodo e condições climatéricas – e de manejo – alimentação e ambiente social (FOLCH, 1983, FOLCH, 1984, SIMÕES, 1984, VIJIL, 1989, CAMERON e TILBROOK, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, CELORRIO *et al.*, 1994 e KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000). O estudo e a mensuração individual dos efeitos destes parâmetros constituem tarefas de difícil consecução, quer pelas interacções que se podem estabelecer entre eles, quer pelo facto dos resultados encontrados serem frequentemente contraditórios, devido a diferenças raciais ou de localização geográfica (VIJIL, 1989) ou ainda a diferentes tipos de manejo tradicional (FOLCH, 1984).

Mesmo que os carneiros produzam sémen de uma forma permanente, a produção seminal varia ao longo do ano (MASCARANHAS *et al.*, 1980, FOLCH, 1983, FOLCH, 1984, BOLAND *et al.*, 1985, VIJIL, 1986, BAPTISTA e MASCARANHAS, 1987, VIJIL, 1987, CRUZ E SILVA, 1989, VIJIL, 1989, CHEMINEAU *et al.*, 1991, BORQUE e SAGÜÉS, 1993, XU *et al.*, 1993, PÉREZ *et al.*, 1997, GERLACH e AURICH, 2000, KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000, ROSA *et al.*, 2000, TAHA *et al.*, 2000, STELLFLUG, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002, BETTENCOURT *et al.*, 2003 e ROSA e BRYANT, 2003), de uma forma mais ou menos acentuada em função da raça considerada (MASCARANHAS *et al.*, 1980, FOLCH, 1983, BAPTISTA e MASCARANHAS, 1987, VIJIL, 1987, CRUZ E SILVA, 1989, VIJIL, 1989, ORTAVANT *et al.*, 1988, CHEMINEAU *et al.*, 1991, KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000, TAHA *et al.*, 2000 e MARTIN *et al.*, 2002). De um modo geral, a produção de sémen aumenta sob um fotoperíodo decrescente e diminui sob um fotoperíodo crescente (COUROT e ORTAVANT, 1981, THIMONIER, 1981, FOLCH, 1983, FOLCH, 1984, BOLAND *et al.*, 1985, ORTAVANT *et al.*, 1985, VIJIL, 1986, VIJIL, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, VIJIL, 1989, CHEMINEAU *et al.*, 1991, KARAGIANNI-

DIS *et al.*, 2000, ROSA *et al.*, 2000, THIÉRY *et al.*, 2002, BETTENCOURT *et al.*, 2003 e ROSA e BRYANT, 2003). Nos carneiros, o fotoperíodo crescente diminui a eficiência da espermatogénese, não por a tornar mais lenta, mas porque eleva a taxa de degenerescência das células germinativas (ORTAVANT *et al.*, 1985 e CHEMINEAU *et al.*, 1991). Apesar dos resultados da maioria dos trabalhos publicados sobre a produção seminal seguirem a tendência atrás referida, rapidamente se encontram valores mais ou menos discrepantes (VIJIL, 1986 e VIJIL, 1989). Estas discrepâncias resultam de diferenças entre raças, populações, indivíduos, condições ambientais (fotoperíodo e condições climatéricas), localização geográfica, manejo ou metodologias de recolha e avaliação do sémen (VIJIL, 1986, VIJIL, 1989 e TAHA *et al.*, 2000). Na verdade, alguns dos métodos de avaliação seminal comportam, em si mesmos, elevados níveis de subjectividade (GRAVANCE *et al.*, 1998, SANCHO *et al.*, 1998 e ANEL, 1999). Por outro lado, as análises seminais são feitas sobre um número muito reduzido de células espermáticas, que pode não representar correctamente todo o ejaculado (ANEL, 1999).

Nos ovinos, o volume seminal é maior sob um fotoperíodo decrescente do que sob um fotoperíodo crescente (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Na verdade, a actividade secretora das glândulas anexas é maior quando os níveis circulantes de testosterona são mais elevados (BARRELL e LAPWOOD, 1979 e ORTAVANT *et al.*, 1988). Nos carneiros Suffolk, Texel e Dorset Horn, o volume do ejaculado aumenta realmente com o aproximar da estação reprodutiva (BOLAND *et al.*, 1985). Nos carneiros das raças Chios e Frísia, explorados no norte da Grécia, o volume do ejaculado é mais elevado no Verão-Outono do que no Inverno-Primavera (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000). Nos carneiros Karakul (VIJIL, 1987) e Manchegos (VIJIL, 1989), o volume seminal evolui ao longo do ano de uma forma aparentemente aleatória. Segundo RESCALVO *et al.* (1993), o volume do ejaculado dos carneiros Manchegos é máximo no Verão-Outono e mínimo no Inverno-Primavera. No mesmo sentido, BORQUE e SAGÜÉS (1993) verificaram que os carneiros desta raça produzem ejaculados mais volumosos no Outono do que no Inverno-Primavera. Nos carneiros da raça espanhola Guirra, o volume seminal não varia significativamente entre o Outono e a Primavera (MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2003). Nos carneiros Serra da Estrela, o volume seminal é menor no Inverno-Primavera do que no Verão-Outono (BAPTISTA e MASCARANHAS, 1987). Nestes carneiros e nos Merino Regional, o volume do ejaculado varia aleatoriamente ao

longo do ano (BARBAS *et al.*, 2000b). Nos carneiros Saloios, o volume seminal diminui de Janeiro a Abril/Maio, para subir de seguida até Agosto/Setembro (CRUZ E SILVA, 1989). Nos carneiros Merino Branco, Merino Preto e Campaniça, o volume do ejaculado não varia significativamente entre a Primavera e o Outono (BETTENCOURT *et al.*, 2003). Nos carneiros originários do Norte de África – Awassi, Barki, Ossimi e Rahmani –, o volume seminal é maior no Verão do que em qualquer outra estação do ano (TAHA *et al.*, 2000). Noutros estudos levados a cabo com carneiros destas raças, o volume do ejaculado revelou-se mais elevado na Primavera (TAHA *et al.*, 2000).

A concentração do ejaculado é maior no Outono do que na Primavera, variando, no entanto, a sua amplitude em função da raça estudada: 75,0% na raça Fleischschaf, 37,0% na Ile-de-France e 18,0% na Rasa Aragonesa (FOLCH, 1984). Nos carneiros das raças Chios e Frísia, a concentração do ejaculado é maior no Verão-Outono do que no Inverno-Primavera (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000). Nos carneiros Karakul, as concentrações do ejaculado e espermática são marcadamente mais elevadas no Outono-Inverno (VIJIL, 1987). Variações sazonais significativas das concentrações do ejaculado e espermática foram também identificadas em carneiros Manchegos (VIJIL, 1986, VIJIL, 1989 e BORQUE e SAGÜÉS, 1993). Nestes carneiros, a concentração espermática aumenta durante o período de Inverno-Primavera e diminui no Outono (FOLCH, 1984). RESCALVO *et al.* (1993) afirmam que, embora a concentração do ejaculado varie aleatoriamente ao longo do ano, a concentração espermática dos carneiros Manchegos é máxima na Primavera e mínima no Outono. Pelo contrário, BORQUE e SAGÜÉS (1993) afirmam que a concentração do ejaculado destes carneiros é máxima no Outono e mínima no Inverno-Primavera. Nos carneiros espanhóis da raça Rasa Aragonesa, a produção quantitativa de sémen evolui de uma forma irregular ao longo do ano (FOLCH, 1983). Nos carneiros da raça Guirra, a concentração espermática é maior no Outono do que na Primavera (MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2003). Nos carneiros Serra da Estrela, a concentração espermática é menor no Inverno-Primavera do que no Verão-Outono (BAPTISTA e MASCARANHAS, 1987). Nestes carneiros e nos Merino Regional, a concentração espermática registada no Outono é significativamente inferior à encontrada nas restantes estações do ano (BARBAS *et al.*, 2000b). Nos carneiros Saloios, a concentração espermática diminuiu de Janeiro a Abril/Maio, para subir de seguida até Agosto/Setembro (CRUZ E SILVA, 1989). Nos carneiros Merino Branco, Merino Preto e Campaniça, a con-

centração do ejaculado é maior no Outono do que na Primavera (BETTENCOURT *et al.*, 2003). Nos carneiros Awassi, Barki, Ossimi e Rahmani, as concentrações do ejaculado e espermática são máximas no Verão e mínimas no Inverno (TAHA *et al.*, 2000).

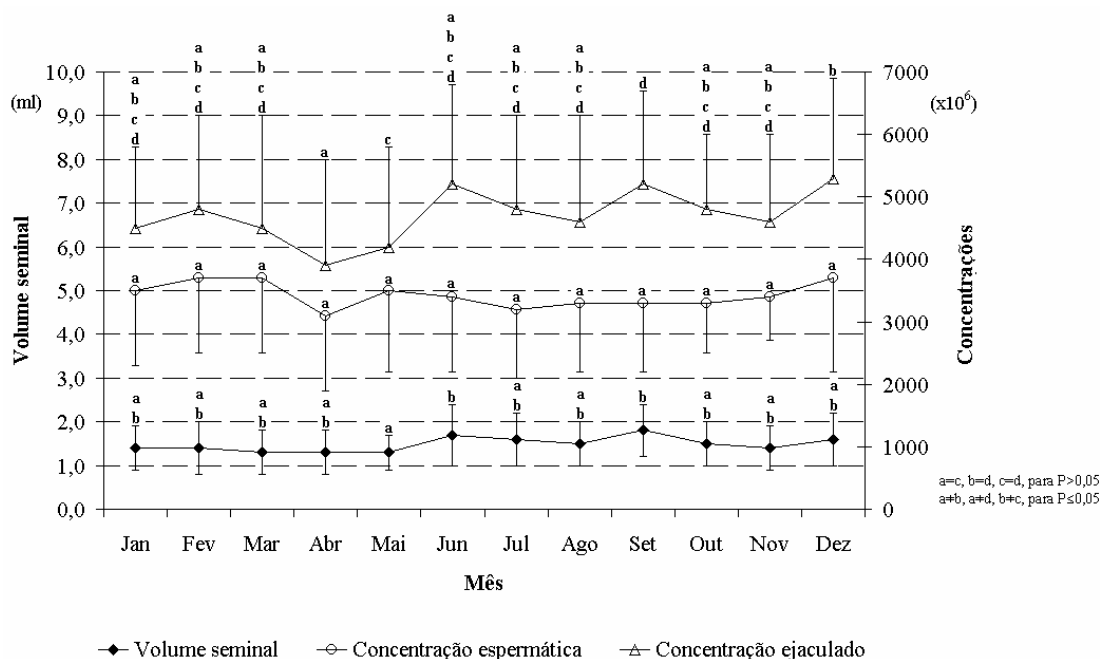


FIGURA 36 – Variação mensal do volume seminal médio (ml) e das concentrações médias do ejaculado (espermatóides) e espermática (espermatóides/ml) produzidos pelos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm sd$).

No decurso do ano de 1998, os carneiros Churros Bragançanos produziram um volume seminal médio de $1,5 \pm 0,6$ ml (c.v. = 38,7%), uma concentração espermática média de $3.439,7 \times 10^6 \pm 1.159,4 \times 10^6$ espermatozóides/ml (c.v. = 33,7%) e uma concentração média do ejaculado de $4.738,0 \times 10^6 \pm 1.546,3 \times 10^6$ espermatozóides (c.v. = 32,6%). As diferenças entre carneiros, relativamente ao conjunto dos parâmetros seminais quantitativos estudados, revelaram-se estatisticamente significativas ($P \leq 0,001$). KARAGIANNIDIS *et al.* (2000) referem igualmente a existência de importantes variações inter-animais, no que concerne à quantidade de sémen produzida por carneiros das raças Chios e Frisia. A variação mensal do volume médio e da concentração média do ejaculado foram quase sempre estatisticamente não significativas ($P > 0,05$) (Figura 36). Apenas o volume seminal médio observado no mês de Maio (1,3 ml) foi significativamente inferior ao encontrado nos meses

de Junho (1,7 ml) e Setembro (1,8 ml) ($P \leq 0,001$) e muito provavelmente porque o coeficiente de variação registado no mês de Maio foi “excepcionalmente” reduzido. No que concerne à concentração do ejaculado, o valor médio registado no mês de Abril ($3.921,7 \times 10^6$ espermatozóides) revelou-se estatisticamente inferior ao determinado nos meses de Setembro ($5.187,6 \times 10^6$ espermatozóides) e Dezembro ($5.329,8 \times 10^6$ espermatozóides) ($P \leq 0,01$). O valor médio deste parâmetro registado no mês Maio ($4.189,8 \times 10^6$ espermatozóides) mostrou-se também estatisticamente inferior ao encontrado no mês de Dezembro ($P \leq 0,05$). A concentração espermática média não variou significativamente ao longo do ano ($P > 0,05$).

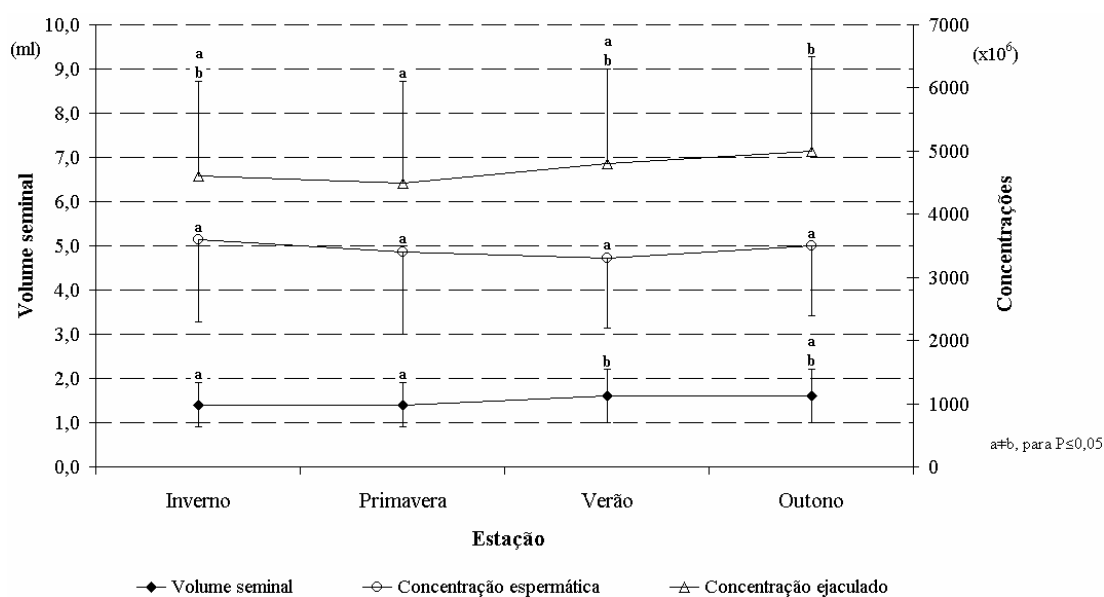


FIGURA 37 – Variação sazonal do volume seminal médio (ml) e das concentrações médias do ejaculado (espermatozóides) e espermática (espermatozóides/ml) produzidos pelos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm sd$).

Do ponto de vista sazonal, o volume médio do ejaculado observado no Verão (1,6 ml) foi significativamente superior aos registados no Inverno (1,4 ml) e na Primavera (1,4 ml) ($P \leq 0,05$) (Figura 37). As restantes variações sazonais deste parâmetro revelaram-se estatisticamente não significativas ($P > 0,05$). A variação sazonal da concentração média do ejaculado apenas teve significado estatístico entre a Primavera e o Outono (4.452×10^6 espermatozóides vs. 5.042×10^6 espermatozóides; para $P \leq 0,05$). A concentração espermática não variou significativamente em função da estação do ano ($P > 0,05$). Neste sentido, a variação

sazonal da produção quantitativa de sémen dos carneiros Churros Bragançanos, ainda que de uma forma muito pouco marcada, parece ter seguido a tendência geral indicada por COUROT e ORTAVANT (1981), THIMONIER (1981), FOLCH (1983), FOLCH (1984), BOLAND *et al.* (1985), ORTAVANT *et al.* (1985), VIJIL (1986), VIJIL (1987), ORTAVANT *et al.* (1988), VIJIL (1989), CHEMINEAU *et al.* (1991), THIÉRY *et al.* (2002) e BETTENCOURT *et al.* (2003).

Nos carneiros Suffolk, Texel e Dorset Horn, a motilidade dos espermatozóides aumentam com o aproximar da estação reprodutiva (BOLAND *et al.*, 1985). Nos carneiros Ile-de-France, os valores deste parâmetro seminal parecem variar aleatoriamente ao longo do ano (THIMONIER, 1981 e VIJIL, 1987). Nos carneiros Chios e Frísios, a motilidade é mínima no Verão (estação reprodutiva) (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000). Nos carneiros Karakul, a motilidade dos espermatozóides é mais elevada na Primavera do que nas restantes estações do ano (VIJIL, 1987). Nos carneiros Manchegos, as motilidades massal e individual são máximas no Verão-Outono e mínimas no Inverno-Primavera, embora as variações sazonais da motilidade individual sejam claramente inferiores às da motilidade massal (RESCALVO *et al.*, 1993). Nos carneiros Guirros, a motilidade espermática é maior no Outono do que na Primavera (MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2003).

Nos carneiros Serra da Estrela, a motilidade é menor no Inverno-Primavera do que no Verão-Outono (BAPTISTA e MASCARANHAS, 1987). Nestes carneiros e nos Merino Regional, verificou-se que a motilidade individual é menor na Primavera do que no Verão-Outono (BARBAS *et al.*, 2000a). Nos carneiros Serra da Estrela, a motilidade individual observada no Verão é superior à encontrada na Primavera e no Inverno, não diferindo significativamente o valor registado no Outono do das restantes estações do ano (BARBAS *et al.*, 2000b). Já nos carneiros Merino Regional, a motilidade individual observada na Primavera é menor do que a registada em todas as outras estações do ano (BARBAS *et al.*, 2000b). Nos carneiros Saloios, a motilidade diminui de Janeiro a Abril/Maio, para subir de seguida até Outubro/Novembro (CRUZ E SILVA, 1989). Nos carneiros Merino Branco, Merino Preto e Campaniça, as motilidades massal e individual são mais elevadas no Outono do que na Primavera (BETTENCOURT *et al.*, 2003). Nos carneiros Awassi, Barki, Ossimi e Rahmani, a

motilidade é máxima no Verão e mínima no Inverno (TAHA *et al.*, 2000). Num ensaio desenvolvido por El-Fouly *et al.* (1977), a motilidade do sémen produzido por carneiros Awassi foi máxima no Outono e mínima no Inverno (TAHA *et al.*, 2000).

Durante o ano de 1998, os carneiros Churros Bragançanos produziram ejaculados com uma motilidade massal média de 4,4 e uma motilidade individual média de 4,2 (Figura 38). No que diz respeito a estes parâmetros seminais, as diferenças encontradas entre carneiros mostraram-se estatisticamente não significativas ($P>0,05$). Tanto a motilidade massal como a motilidade individual variaram significativamente em função do mês ($0,05 \geq P \leq 0,001$) (Quadro V).

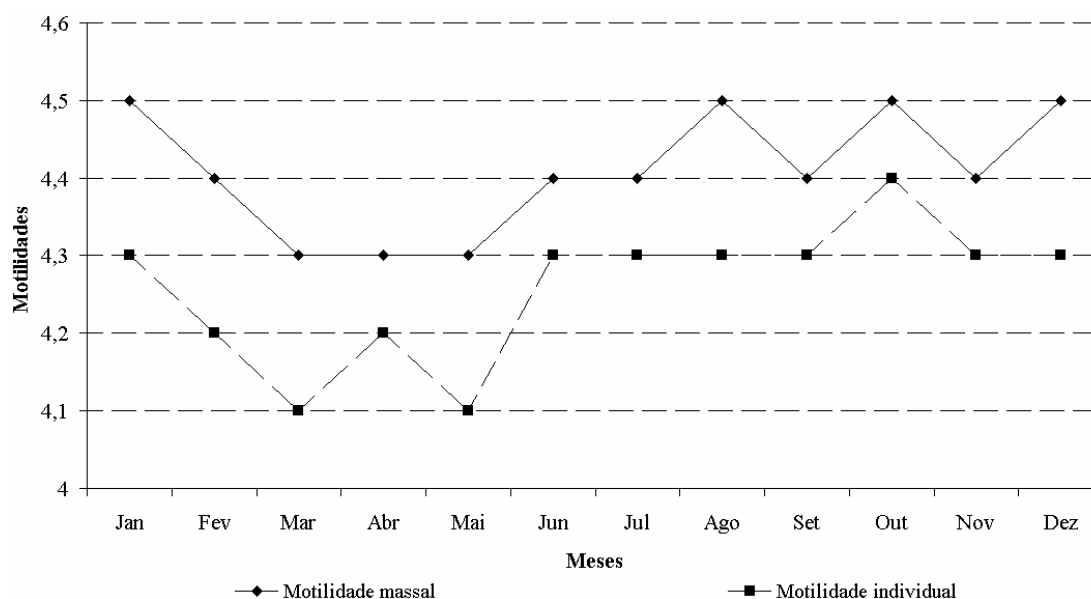


FIGURA 38 – Variação mensal das motilidades médias massal e individual dos espermatozoides produzidos pelos carneiros Churros Bragançanos.

Contudo, as variações mensais das motilidades massal e individual produziram-se de uma forma quase contínua e com diferentes níveis de significância. Neste sentido, a identificação destas variações no Quadro V resultaria particularmente confusa (demasiadas letras). Com o intuito de obviar a esta circunstância e porque em inseminação artificial só são geralmente utilizados ejaculados com motilidades iguais ou superiores a 4,0, dividimos os diferentes ejaculados analisados em dois grupos: não utilizáveis ($< 4,0$) e utilizáveis ($\geq 4,0$) (Quadro VI).

QUADRO V – Variação mensal das motilidades massal e individual dos ejaculados produzidos pelos carneiros Churros Bragançanos

Mês	Motilidade massal			Motilidade individual			
	4,0	4,5	5,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Janeiro	30,3%	45,5%	24,2%	6,1%	42,4%	45,4%	6,1%
Fevereiro	40,6%	37,5%	21,9%	12,5%	40,6%	37,5%	9,4%
Março	50,0%	42,9%	7,1%	21,4%	53,6%	25,0%	0,0%
Abril	41,4%	48,3%	10,3%	6,9%	51,7%	41,4%	0,0%
Maio	53,2%	36,2%	10,6%	10,6%	53,2%	36,2%	0,0%
Junho	41,2%	44,1%	14,7%	0,0%	47,1%	52,9%	0,0%
Julho	30,6%	50,0%	19,4%	0,0%	44,4%	50,0%	5,6%
Agosto	18,2%	66,7%	15,1%	0,0%	42,4%	54,5%	3,1%
Setembro	28,9%	55,3%	15,8%	0,0%	50,0%	47,4%	2,6%
Outubro	25,0%	55,0%	20,0%	0,0%	42,5%	45,0%	12,5%
Novembro	35,9%	48,7%	15,4%	0,0%	41,0%	53,8%	5,2%
Dezembro	27,8%	48,1%	24,1%	7,4%	42,6%	40,7%	9,3%

Sob este condicionalismo, a motilidade massal não variou significativamente em função do mês, uma vez que todos os ejaculados estudados se revelaram utilizáveis. Por seu turno, a motilidade individual variou significativamente em função do mês. Os níveis mais baixos da motilidade individual verificaram-se no mês de Março e os mais altos nos meses de Junho a Novembro. Em termos de estação do ano, as variações das motilidades massal e individual revelaram-se igualmente estatisticamente significativas (Quadro VII).

QUADRO VI – Variação mensal das motilidades massal e individual, depois de agrupar os ejaculados estudados em duas classes: não utilizáveis (< 4,0) e utilizáveis ($\geq 4,0$)

Mês	Motilidade massal		Motilidade individual	
	Não utilizáveis	Utilizáveis	Não utilizáveis	Utilizáveis
Janeiro	0,0% ^a	100,0% ^a	6,1% ^a	93,9% ^a
Fevereiro	0,0% ^a	100,0% ^a	12,5% ^b	87,5% ^b
Março	0,0% ^a	100,0% ^a	21,4% ^c	78,6% ^c
Abril	0,0% ^a	100,0% ^a	6,9% ^d	93,1% ^d
Maio	0,0% ^a	100,0% ^a	10,6% ^e	89,4% ^e
Junho	0,0% ^a	100,0% ^a	0,0% ^f	100,0% ^f
Julho	0,0% ^a	100,0% ^a	0,0% ^f	100,0% ^f
Agosto	0,0% ^a	100,0% ^a	0,0% ^f	100,0% ^f
Setembro	0,0% ^a	100,0% ^a	0,0% ^f	100,0% ^f
Outubro	0,0% ^a	100,0% ^a	0,0% ^f	100,0% ^f
Novembro	0,0% ^a	100,0% ^a	0,0% ^f	100,0% ^f
Dezembro	0,0% ^a	100,0% ^a	7,4% ^d	92,6% ^d

a=a, a=b, a=d, b=c, para $P>0,05$; a≠c, a≠f, b≠d, c≠d, c≠e, para $P\leq 0,05$; d≠f, para $P\leq 0,01$; b≠f, c≠f, e≠f, para $P\leq 0,001$ (entre meses, mesmo tipo motilidade).

No que se refere à motilidade massal, apenas a diferença encontrada entre a Primavera e o Verão se revelou estatisticamente significativa ($P\leq 0,05$). Pelo contrário, a motilidade individual só não diferiu significativamente entre o Verão e o Outono ($P>0,05$). Os níveis mais baixos registaram-se no Inverno-Primavera (particularmente no Inverno) e os mais altos no Verão-Outono.

Nos carneiros Suffolk, Texel e Dorset Horn, a percentagem de formas anormais diminui com o aproximar da estação reprodutiva (BOLAND *et al.*, 1985). Nos carneiros Ile-de-France e Rasa Aragonesa, os valores deste parâmetro são mais elevados na Primavera (FOLCH, 1983 e ORTAVANT *et al.*, 1988) do que no Outono (ORTAVANT *et al.*, 1988). Nos carneiros Chios e Frísios, a percentagem de espermatozóides anormais é mais elevada no Inverno-Primavera do que no Verão-Outono (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000). Nos carneiros

Guirros, a percentagem de espermatozóides anormais observada na Primavera não difere significativamente da encontrada no Outono (MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2003). Nos carneiros Serra da Estrela, a percentagem de formas anormais diminui de Maio a Agosto e aumenta de Setembro a Março (BAPTISTA e MASCARANHAS, 1987). Nos carneiros Serra da Estrela e Merino Regional não se verificam variações sazonais na percentagem de formas anormais (BARBAS *et al.*, 2000a,b). Nos carneiros Saloios, a percentagem de espermatozóides anormais é, regra geral, mais elevada de Janeiro a Maio do que de Agosto a Novembro (CRUZ E SILVA, 1989). Nos carneiros Awassi e Barki, a percentagem de espermatozóides anormais é moderada ao longo de todo o ano (TAHA *et al.*, 2000).

QUADRO VII – Variação sazonal das motilidades massal e individual dos ejaculados produzidos pelos carneiros Churros Bragançanos

Estação	Motilidade massal			Motilidade individual			
	4,0	4,5	5,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Inverno	36,0% ^{a,b}	43,0% ^{a,b}	21,0% ^{a,b}	12,0% ^a	44,0% ^a	37,0% ^a	7,0% ^a
Primavera	47,2% ^a	41,3% ^a	11,5% ^a	8,7% ^b	50,0% ^b	41,3% ^b	0,0% ^b
Verão	28,0% ^b	55,2% ^b	16,8% ^b	0,0% ^c	46,4% ^c	50,4% ^c	3,2% ^c
Outono	30,7% ^{a,b}	50,9% ^{a,b}	18,4% ^{a,b}	1,8% ^d	43,0% ^d	46,5% ^d	8,7% ^d

c=d, para $P>0,05$; a≠b, a≠d, para $P\leq 0,05$; a≠c, b≠c, b≠d, para $P\leq 0,01$ (entre estações, mesmo tipo de motilidade).

Nos carneiros Serra da Estrela e Merino Regional, a percentagem de espermatozóides vivos não varia significativamente em função da estação do ano (BARBAS *et al.*, 2000a,b).

No decurso do ano de 1998, os carneiros Churros Bragançanos produziram ejaculados com uma percentagem média de espermatozóides normais de $79,3 \pm 6,8$ (c.v. = 8,6%) e uma percentagem média de espermatozóides vivos de $80,2 \pm 6,7$ (c.v. = 8,4%). No que concerne a estes parâmetros seminais, as diferenças observadas entre carneiros foram estatisticamente não significativas ($P>0,05$). Segundo MARNET *et al.* (2000), a percentagem de espermatozóides normais é, frequentemente, o parâmetro seminal menos variável. Neste trabalho, tanto a percentagem média de espermatozóides normais como a de espermatozóides vivos não variaram significativamente em função do mês ou da estação do ano ($P>0,05$) (Figuras 39 e 40). Porém, como a identificação e a quantificação do tipo de anomalias

seminais não foram feitas, não nos é possível inferir se ocorreram ou não variações sazonais nos mecanismos testiculares ou epididimais capazes de afectar a qualidade das células espermáticas produzidas. De uma forma ainda menos marcada do que a quantitativa, a variação sazonal da produção qualitativa de sêmen dos carneiros Churros Bragançanos seguiu a tendência geral indicada pela maioria dos autores. Efectivamente, a variação sazonal da qualidade seminal é, normalmente, mais discreta do que a variação quantitativa (FOLCH, 1983 e THIÉRY *et al.*, 2002).

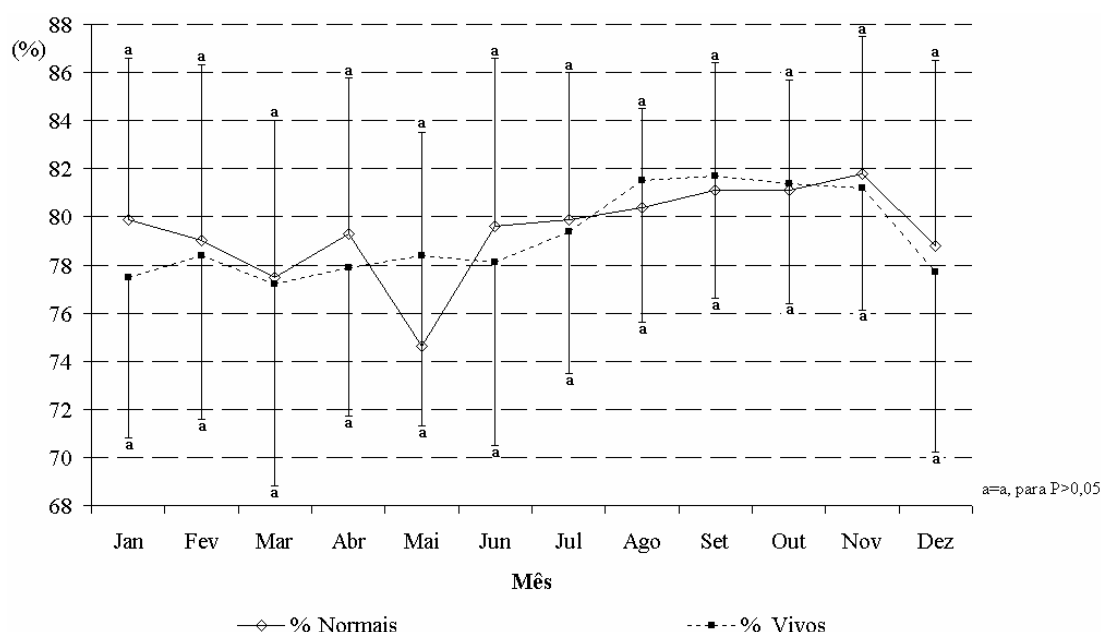


FIGURA 39 – Variação mensal das percentagens médias de espermatozóides normais e vivos produzidos pelos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm sd$).

Os resultados anteriormente apresentados, relativamente às variações mensal e sazonal da produção seminal dos carneiros Churros Bragançanos, foram, certamente, condicionados pelas metodologias utilizadas, particularmente pela relacionada com a frequência de recolha de ejaculados. A avaliação da produção diária de espermatozóides é fortemente influenciada pelo tamanho das reservas epididimais destas células (EL-ALAMY *et al.*, 2001 e JOHNSON *et al.*, 2001). Nos bovinos, suínos e coelhos, a produção diária de espermatozóides relaciona-se estreitamente com o número total de espermatozóides ejaculados por dia (JOHNSON *et al.*, 2001). Nos ovinos a situação é muito diferente, pois os carneiros possuem grandes reservas epididimais de espermatozóides (SIMÕES, 1984, CAMERON e TILBROOK,

1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, EL-ALAMY *et al.*, 2001 e JOHNSON *et al.*, 2001). Assim, existe a necessidade de ajustar, cuidadosamente a frequência de recolha de ejaculados ao tamanho das reservas epididimais de espermatozóides, antes do número total de células espermáticas ejaculadas poder reflectir a produção diária de espermatozóides (CHEMINEAU *et al.*, 1991 e JOHNSON *et al.*, 2001).

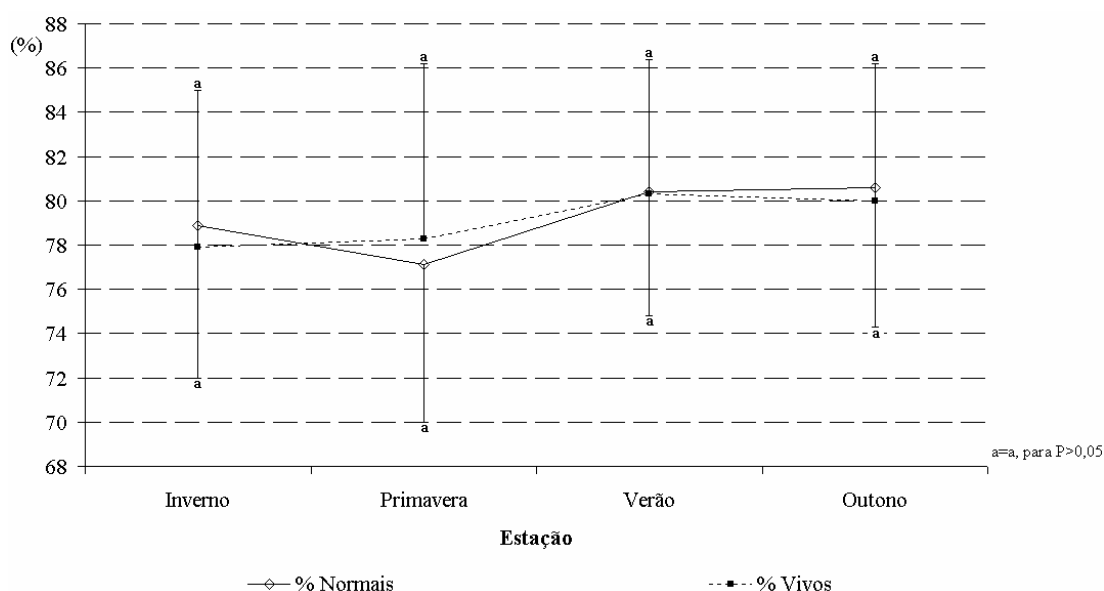


FIGURA 40 – Variação sazonal das percentagens médias de espermatozóides normais e vivos produzidos pelos carneiros Churros Bragançanos ($\bar{x} \pm sd$).

Nos ovinos, quando se começa um programa frequente e regular de recolha de sémen, o número de espermatozóides ejaculados é geralmente elevado (CAMERON e TILBROOK, 1990), sendo mesmo possível recolher 4 ou mais ejaculados por dia (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Uma vez esgotadas estas reservas, a recolha de ejaculados deve reduzir-se (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Quando é praticada uma frequência de recolhas apropriada, alguns dias após o começo do programa de recolha de sémen, as reservas epididimais de espermatozóides estabilizam-se e o mesmo sucede relativamente ao número de espermatozóides ejaculados (CAMERON e TILBROOK, 1990). Torna-se então possível avaliar, correctamente, as variações sazonais da produção espermática (FOLCH, 1983, THIMONIER, 1981, CHEMINEAU *et al.*, 1991 e KAYA *et al.*, 2002). Porém, na prática, não é fácil determinar qual a frequência de recolha ideal, pois esta depende de factores dinâmicos como o próprio animal, o fotoperíodo, as condições climatéricas, o tipo de manejo, etc.. Cada animal tem a sua fre-

quência ideal própria (SIMÕES, 1984). CAMERON e TILBROOK (1990) afirmam que, com o intuito de obter a melhor produção diária de espermatozóides, os carneiros devem ser sujeitos, no mínimo, a duas recolhas diárias de sémen. No trabalho efectuado por KAYA *et al.* (2002), com carneiros Merino Konya (80% Merino Alemão x 20% Akkaraman da Turquia), a produção diária de sémen atingiu o seu valor máximo quando se procedeu, duas vezes por semana, à recolha de 3-6 ejaculados/dia. O aumento do número de ejaculações para 8/dia (na mesma, 2 vezes por semana) passou a afectar negativamente a produção diária máxima de sémen, o volume, a motilidade e a percentagem de espermatozóides anormais (KAYA *et al.*, 2002). Num trabalho desenvolvido por Amir *et al.* (1986), a capacidade fertilizadora de carneiros Finncross não foi afectada pela frequência de recolha de ejaculados, mesmo quando esta atingiu o valor de 5/dia, durante 17 dias consecutivos (GORDON, 1997). A recolha de apenas um ejaculado por semana traduz-se numa redução significativa da produção diária máxima de sémen (EL-ALAMY *et al.*, 2001 e KAYA *et al.*, 2002).

Segundo EL-ALAMY *et al.* (2001), a recolha quinzenal de apenas um ejaculado é demasiadamente baixa para permitir a correcta quantificação da produção espermática. No nosso ensaio, apesar das semanas de recolha de sémen terem sido intercaladas com semanas de testagem do comportamento sexual, acreditamos que a frequência de recolha de sémen foi inferior à que deveria ter sido implementada para se ter uma perspectiva absolutamente correcta da variação sazonal da produção seminal em carneiros da raça Churra Galega Bragança. Mesmo assim, os resultados anteriormente apresentados indiciam a existência de uma certa sazonalidade sexual, relativamente à quantidade e à qualidade do sémen produzido, entre os carneiros Churros Bragançanos.

2.1.4.1 – RELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO SEMINAL E COMPORTAMENTO SEXUAL

Em toda a bibliografia consultada, poucas são as referências quanto à existência de uma possível correlação significativa entre a produção seminal e o desempenho sexual dos carneiros. VIJIL (1986), VIJIL (1989) CELORRIO *et al.* (1994) e EL-ALAMY *et al.* (2001) admitem a hipótese dos carneiros sexualmente mais “reactivos” serem também os que produzem mais e/ou melhor sémen. Nos trabalhos levados a cabo por alguns destes autores, os carneiros com maior libido produziram ejaculados mais volumosos (CELORRIO *et al.*, 1994), com maior concentração espermática (VIJIL, 1986, VIJIL, 1989 e CELORRIO *et al.*, 1994) ou com melhor motilidade (VIJIL, 1986 e VIJIL, 1989). No estudo desenvolvido por

EL-ALAMY *et al.* (2001), os carneiros Finnsheep e Dorset com maior libido apresentaram uma maior produção diária de espermatozóides. Porém, MASCARANHAS *et al.* (1980) não conseguiram estabelecer qualquer correlação estatisticamente significativa entre o comportamento sexual e as características seminais de carneiros Merino Precoce e Frisserra. O comportamento sexual apresentado pelos carneiros Churros Bragançanos não se relacionou significativamente com nenhuma das características seminais estudadas ($P>0,05$). Este resultado não nos surpreendeu, porque tanto as características seminais como o comportamento sexual são diferentemente afectados por variadíssimos factores internos e externos aos animais. Por outro lado, as características seminais e o comportamento sexual foram avaliados em semanas alternadas.

2.1.5 – VARIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL

Sob condições naturais, o número de ovelhas cobertas depende do comportamento sexual apresentado pelos carneiros (MICKELSEN *et al.*, 1982, SALMON *et al.*, 1984, VIJIL, 1989, TILBROOK e CAMERON, 1990, ALEXANDER *et al.*, 1994 e SNOWDER *et al.*, 2002). Contudo, continua a não ser fácil avaliar, correctamente, este tipo de comportamento (FOLCH, 1983 e TILBROOK e CAMERON, 1990). A grande dificuldade reside no facto do comportamento sexual depender da interacção de múltiplos factores internos – nomeadamente nervosos (PRIEST e PFAFF, 1995) e endócrinos (LINCOLN *et al.*, 1990, SANFORD e BAKER, 1990, PRIEST e PFAFF, 1995 e SÁNCHEZ e VICENTE, 1999) – e externos – manejo (MICKELSEN *et al.*, 1982 e FOLCH, 1984), fotoperíodo (FOLCH, 1984, LINCOLN *et al.*, 1990, MARTIN *et al.*, 1990 e TILBROOK e CAMERON, 1990), condições climáticas (FOLCH, 1984, TILBROOK e CAMERON, 1990 e SÁNCHEZ e VICENTE, 1999), alimentação (MICKELSEN *et al.*, 1982, FOLCH, 1983, FOLCH, 1984 e MARTIN *et al.*, 1990), relações sociais (FOLCH, 1984, SALMON *et al.*, 1984, GONZALEZ *et al.*, 1988, KATZ *et al.*, 1988, ORGEUR *et al.*, 1988, MARTIN *et al.*, 1990, ORGEUR *et al.*, 1990, TILBROOK e CAMERON, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991 e ROSA e BRYANT, 2003), experiência sexual (ORGEUR e SIGNORET, 1984, SALMON *et al.*, 1984, CASTEILLA *et al.*, 1987, KATZ *et al.*, 1988, ORGEUR *et al.*, 1988 e SÁNCHEZ e VICENTE, 1999), atractividade da ovelha (TILBROOK e CAMERON, 1990, RESKO *et al.*, 1999, SÁNCHEZ e VICENTE, 1999 e SNOWDER *et al.*, 2002), grau de imobilização da ovelha (SIGNORET, 1975, SIGNORET *et al.*, 1997 e SNOWDER *et al.*, 2002), modo de a imobilizar (SNOWDER *et al.*, 2002) e das condições que envolvem a parelha durante o

cortejamento e a cópula (WOOD-GUSH, 1983, SALMON *et al.*, 1984, GONZALEZ *et al.*, 1988, TILBROOK e CAMERON, 1990 e SÁNCHEZ e VICENTE, 1999), entre outros – genoma (FOLCH, 1983, TILBROOK e CAMERON, 1990, LINDSAY, 1996, SÁNCHEZ e VICENTE, 1999, SNOWDER *et al.*, 2002 e STELLFLUG e BERARDINELLI, 2002), idade (FOLCH, 1984 e SNOWDER *et al.*, 2002), estado de saúde (CHEMINEAU *et al.*, 1991), etc..

Os valores médios dos diferentes parâmetros comportamentais avaliados neste trabalho podem ser observados no Quadro VIII. O comportamento sexual dos machos das espécies domesticadas apresenta grandes variações inter-animais (MASCARANHAS *et al.*, 1980, FOLCH, 1983, PRICE, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, TILBROOK e CAMERON, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, ALEXANDER *et al.*, 1994, LINDSAY, 1996, PRICE *et al.*, 1996, ALEXANDER *et al.*, 1999, SÁNCHEZ e VICENTE, 1999, BENCH *et al.*, 2001 e SNOWDER *et al.*, 2002). Neste ensaio, o número total de cobrições efectuadas por sessão, o tempo de reacção e a duração do intervalo médio de tempo entre a 1ª-2ª cobrições variaram significativamente entre carneiros ($P \leq 0,001$). Os restantes parâmetros, ou não diferiram significativamente entre carneiros – número de montas efectuadas antes da 1ª cobrição – ou o cálculo estatístico não pôde ser feito (tamanho da amostra insuficiente). Em nosso entender, o número de montas produzidas antes da 1ª cobrição relacionou-se, efectivamente, mais com o comportamento do manequim do que com o dos carneiros propriamente ditos. O facto da actividade sexual, em geral, e do comportamento sexual, em particular, terem variado muito entre os carneiros Churros Bragançanos resulta, muito provavelmente, de diferenças no seu património genético e da resposta individual de cada um deles face aos múltiplos factores anteriormente referidos e suas interacções.

Segundo THIMONIER (1981), MICKELSEN *et al.* (1982), FOLCH (1983), FOLCH (1984), VIJIL (1986), VIJIL (1987), ORTAVANT *et al.* (1988), VIJIL (1989), XU *et al.* (1993), GORDON (1997), WALKDEN-BROWN *et al.* (1999), GERLACH e AURICH (2000), PINCKARD *et al.* (2000b), ROSA *et al.* (2000), EL-ALAMY *et al.* (2001), MARTIN *et al.* (2002), STELLFLUG (2002) e ROSA e BRYANT (2003), o desempenho sexual dos carneiros varia ao longo do ano. De um modo geral, este é maior sob um fotoperíodo decrescente e menor sob um fotoperíodo crescente (MASCARANHAS *et al.*, 1980, FOLCH, 1984, VIJIL, 1986, VIJIL, 1987, ORTAVANT *et al.*, 1988, VIJIL, 1989, CHEMINEAU *et al.*, 1991, FOLCH, 1993, GORDON, 1997, PINCKARD *et al.*, 2000b, ROSA *et al.*, 2000 e EL-ALAMY *et al.*, 2001). Porém, SÁNCHEZ e VICENTE (1999) e TAHA *et al.* (2000) afirmam que a libido se mantém relati-

vamente constante ao longo do ano. THIMONIER (1981), VIJIL (1987) e CHEMINEAU *et al.* (1991) chamam a atenção para o facto de, normalmente, os carneiros treinados apresentarem variações muito limitadas no seu desempenho sexual. Efectivamente, BOLAND *et al.* (1985) não foram capazes de identificar qualquer variação mensal significativa na libido de carneiros Suffolk, Texel e Dorset Horn. No mesmo sentido, VIJIL (1986) e VIJIL (1989) verificaram que o comportamento sexual dos carneiros Manchegos não varia significativamente ao longo do ano. O mesmo sucedeu com MASCARANHAS *et al.* (1980), trabalhando com carneiros Merino Precoce e Frisserra e TAHA *et al.* (2000) com carneiros Awassi e Barki.

No presente ensaio, o número total de cobrições efectuadas por sessão, o número de montas produzidas antes da 1ª cobrição e o tempo de reacção apresentaram variações mensais significativas ($P \leq 0,05$) (Quadro VIII). Os restantes parâmetros comportamentais estudados ou não variaram significativamente em função do mês ($P > 0,05$) ou a análise estatística não pôde ser feita devido ao insuficiente tamanho da amostra. O desempenho sexual menos bom apresentado pelos carneiros Churros Bragançanos no mês de Janeiro está, muito provavelmente, relacionado com o facto deste trabalho ter tido início nesse mesmo mês. A restante variação mensal dos parâmetros comportamentais acima referidos parece-nos ser casual. Na realidade, do ponto de vista sazonal, nenhum dos parâmetros comportamentais estudados variou significativamente ($P > 0,05$) (Quadro IX).

Não existe nenhum teste ou conjunto de testes que permita avaliar, com todo o rigor, o comportamento sexual dos carneiros. Da consulta da bibliografia relativa a este assunto, rapidamente sobressai o facto dos vários autores utilizarem diferentes testes para avaliar o comportamento sexual, que os resultados são geralmente muito variáveis (elevados coeficientes de variação) e que as interpretações envolvem sempre um certo grau de “subjectividade”, apesar do esforço sistematicamente feito pelos diferentes autores em sentido contrário. Na realidade, a repetibilidade dos vários testes normalmente utilizados na avaliação do comportamento sexual é muito baixa (TILBROOK e CAMERON, 1990 e SNOWDER *et al.*, 2002). Ainda que estes testes nos dêem uma ideia geral do nível da actividade sexual (FOLCH, 1984 e FABRE-NYS, 2000), eles não nos permitem dissociar, por exemplo, as componentes motivacional e de eficácia copuladora (FABRE-NYS, 2000).

QUADRO VIII – Variação mensal do valor médio dos parâmetros comportamentais estudados, ao longo do ano de 1998 ($\bar{x} \pm \text{sd}$; c.v.)

Parâmetros	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
Nº total de cobrições	1,6 ^a ±0,8 (49,3%)	1,9 ^{ab} ±0,6 (28,9%)	2,0 ^{ab} ±0,7 (37,2%)	2,1 ^{ab} ±0,8 (40,2%)	2,1 ^{ab} ±0,8 (36,8%)	2,2 ^{ab} ±1,1 (52,8%)	1,8 ^a ±0,8 (42,7%)	2,4 ^b ±0,7 (28,6%)	2,0 ^{ab} ±0,7 (36,8%)	2,1 ^{ab} ±0,9 (41,5%)	2,1 ^{ab} ±0,9 (41,9%)	1,8 ^{ab} ±0,8 (43,8%)
Nº de montas antes 1ª cobrição	3,2 ^a ±5,0 (154,6%)	1,4 ^{ab} ±2,7 (197,3%)	0,7 ^b ±1,0 (149,2%)	0,4 ^b ±0,9 (223,6%)	0,5 ^b ±1,2 (229,2%)	1,9 ^{ab} ±4,0 (203,9%)	0,4 ^b ±0,7 (189,7%)	0,3 ^b ±0,7 (251,6%)	0,8 ^b ±1,3 (159,3%)	2,2 ^{ab} ±4,2 (189,4%)	1,0 ^b ±1,7 (189,2%)	0,2 ^b ±0,7 (312,0%)
Tempo reacção (s)	48,4 ^a ±62,0 (127,9%)	24,7 ^{ab} ±25,9 (104,9%)	22,0 ^b ±18,1 (82,4%)	17,5 ^b ±13,7 (78,0%)	33,8 ^{ab} ±45,6 (135,0%)	24,1 ^{ab} ±25,3 (105,2%)	18,9 ^b ±14,4 (76,3%)	17,2 ^b ±12,5 (72,6%)	23,9 ^{ab} ±31,2 (130,3%)	37,2 ^{ab} ±62,0 (166,5%)	18,0 ^b ±21,0 (116,8%)	14,4 ^b ±12,6 (87,6%)
Nº de montas antes 2ª cobrição	1,2 ^a ±1,7 (136,5%)	5,4 ^a ±24,8 (457,3%)	0,5 ^a ±1,0 (204,6%)	1,2 ^a ±1,7 (142,3%)	0,5 ^a ±1,0 (214,3%)	0,8 ^a ±1,2 (163,3%)	0,4 ^a ±0,7 (212,9%)	0,2 ^a ±0,6 (266,1%)	1,0 ^a ±1,4 (143,8%)	3,3 ^a ±4,0 (124,6%)	1,3 ^a ±1,9 (141,5%)	0,1 ^a ±0,5 (424,3%)
Intervalo 1-2ª cobrição (s)	130,7 ^a ±56,8 (43,4%)	121,3 ^a ±56,3 (46,4%)	122,5 ^a ±66,4 (54,2%)	123,1 ^a ±77,4 (62,9%)	117,1 ^a ±52,4 (44,7%)	92,2 ^a ±56,1 (60,8%)	131,9 ^a ±76,5 (58,0%)	93,0 ^a ±64,2 (69,0%)	110,8 ^a ±71,0 (64,0%)	145,0 ^a ±87,8 (60,6%)	114,6 ^a ±75,3 (65,7%)	112,2 ^a ±69,2 (61,7%)
Nº de montas antes 3ª cobrição	0,8 ^a ±0,4 (55,9%)	0,3 ^a ±0,5 (200,0%)	0,3 ^a ±0,5 (170,8%)	0,6 ^a ±1,1 (169,7%)	0,7 ^a ±1,6 (244,9%)	0,9 ^a ±1,5 (170,8%)	-	0,1 ^a ±0,3 (400,0%)	2,5 ^a ±4,2 (169,2%)	1,3 ^a ±1,2 (86,6%)	1,4 ^a ±1,9 (136,8%)	-
Intervalo 2-3ª cobrição (s)	157,4 ^a ±71,8 (45,6%)	159,0 ^a ±25,7 (16,1%)	131,7 ^a ±64,2 (48,7%)	143,8 ^a ±59,3 (41,2%)	99,5 ^a ±49,3 (49,6%)	111,4 ^a ±64,2 (57,6%)	115,0 ^a ±44,0 (38,3%)	131,5 ^a ±50,7 (38,6%)	117,3 ^a ±60,0 (51,1%)	173,0 ^a ±72,9 (42,1%)	180,4 ^a ±82,5 (45,7%)	113,0 ^a ±32,5 (28,8%)
Nº de montas antes 4ª cobrição	-	-	-	1,5±0,7 (47,1%)	-	-	-	-	-	1	-	-
Intervalo 3-4ª cobrição (s)	-	-	58	120,0 ^a ±9,9 (8,2%)	96,0 ^a ±19,8 (20,6%)	49,5 ^a ±14,8 (30,0%)	126	132,9 ^a ±68,3 (51,5%)	74	246,0	171,3 ^a ±46,8 (27,3%)	144
Nº de montas antes 5ª cobrição	-	-	-	-	-	0,5±0,7 (141,4%)	-	-	-	-	-	-
Intervalo 4-5ª cobrição (s)	-	-	106	-	-	93,0±48,1 (51,7%)	-	-	-	-	-	-

(s) – segundos

a≠b, para P≤0,05 (entre meses, mesmo parâmetro).

QUADRO IX – Variação sazonal do valor médio dos vários parâmetros comportamentais estudados ($\bar{x} \pm sd$; c.v.)

Parâmetros	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Anual
Número total de cobrições	1,8 ^a ± 0,7 (39,0%)	2,1 ^a ± 0,9 (43,5%)	2,1 ^a ± 0,8 (36,7%)	2,0 ^a ± 0,8 (41,5%)	2,0 ± 0,8 (40,4%)
Número de montas antes da 1 ^a cobrição	1,5 ^a ± 3,2 (213,4%)	0,9 ^a ± 2,4 (256,7%)	0,5 ^a ± 1,0 (199,3%)	1,0 ^a ± 2,4 (232,6%)	1,0 ± 2,4 (243,8%)
Tempo de reacção (segundos)	29,1 ^a ± 37,7 (129,7%)	24,9 ^a ± 31,3 (125,8%)	19,8 ^a ± 20,7 (104,5%)	20,5 ^a ± 32,8 (159,6%)	24,0 ± 31,3 (130,3%)
Número de montas antes da 2 ^a cobrição	2,3 ^a ± 14,4 (626,1%)	0,7 ^a ± 1,3 (174,5%)	0,5 ^a ± 1,0 (204,8%)	1,6 ^a ± 2,6 (166,4%)	1,2 ± 7,6 (624,9%)
Intervalo 1-2 ^a cobrição (segundos)	127,2 ^a ± 63,0 (49,5%)	109,5 ^a ± 61,6 (56,3%)	106,9 ^a ± 70,0 (65,5%)	117,6 ^a ± 75,3 (64,0%)	114,8 ± 67,0 (58,3%)
Número de montas antes da 3 ^a cobrição	0,4 ^a ± 0,5 (129,0%)	0,7 ^a ± 1,3 (188,7%)	0,6 ^a ± 2,2 (353,3%)	1,3 ^a ± 1,7 (131,7%)	0,7 ± 1,6 (226,3%)
Intervalo 2-3 ^a cobrição (segundos)	148,9 ^a ± 48,9 (32,8%)	116,4 ^a ± 60,3 (51,8%)	125,7 ^a ± 50,5 (40,2%)	171,9 ^a ± 48,9 (32,8%)	136,4 ± 61,0 (44,7%)
Número de montas antes da 4 ^a cobrição	-	0,4 ^a ± 0,8 (183,6%)	-	0,3 ^a ± 0,5 (200,0%)	-
Intervalo 3-4 ^a cobrição (segundos)	144	84,1 ^a ± 33,3 (39,6%)	121,8 ^a ± 57,9 (47,5%)	190 ^a ± 53,4 (28,1%)	123,6 ± 59,9 (48,5%)
Número de montas antes da 5 ^a cobrição	-	0,3 ± 0,6 (173,2%)	-	-	-
Intervalo 4-5 ^a cobrição (segundos)	-	97,3 ± 34,8 (35,8%)	-	-	-

a=a, para P>0,05 (entre estações, mesmo parâmetro).

Neste estudo, o número total de cobrições realizadas por sessão correlacionou-se, negativamente, com a duração do tempo de reacção ($r = -0,278$; $P \leq 0,001$) e com a duração dos intervalos entre a 1^a-2^a ($r = -0,477$; $P \leq 0,001$), a 2^a-3^a ($r = -0,588$; $P \leq 0,001$) e a 3^a-4^a cobrições ($r = -0,547$; $P \leq 0,001$). A correlação observada entre o número total de cobrições e a duração do intervalo entre a 4^a-5^a cobrições não pôde ser calculada, uma vez que, ao longo de todo o ano, somente um carneiro realizou e apenas por três vezes, 5 cobrições por sessão de recolha de dados: 1 vez no mês de Março e 2 vezes no mês de Junho. De um

modo geral, a expressividade das correlações acima referidas aumentou com o número de cobrições já realizadas (dentro da mesma sessão) e resulta certamente do aumento progressivo da duração do estado refractário (ou de latência) entre ejaculações e do grau de saciedade sexual atingido pelos carneiros.

O número de montas efectuadas antes de uma cobrição pode ter várias origens, significados e consequências. Neste trabalho, o número de montas que precederam a 1ª cobrição foi essencialmente determinado por dificuldades apresentadas por alguns carneiros em encontrar a entrada na vagina, porque a ovelha em cio induzido nem sempre colaborava (mexia-se muito, colocava a cauda à frente da vagina ou flectia os membros posteriores) ou porque estes não encontraram “imediatamente” a melhor orientação corporal relativamente à do manequim. Efectivamente, antes da consumação da 1ª cobrição, os carneiros Churros Bragançanos pareceram sempre altamente motivados, até porque não se sentiam minimamente compelidos a cortejar primeiramente a ovelha em cio induzido. Em nosso entender, este acontecimento terá resultado, fundamentalmente, da experiência anteriormente adquirida por estes carneiros ao longo do treino e até do estudo. Porém, com o aumento do número de montas, realizadas sempre com grande intensidade e determinação, foram surgindo sinais de cansaço e de frustração. Pensamos que estes factos poderão ter estado na origem da correlação negativa ($r = -0,254$; $P \leq 0,001$) encontrada entre o número de montas efectuadas antes da 1ª cobrição e o número total de cobrições produzidas.

Depois de aberta a cancela, a maioria dos carneiros estudados corria para o manequim, saltava-o, introduzia o pénis na sua vagina e ejaculava em poucos segundos. Neste cenário geral, logicamente, a realização de uma ou mais montas traduziu-se num aumento do tempo de reacção. Efectivamente, o número de montas produzidas antes da 1ª cobrição correlacionou-se negativamente com a duração do tempo de reacção ($r = -0,788$; $P \leq 0,001$). A expressividade desta correlação revelou-se elevada, ou seja, 62,0% da variação do tempo de reacção pode ser explicada pelo número de montas produzidas pelos carneiros antes da consumação da 1ª cobrição.

Após a realização da 1ª cobrição, alguns carneiros Churros Bragançanos passaram a cortejar, ainda que esporadicamente, a ovelha em cio induzido. Do repertório de cortejamento apresentado faziam parte algumas vocalizações, o cheirar da região anogenital, mui-

to excepcionalmente o reflexo de *flehmen*, a percussão dos quartos traseiros e as montas. Sem dúvida alguma, o padrão de cortejamento mais frequente foi o das montas. Em nossa opinião, elas foram usadas mais para elevar o grau de excitação dos próprios carneiros do que para estimular a ovelha. O facto de só alguns carneiros, para mais pontualmente, terem cortejado o manequim, relaciona-se, certamente, com o estado de imobilidade deste, com a experiência anteriormente adquirida ou com a distração causada pelos outros carneiros ou pelo observador. Contudo, especialmente após a consecução de várias cobrições, algumas destas montas pareceram-nos resultar de cansaço ou do atingir de um elevado grau de saciedade sexual. Assim se poderá explicar o facto da duração dos intervalos entre a 1^a-2^a ($r = -0,311$; $P \leq 0,001$), a 2^a-3^a ($r = -0,126$; $P \leq 0,001$), a 3^a-4^a ($r = -0,213$; $P \leq 0,001$) e a 4^a-5^a cobrições ($r = -0,738$; $P \leq 0,001$) terem sido negativamente afectadas pelo número de montas que as precederam imediatamente e de apenas no último caso a expressividade da correlação encontrada ter sido assinalável (54,4%).

2.2 – TRATAMENTOS DE LUZ E MELATONINA

Nos ovinos, a actividade reprodutora sazonal pode ser manipulada através da aplicação de tratamentos luminosos (MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001) ou da administração de melatonina exógena (MALPAUX *et al.*, 1996a,b, MALPAUX *et al.*, 2001, FORCADA *et al.*, 2002, MISZTAL *et al.*, 2002 e ABECIA *et al.*, 2003). Quando se submetem estes animais à aplicação de um regime luminoso de “dias curtos” (MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001) ou se lhes administra melatonina exógena (MALPAUX *et al.*, 1996a, MALPAUX *et al.*, 2001, FORCADA *et al.*, 2002 e MISZTAL *et al.*, 2002) eleva-se a sua secreção de GnRH/LH e, consequentemente, estimula-se a sua actividade reprodutora. Pelo contrário, quando os ovinos são sujeitos a um regime luminoso de “dias longos” reduz-se a sua secreção de GnRH/LH e, consequentemente, deprime-se esta mesma actividade (REITER, 1993, HERBOSA *et al.*, 1995, SONG e BARTNESS, 1996 e GOLDMAN, 2001). Ainda que a aplicação destes tratamentos determine respostas mais evidentes nas ovelhas, elas produ-

zem-se também nos carneiros (ORTAVANT *et al.*, 1988, CHEMINEAU *et al.*, 1996, GERLACH e AURICH, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003).

Tal como já foi anteriormente referido, o carneiro é um reprodutor sazonal que apresenta níveis máximos de actividade sexual nos finais do Verão e no Outono e mínimos no Inverno-Primavera. Assim, procurou-se avaliar o impacto da aplicação dos tratamentos acima referidos – luminoso de “dias curtos” e administração de melatonina exógena – sobre a actividade sexual dos carneiros da raça Churra Galega Bragançana, ao longo da Primavera. Para o efeito, avaliou-se a variação mensal do peso corporal e da CC, dos níveis plasmáticos de testosterona total, do tamanho dos testículos, de várias características seminais e de alguns parâmetros definidores do comportamento sexual destes animais.

Durante o Inverno (período pré-tratamentos: 21 de Dezembro a 21 de Março), todos os carneiros estudados foram sujeitos ao fotoperíodo natural, embora estivessem já alojados nas instalações com controlo de luz da UTAD. O período de tratamentos propriamente dito teve início a 22 de Março e terminou a 21 de Junho.

2.2.1 – VARIAÇÃO DO PESO E DA CONDIÇÃO CORPORAL

Nesta parte do presente trabalho, o conjunto dos carneiros Churros Bragançanos estudados pesava, em média, $71,9 \pm 7,7$ kg (c.v. = 10,7%). As diferenças de peso corporal encontradas entre carneiros foram sempre estatisticamente significativas ($P \leq 0,001$). Uma vez mais, o peso dos diversos carneiros seleccionados para a realização deste trabalho revelou-se algo heterogéneo.

No período pré-tratamentos, o peso corporal médio dos carneiros Churros Bragançanos não variou significativamente em função do grupo (Testemunha: $68,5 \pm 5,8$ kg, Luz: $71,0 \pm 8,7$ kg e Melatonina: $71,1 \pm 7,6$ kg; para $P > 0,05$). Pelo contrário, o peso corporal médio destes carneiros variou significativamente em função do mês ($P \leq 0,01$). De Dezembro a Fevereiro, as diferenças observadas mostraram-se estatisticamente não significativas ($P > 0,05$) (Figura 41). Porém, de Fevereiro para Março o peso corporal médio dos carneiros estudados elevou-se marcadamente ($P \leq 0,01$).

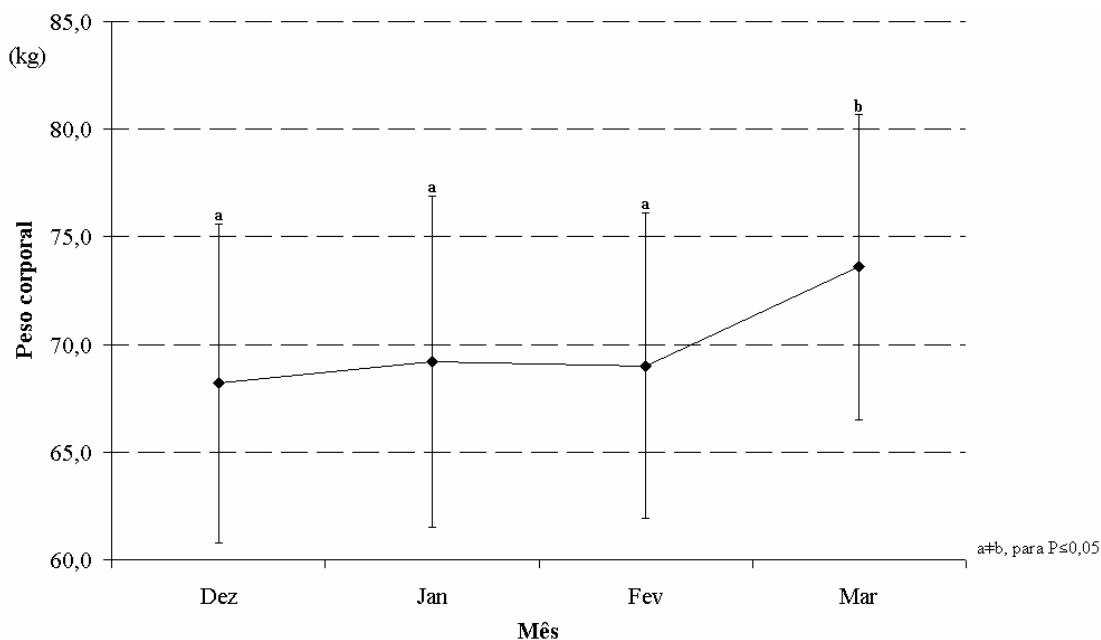


FIGURA 41 – Variação mensal do peso corporal médio (kg) dos carneiros estudados, no período pré-tratamentos ($\bar{x} \pm sd$).

Durante o período de tratamentos, os carneiros pertencentes ao grupo Luz apresentaram um peso corporal médio superior ao dos carneiros do grupo Melatonina ($75,4 \pm 8,6$ kg vs. $72,1 \pm 7,5$ kg; para $P \leq 0,05$). Por seu turno, o peso corporal médio dos carneiros do grupo Testemunha ($73,8 \pm 5,4$ kg) não diferiu significativamente do registado nos outros dois grupos ($P > 0,05$). É possível que estes resultados reflectam, essencialmente, o estabelecimento de reajustes sociais no acesso e consumo de alimentos, pois no dia 22 de Março os carneiros do grupo Luz foram colocados noutra sala com controlo de luz. Mais, a partir dessa data, reduziu-se a quantidade de alimento concentrado distribuído por animal (o que normalmente origina um aumento da competição pelo alimento), a fim de se evitar que o conjunto dos carneiros estudados continuasse a engordar (ver variação da CC) e dessa forma se desvirtuasse o principal objectivo deste estudo, adicionando-lhe um importante factor de “ruído” (alteração significativa do *status* energético dos animais). Nesta parte do ensaio, conseguiu-se efectivamente evitar que as variações mensais do peso corporal médio fossem estatisticamente significativas, em todos os grupos formados ($P > 0,05$) (Figura 42).

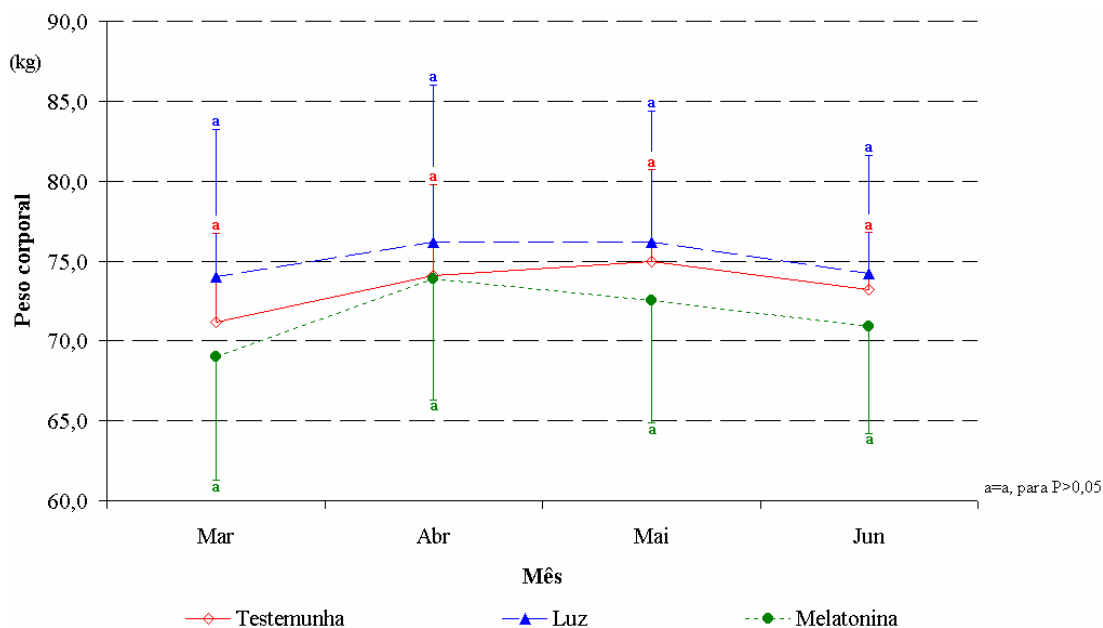


FIGURA 42 – Variação mensal do peso corporal médio (kg) dos carneiros dos vários grupos estudados, durante o período de tratamentos ($\bar{x} \pm sd$).

No que diz respeito à CC, o valor médio do conjunto de carneiros estudados foi de 3,5. Antes de se proceder a qualquer tratamento estatístico, os carneiros de cada grupo foram agrupados em apenas duas classes de CC – “normais” (2,5-3,0) e “gordos” ($\geq 3,5$) –, uma vez que se verificou que nenhum deles apresentava uma $CC \leq 2,0$ (“magros”). As diferenças encontradas entre grupos, quanto à CC, mostraram-se sempre (períodos pré e de tratamentos) estatisticamente não significativas ($P > 0,05$). Pelo contrário, a CC variou significativamente em função do mês (Quadro X).

A CC dos carneiros estudados elevou-se entre Dezembro e Março, após o que passou a variar de uma forma aparentemente aleatória. Poder-se-ia então pensar que a aplicação do fotoperíodo crescente determinou uma melhoria do estado nutricional dos carneiros estudados. Efectivamente, autores como BOCQUIER *et al.* (1998), CHILLIARD *et al.* (1999), FAULCONNIER *et al.* (1999), MERCER *et al.* (2001) e THIÉRY *et al.* (2002) afirmam que os animais sujeitos a um regime luminoso de “dias longos” tendem a armazenar reservas corporais de energia. Contudo, a partir de Março, o estado nutricional dos carneiros que permaneceram apenas sob um regime luminoso crescente não diferiu significativamente do apresentado pelos carneiros sujeitos a um regime luminoso de “dias curtos” ou tratados com melatonina exógena. Assim, é possível que esta melhoria geral do estado nutricional resulte apenas do

facto dos carneiros estudados terem sido sobre-alimentados, no período de Dezembro a Março. Depois de colocados nas salas com controlo de luz, num ambiente particularmente favorável, protegidos das grandes variações naturais das condições climáticas, as necessidades energéticas de manutenção dos carneiros estudados terão diminuído, nomeadamente no que se refere à termorregulação e à mobilidade. Na verdade, depois de se diminuir a quantidade de alimento concentrado distribuído, o estado nutricional destes carneiros deixou de subir continuamente.

QUADRO X – Variação mensal da distribuição percentual dos carneiros estudados por duas classes de condição corporal

Meses	Classes de condição corporal	
	2,5-3,0	$\geq 3,5$
Dezembro	55,5% ^a	44,5% ^a
Janeiro	40,6% ^b	59,4% ^b
Fevereiro	13,9% ^c	86,1% ^c
Março	3,5% ^d	96,5% ^d
Abril	17,6% ^e	82,4% ^e
Maio	5,9% ^f	94,1% ^f
Junho	11,8% ^g	88,2% ^g

c=e, c=f, c=g, d=f, e=g, f=g, para $P>0,05$; a≠b, c≠d, d≠g, para $P\leq 0,05$; d≠e, e≠f, para $P\leq 0,01$; a≠c, a≠d, a≠e, a≠f, a≠g, b≠c, b≠d, b≠e, b≠f, b≠g, para $P\leq 0,001$ (entre meses).

2.2.1.1 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E SECREÇÃO DE TESTOSTERONA TOTAL

No período pré-tratamentos, em nenhum dos grupos estudados o peso corporal se correlacionou significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total ($P>0,05$). Por seu turno, no decurso do período de tratamentos, o peso corporal e os níveis plasmáticos de testosterona total correlacionaram-se significativamente entre os carneiros dos grupos Luz ($r = 0,224$; para $P\leq 0,05$) e Melatonina ($r = 0,276$; para $P\leq 0,05$) e não significativamente entre os carneiros do grupo Testemunha ($P>0,05$). Porém, a expressividade das correlações significativas foi extremamente reduzida (5,0% e 7,6%, respectivamente).

Em nenhum momento ou circunstância, a CC afectou significativamente os níveis plasmáticos de testosterona total ($P>0,05$).

De acordo com estes resultados, e independentemente do grupo a que os carneiros pertenciam, os efeitos do estado nutricional sobre a secreção de testosterona total foram extremamente reduzidos. Para isso contribuiu certamente o facto do conjunto dos carneiros estudados ter sido sempre bem alimentado, sem grandes alterações da sua dieta e consequentemente do seu estado nutricional. Na verdade, a alteração dos níveis nutricionais dos ovinos não modifica os seus níveis plasmáticos de testosterona (TILBROOK e CAMERON, 1990 e MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995), excepto em situações extremas (MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995). Por outro lado, as diferenças registadas entre carneiros, relativamente à secreção de testosterona total, revelaram-se muito elevadas.

2.2.1.2 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E TAMANHO DOS TESTÍCULOS

Durante o período pré-tratamentos, o peso corporal e o tamanho dos testículos correlacionaram-se significativamente nos grupos Testemunha ($r = 0,362$; para $P \leq 0,01$), Luz ($r = 0,520$; para $P \leq 0,001$) e Melatonina ($r = 0,517$; para $P \leq 0,001$), embora a expressividade destas correlações tenha sido baixa (13,1%, 27,1% e 26,8%, respectivamente). No período de tratamentos, os valores destas correlações só melhoraram significativamente entre os carneiros do grupo Testemunha (Testemunha: $r = 0,556$, Luz: $r = 0,556$ e Melatonina: $r = 0,624$; para $P \leq 0,001$). A expressividade destas correlações continuou, no entanto, a ser reduzida (30,9%, 30,9% e 38,9%, respectivamente).

No decurso do período pré-tratamentos, a CC afectou significativamente o tamanho testicular dos carneiros dos grupos Testemunha (2,5-3,0: $30,4 \pm 1,3$ cm vs. $\geq 3,5$: $31,5 \pm 1,8$ cm) e Melatonina (2,5-3,0: $31,3 \pm 1,7$ cm vs. $\geq 3,5$: $32,7 \pm 2,1$ cm) ($P \leq 0,05$). Entre os carneiros do grupo Luz, a CC não influenciou significativamente o tamanho dos testículos ($P>0,05$). Por seu turno, durante o período de tratamentos, a acção da CC sobre o tamanho testicular tornou-se estatisticamente não significativa em todos os grupos estudados ($P>0,05$). É possível que este facto esteja relacionado com a homogeneidade do conjunto de carneiros estudados quanto à sua CC.

Apesar de ser geralmente aceite que o estado nutricional afecta o tamanho dos testículos (KNIGHT, 1977, MARTIN *et al.*, 1990, CHEMINEAU *et al.*, 1991, MARTIN e WALKDEN-

BROWN, 1995, ROBINSON, 1996, GORDON, 1997, PÉREZ *et al.*, 1998, MARTIN *et al.*, 2002, THIÉRY *et al.*, 2002 e BETTENCOURT *et al.*, 2003), os efeitos do estado nutricional sobre o tamanho testicular dos carneiros Churros Bragançanos foram sempre muito reduzidos, independentemente do grupo considerado. É provável que esta ocorrência se relacione com o facto de todos os carneiros estudados terem sido sempre bem alimentados, sem grandes variações na sua dieta e consequentemente no seu estado nutricional. Porém, não se pode excluir a hipótese de outros factores mais variáveis (nomeadamente de origem genética) terem “mascarado” a acção do estado nutricional sobre o tamanho dos testículos dos vários carneiros estudados.

2.2.1.3 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E PRODUÇÃO SEMINAL

No período pré-tratamentos, a influência do peso corporal sobre a produção quantitativa de sémen, avaliada na mesma altura, variou em função do tratamento aplicado. Entre os carneiros do grupo Testemunha, o peso corporal apenas se correlacionou significativamente com o volume seminal ($r = -0,349$; para $P \leq 0,05$). Porém, a expressividade desta correlação foi muito baixa (12,2%). Nos carneiros do grupo Luz, o peso corporal só se correlacionou significativamente com a concentração espermática ($r = -0,404$; para $P \leq 0,05$). A expressividade desta correlação foi igualmente muito baixa (16,3%). Finalmente, entre os carneiros do grupo Melatonina, o peso corporal não se correlacionou significativamente com nenhum dos parâmetros seminais quantitativos analisados ($P > 0,05$). Independentemente do grupo, nenhum dos parâmetros seminais quantitativos foi significativamente afectado pelo peso corporal determinado 8 semanas antes ($P > 0,05$). Em nenhum dos grupos estudados o peso corporal afectou alguma vez significativamente a qualidade do sémen produzido (definida pelos parâmetros avaliados neste trabalho) ($P > 0,05$).

Durante o período de tratamentos, o peso corporal apenas se correlacionou significativamente com o volume seminal produzido pelos carneiros dos grupos Testemunha ($r = -0,469$; para $P \leq 0,01$) e Melatonina ($r = -0,384$; para $P \leq 0,05$) na mesma altura, embora a expressividade destas correlações tenha sido muito reduzida (22,0% e 14,8%, respectivamente). Independentemente do grupo considerado, nenhum dos parâmetros seminais quantitativos foi significativamente afectado pelo peso corporal determinado 8 semanas antes

($P > 0,05$). De novo, em todos os grupos considerados, a acção do peso corporal sobre a qualidade do sémen produzido nunca foi estatisticamente significativa ($P > 0,05\%$).

Em momento ou circunstância alguma a CC influenciou significativamente a quantidade ou a qualidade do sémen produzido ($P > 0,05$).

Segundo CHEMINEAU *et al.* (1991), a qualidade seminal não é geralmente afectada pelo estado nutricional do animal. De facto, neste ensaio, o estado nutricional não afectou a qualidade do sémen produzido pelos carneiros Churros Bragançanos. Pelo contrário, é geralmente aceite que o estado nutricional se correlaciona fortemente com a produção quantitativa de sémen (CHEMINEAU *et al.*, 1991, MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995, ROBINSON, 1996, MARTIN *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003). Contudo, os efeitos tanto a curto como a médio prazo do estado nutricional sobre a produção de sémen dos carneiros Churros Bragançanos foram sempre (períodos pré e de tratamentos) muito reduzidos, independentemente do grupo considerado. Uma vez mais, pensamos que estes resultados podem estar associados ao bom maneio alimentar a que todos os carneiros foram sistematicamente submetidos.

2.2.1.4 – RELAÇÃO ENTRE PESO E CONDIÇÃO CORPORAL E COMPORTAMENTO SEXUAL

No decurso do período pré-tratamentos, entre os carneiros do grupo Luz, o peso corporal correlacionou-se significativamente com o número total de cobrições efectuadas por sessão ($r = -0,669$; para $P \leq 0,001$), com o número de montas produzidas antes da 1ª cobrição ($r = 0,574$; para $P \leq 0,001$), com o tempo de reacção ($r = 0,433$; para $P \leq 0,01$) e com o número de montas realizadas antes da 2ª cobrição ($r = 0,579$; para $P \leq 0,001$). Porém, a expressividade destas correlações mostrou-se baixa (44,8%, 32,9%, 18,8% e 33,6%, respectivamente). Nos outros dois grupos, o peso corporal não influenciou significativamente os vários parâmetros comportamentais avaliados ($P > 0,05$).

No período de tratamentos, o peso corporal dos carneiros do grupo Testemunha correlacionou-se significativamente com o número total de cobrições produzidas por sessão ($r = -0,401$; para $P \leq 0,05$), embora a expressividade desta correlação se tenha mostrado muito reduzida (16,1%). Nos carneiros do grupo Luz, o peso corporal correlacionou-se significativamente com o número total de cobrições levadas a cabo por sessão ($r = -0,389$; para $P \leq 0,05$), com o número de montas produzidas antes da 1ª cobrição ($r = 0,669$; para

$P \leq 0,001$), com o tempo de reacção ($r = 0,489$; para $P \leq 0,01$) e com o número de montas realizadas antes da 2ª cobrição ($r = 0,457$; para $P \leq 0,05$). Neste período, a expressividade da primeira (15,1%) e da última (20,9%) correlações diminuiu significativamente em relação ao período pré-tratamentos, enquanto que a das segunda (44,7%) e terceira (23,9%) correlações se manteve baixa. Nos carneiros do grupo Melatonina, o peso corporal não afectou significativamente nenhum dos parâmetros comportamentais estudados ($P > 0,05$).

No decurso do período pré-tratamentos, entre os carneiros do grupo Luz, a CC só influenciou significativamente o número total de cobrições efectuadas por sessão ($2,5-3,0$: $3,7 \pm 1,0$ cobrições/sessão *vs.* $\geq 3,5$: $1,8 \pm 1,1$ cobrições/sessão; para $P \leq 0,001$). Nos restantes grupos, a CC não condicionou significativamente nenhum dos parâmetros comportamentais analisados ($P > 0,05$). No período de tratamentos, a CC apresentada pelos carneiros dos diferentes grupos estudados não afectou significativamente nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados ($P > 0,05$). O facto de durante o período pré-tratamentos, entre os carneiros do grupo Luz, a CC ter influenciado o número total de cobrições realizadas por sessão é, provavelmente, fruto do acaso, uma vez que este efeito apenas se produziu entre os carneiros deste grupo antes da aplicação efectiva dos diferentes tratamentos e numa altura em que as diferenças de peso e de CC entre os carneiros dos diferentes grupos estudados eram estatisticamente não significativas.

Só em situações extremas, o estado nutricional condiciona significativamente o desempenho sexual dos carneiros (TILBROOK e CAMERON, 1990 e CHEMINEAU *et al.*, 1991). De acordo com os resultados por nós observados, na generalidade dos carneiros estudados, os efeitos do estado nutricional sobre o comportamento sexual foram muito reduzidos. De facto, acreditamos que estes resultados podem estar relacionados com o bom manejo alimentar a que todos os carneiros Churros Bragançanos foram submetidos.

2.2.2 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL

Nesta parte do estudo, o nível plasmático médio de testosterona total do conjunto de carneiros estudados foi de $3,1 \pm 3,3$ ng/ml (c.v. = 108,2%). As diferenças encontradas entre carneiros revelaram-se sempre (períodos pré e de tratamentos) estatisticamente significativas ($P \leq 0,001$), o que revela a elevada heterogeneidade do grupo de carneiros utilizados, relativamente a este parâmetro.

No decurso do período pré-tratamentos, os níveis plasmáticos médios de testosterona total dos carneiros do grupo Luz ($1,1 \pm 1,2$ ng/ml) revelaram-se estatisticamente inferiores aos dos carneiros dos grupos Testemunha ($1,7 \pm 1,7$ ng/ml) e Melatonina ($1,9 \pm 2,0$ ng/ml), que não diferiram significativamente entre si ($P>0,05$). Em todos os grupos considerados, os níveis plasmáticos médios de testosterona total não variaram significativamente em função do mês ($P>0,05$) (Figura 43).

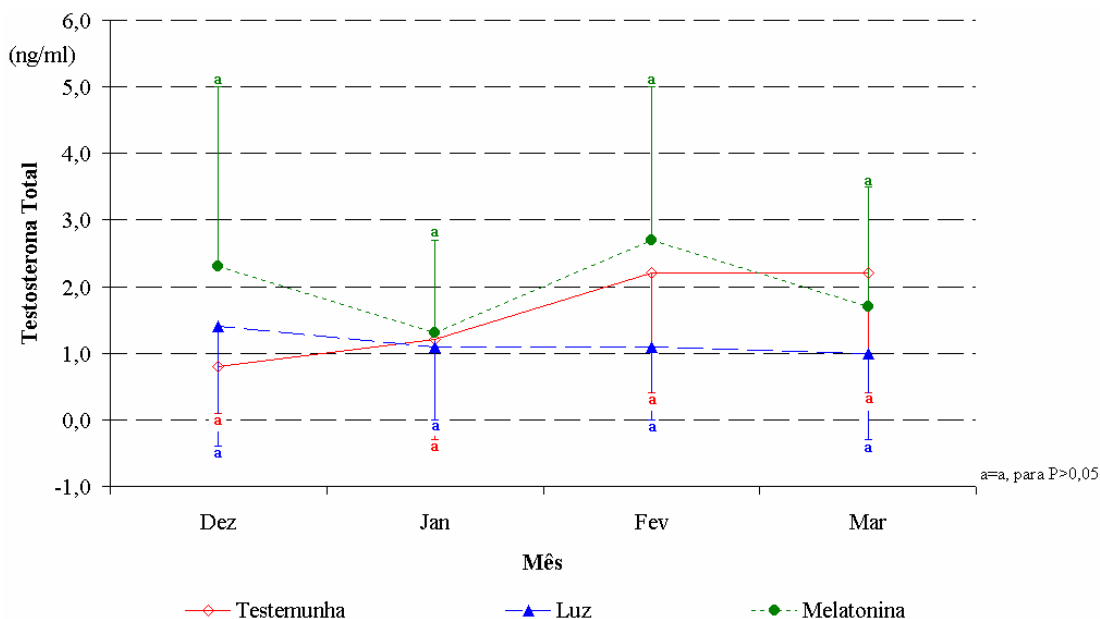


FIGURA 43 – Variação mensal dos níveis plasmáticos médios (ng/ml) de testosterona total dos carneiros dos vários grupos estudados, durante o período pré-tratamentos ($\bar{x} \pm sd$).

Durante o período de tratamentos, os níveis plasmáticos médios de testosterona total variaram significativamente em função do tratamento aplicado ($P\leq 0,05$). Os carneiros do grupo Luz ($5,5 \pm 4,7$ ng/ml) apresentaram níveis plasmáticos médios de testosterona total superiores aos dos carneiros dos grupos Testemunha ($3,6 \pm 2,5$ ng/ml) e Melatonina ($3,9 \pm 3,7$ ng/ml) ($P\leq 0,05$). As diferenças observadas entre estes dois últimos grupos revelaram-se estatisticamente não significativas ($P>0,05$). De igual modo, os níveis plasmáticos médios de testosterona total variaram significativamente em função do mês ($P\leq 0,05$) (Figura 44). Nos carneiros do grupo Testemunha, os níveis plasmáticos médios desta hormona elevaram-se, progressivamente, entre Março e Junho, embora a única diferença estatística-

mente significativa se tenha produzido entre os meses de Março e de Junho ($P \leq 0,05$). Entre os carneiros do grupo Luz, os níveis plasmáticos médios de testosterona total registados nos meses de Março e Abril foram estatisticamente inferiores aos observados nos meses de Maio e Junho ($P \leq 0,05$). As variações mensais deste parâmetro mostraram-se estatisticamente não significativas entre os carneiros do grupo Melatonina ($P > 0,05$).

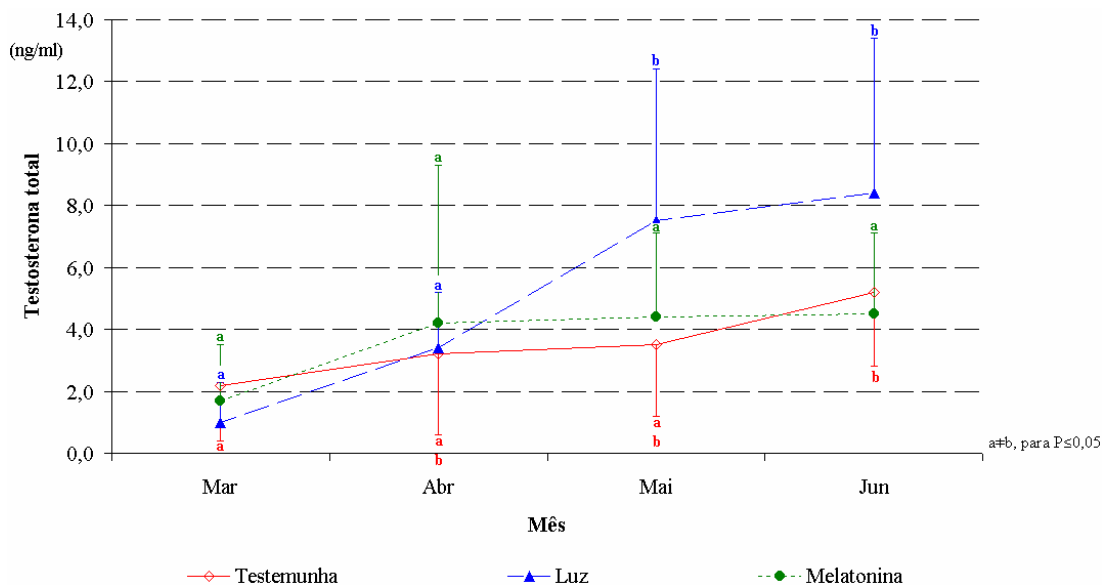


FIGURA 44 – Variação mensal dos níveis plasmáticos médios (ng/ml) de testosterona total, no período de tratamentos ($\bar{x} \pm sd$).

No período de Dezembro a Março, as diferenças encontradas entre grupos, relativamente aos níveis plasmáticos de testosterona total, são certamente fruto do acaso, porque durante este período de tempo os grupos ainda não tinham sido efectivamente formados e porque todos os carneiros estudados estavam sujeitos ao mesmo tipo de manejo (regime luminoso, alimentação, tipo de alojamento, etc.).

De acordo com BOLAND *et al.* (1985), a passagem de um regime luminoso crescente para outro de “dias curtos” não afecta significativamente a secreção de testosterona em carneiros das raças Suffolk, Texel e Dorset Horn. Pelo contrário, no presente trabalho, a aplicação do tratamento luminoso “dias curtos” determinou uma elevação dos níveis plasmáticos médios de testosterona total. Contudo, este efeito não foi identificado entre os carneiros tratados com implantes subcutâneos de melatonina. Esta diferença revelou-se algo surpreendente, pois WILLIAMS e HELLIWELL (1993), WARREN e CASSONE (1995), CHEMI-

NEAU *et al.* (1996), MALPAUX *et al.* (1996b), LINCOLN e CLARKE (1997), LINCOLN (2000) e FORCADA *et al.* (2002) afirmam que, nos ovinos expostos a um regime luminoso de “dias longos”, a administração de melatonina exógena mimetiza o efeito dos “dias curtos”. O mesmo sucede em carneiros sujeitos a um fotoperíodo crescente (WEBSTER *et al.*, 1991 e ROSA *et al.*, 2000). É provável que esta diferença resulte apenas do facto de, ao contrário do que sucedeu entre os carneiros do grupo Melatonina, os níveis plasmáticos médios de testosterona total terem aumentado com o passar do tempo entre os carneiros do grupo Luz. De facto, a interacção Tratamento x Mês foi estatisticamente significativa ($P \leq 0,01$), cabendo mesmo à variável Mês um efeito estatisticamente superior ao da variável Tratamento ($P \leq 0,001$ vs. $P \leq 0,05$). Contudo, há que considerar a hipótese da aplicação destes tratamentos ter originado diferentes padrões diários de secreção de LH/testosterona. Assim, por exemplo, é possível que a interpretação temporal do momento do “amanhecer” não tenha sido a mesma nos carneiros dos grupos Luz e Melatonina. Por outro lado, pode ser que estes dois tratamentos tenham de facto afectado de forma diversa a frequência ou a amplitude da secreção diária de LH/testosterona. A metodologia utilizada neste ensaio não permitiu confirmar nem rejeitar nenhuma destas hipóteses.

Nos ovinos, o aumento dos níveis circulantes de melatonina, independentemente de ser induzido por um tratamento luminoso de “dias curtos” (CHEMINEAU *et al.*, 1996, PELLETIER, 1986, MALPAUX *et al.*, 1996b, MALPAUX *et al.*, 1997, MALPAUX *et al.*, 1998 e MALPAUX *et al.*, 2001) ou pela colocação de implantes subcutâneos de melatonina (FITZGERALD e STELLFLUG, 1991, WEBSTER *et al.*, 1991, CHEMINEAU *et al.*, 1996, MALPAUX *et al.*, 1996a, ROSA *et al.*, 2000, MALPAUX *et al.*, 2001, FORCADA *et al.*, 2002, MISZTAL *et al.*, 2002 e ROSA e BRYANT, 2003), determina um aumento da secreção de LH. LINCOLN e DAVIDSON (1977) e ROSA e BRYANT (2003) afirmam que a hipófise responde de uma forma relativamente rápida à variação do fotoperíodo. Nos carneiros Soay, a passagem brusca de um regime luminoso de “dias longos” para um regime luminoso de “dias curtos” conduz, no prazo de 2 (LINCOLN, 1976, LINCOLN e DAVIDSON, 1977, ROSA *et al.*, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003) a 4 semanas (LINCOLN e DAVIDSON, 1977, ROSA *et al.*, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003), a uma elevação significativa da secreção de LH. Por seu turno, a elevação da secreção de LH promove um aumento quase imediato da secreção de testosterona (LINCOLN e DAVIDSON, 1977, ORTAVANT *et al.*, 1988, ROSA *et al.*, 2000 e ROSA e

BRYANT, 2003) que, no entanto, só adquire significado estatístico 3-4 semanas (ORTA-VANT *et al.*, 1988) ou 3-6 semanas (LINCOLN e DAVIDSON, 1977) depois. No presente trabalho, a passagem brusca de um regime luminoso crescente para outro de “dias curtos” determinou um aumento estatisticamente significativo dos níveis plasmáticos médios de testosterona total, cerca de 8 semanas mais tarde. De acordo com ROSA e BRYANT (2003), a resposta sexual dos carneiros de diferentes raças à acção do fotoperíodo é frequentemente diferente e não depende do próprio sinal “melatonina”, mas sim da via através da qual este sinal alcança o cérebro.

Segundo ROMÃO *et al.* (2003) e ROSA e BRYANT (2003), 2-3 semanas após a colocação de implantes subcutâneos de melatonina produz-se um aumento significativo dos níveis circulantes de testosterona. Nos carneiros por nós estudados, ainda que a administração de melatonina exógena tenha conduzido a uma aparente elevação dos níveis plasmáticos médios de testosterona total (particularmente no 1º mês), esta nunca chegou a adquirir significado estatístico. Ao que tudo parece indicar, o tratamento luminoso de “dias curtos” e a administração de melatonina exógena afectaram de forma muito diferente a evolução mensal dos níveis plasmáticos médios de testosterona total. Este facto pode eventualmente estar relacionado com a colocação de um número demasiado elevado de implantes subcutâneos de melatonina em cada carneiro ($n = 3$). Na semana em que estes implantes foram colocados, os carneiros do grupo Melatonina pesavam, em média, $69,0 \pm 7,7$ kg (mínimo: 55,1 kg vs. máximo: 80,4 kg). No trabalho desenvolvido por ROSA *et al.* (2000), estes autores colocaram apenas 1 implante subcutâneo de melatonina por carneiro Texel e Charollais ($88,6 \pm 19,9$ kg). Por seu turno, ALCAIDE *et al.* (2001) colocaram 1 implante subcutâneo nos carneiros Manchegos mais pequenos e 2 nos carneiros de maior porte. Contudo, estes autores levantam a hipótese da colocação de 2-3 destes implantes por carneiro (situação comum em vários Centros de Inseminação Artificial de Espanha) poder melhorar ainda mais a resposta sexual dos carneiros Manchegos. Em nosso entender, os dados por nós obtidos indiciam que a dose de melatonina veiculada pelos 3 implantes subcutâneos de melatonina foi excessiva e prejudicial. Este resultado parece contrariar a informação que acompanha os implantes subcutâneos de Melovine® e segundo a qual “... é altamente improvável que se produza uma sobredosagem ...”. Porém, só o estudo aprofundado da evo-

lução temporal dos níveis plasmáticos de melatonina, de LH e de testosterona total poderia esclarecer esta situação.

O tratamento luminoso de “dias curtos” antecipou, em cerca de um mês, a elevação “natural” dos níveis plasmáticos médios de testosterona total, observada entre os carneiros do grupo Testemunha. Segundo ORTAVANT *et al.* (1988), ROSA *et al.* (2000), THIÉRY *et al.* (2002) e ROSA e BRYANT (2003), a actividade sexual dos carneiros começa a ser estimulada 1,5-2,0 meses antes da das ovelhas, de modo a que quando estas entram na estação reprodutiva os carneiros tenham já atingido um elevado nível de aptidão sexual. Assim, é possível que a elevação “natural” dos níveis plasmáticos médios de testosterona total acima mencionada esteja relacionada com o começo de uma nova estação reprodutiva. Na verdade, a estação reprodutiva das ovelhas da raça Churra Galega Bragançana tem início em meados do mês de Junho (CORREIA, 1996).

2.2.2.1 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL E TAMANHO DOS TESTÍCULOS

No período pré-tratamentos, só entre os carneiros do grupo Melatonina é que o tamanho dos testículos se correlacionou significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total determinados na mesma altura ($r = 0,262$; para $P \leq 0,05$). A expressividade desta correlação foi, no entanto, extremamente baixa (6,9%). Em nenhum dos grupos estudados o tamanho testicular se correlacionou significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total produzidos 8 semanas antes ($P > 0,05$).

Durante o período de tratamentos, o tamanho dos testículos dos carneiros dos grupos Luz ($r = 0,347$; para $P \leq 0,01$) e Melatonina ($r = 0,263$; para $P \leq 0,05$) correlacionou-se significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total determinados na mesma altura, mas não com os encontrados 8 semanas antes ($P > 0,05$). A expressividade das correlações significativas foi extremamente reduzida (12,0% e 6,9%, respectivamente). Nos carneiros do grupo Testemunha, o tamanho testicular não se correlacionou significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total determinados na mesma altura ($P > 0,05$), mas sim com os observados 8 semanas antes ($r = 0,408$; para $P \leq 0,05$). A expressividade desta correlação foi extremamente baixa (16,6%).

Tendo em conta estes dados, a acção, tanto a curto como a médio prazo, dos níveis plasmáticos de testosterona total sobre o tamanho testicular de todos os carneiros estudados foi extremamente reduzida. Estes resultados não nos surpreenderam, pois o tamanho dos testículos parece depender mais da frequência de libertação de LH/testosterona do que dos níveis circulantes destas hormonas (THIMONIER, 1981, SIMÕES, 1984, CHEMINEAU *et al.*, 1991, XU *et al.*, 1993 e MARTIN e WALKDEN-BROWN, 1995).

2.2.2.2 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL E PRODUÇÃO SEMINAL

No decurso do período pré-tratamentos, nos vários grupos estudados, a generalidade dos parâmetros seminais avaliados não se correlacionou significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total determinados na mesma altura ($P > 0,05$). Apenas a percentagem de espermatozóides normais, produzidos pelos carneiros do grupo Testemunha, se correlacionou significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total produzidos na mesma altura ($r = -0,354$; para $P \leq 0,05$). Porém, a expressividade desta correlação foi extremamente reduzida (12,5%). Independentemente do grupo considerado, os diferentes parâmetros seminais avaliados não se correlacionaram com os níveis plasmáticos de testosterona total segregados 8 semanas antes ($P > 0,05$).

No período de tratamentos, as percentagens de espermatozóides vivos ($r = -0,340$; para $P \leq 0,05$) e normais ($r = -0,349$; para $P \leq 0,05$) e a concentração espermática ($r = -0,519$; para $P \leq 0,05$) dos carneiros do grupo Testemunha correlacionaram-se significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total, determinados na mesma altura. A expressividade destas correlações foi muito baixa (11,6%, 12,2% e 27,0%, respectivamente). Entre os carneiros dos grupos Luz e Melatonina, as correlações registadas entre os vários parâmetros seminais analisados e os níveis plasmáticos de testosterona total avaliados na mesma altura revelaram-se estatisticamente não significativas ($P > 0,05$). Em todos os grupos estudados, nenhum dos parâmetros seminais considerados se correlacionou significativamente com os níveis plasmáticos de testosterona total produzidos 8 semanas antes ($P > 0,05$).

Ao que tudo parece indicar, os efeitos dos níveis plasmáticos de testosterona total sobre a quantidade e a qualidade do sêmen produzido foram extremamente reduzidos em todos os grupos considerados. Tal como já foi anteriormente referido, nos ovinos, a esper-

matogénese é fundamentalmente controlada pela secreção pulsátil das gonadotropinas FSH e LH. Nestes animais, à testosterona parece caber um papel menos importante no desenrolar deste processo.

2.2.2.3 – RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA TOTAL E COMPORTAMENTO SEXUAL

Durante os períodos pré-tratamentos e de tratamentos, em nenhum dos grupos estudados, os níveis plasmáticos de testosterona total se correlacionaram significativamente com os vários parâmetros comportamentais avaliados ($P > 0,05$). É provável que esta ocorrência dependa de vários factores, em que as dificuldades na correcta avaliação do comportamento sexual dos carneiros e o facto do comportamento sexual não ser apenas endocrinologicamente controlado pela testosterona assumem grande importância. Por outro lado, tal como já foi anteriormente referido, os carneiros inteiros segregam normalmente níveis de testosterona superiores aos necessários para promoverem o seu comportamento sexual (TILBROOK e CAMERON, 1990).

2.2.3 – VARIAÇÃO DO TAMANHO DOS TESTÍCULOS

Nesta parte do trabalho, o perímetro escrotal médio do conjunto de carneiros estudados foi de $31,7 \pm 2,2$ cm (c.v. = 7,0%). As diferenças entre carneiros revelaram-se estatisticamente significativas ($P \leq 0,001$). PELLETIER e ALMEIDA (1987), ORTAVANT *et al.* (1988), CHEMINEAU *et al.* (1991) e XU *et al.* (1993) referem, igualmente, a existência de diferenças estatisticamente significativas entre carneiros, relativamente ao tamanho dos seus testículos.

No decurso do período pré-tratamentos, o tamanho testicular médio variou significativamente, em função do grupo a que os carneiros pertenciam ($P \leq 0,05$). Em média, o valor deste parâmetro foi maior entre os carneiros do grupo Melatonina ($32,4 \pm 2,1$ cm), intermédio entre os carneiros do grupo Testemunha ($31,3 \pm 1,7$ cm) e menor entre os carneiros do grupo Luz ($30,3 \pm 2,0$ cm). Independentemente do grupo considerado, as variações mensais do tamanho médio dos testículos foram estatisticamente não significativas ($P > 0,05$) (Figura 45).

No período de tratamentos, o tamanho médio dos testículos dos carneiros do grupo Testemunha ($31,1 \pm 2,5$ cm) foi significativamente inferior ao dos carneiros dos grupos Luz ($32,2 \pm 2,1$ cm) e Melatonina ($32,7 \pm 1,9$ cm) ($P \leq 0,05$). O tamanho testicular médio dos carneiros do grupo Luz não diferiu significativamente do dos carneiros do grupo Melatonina ($P > 0,05$). A variação mensal do tamanho dos testículos só teve significado estatístico entre os carneiros do grupo Luz ($P \leq 0,01$) (Figura 46).

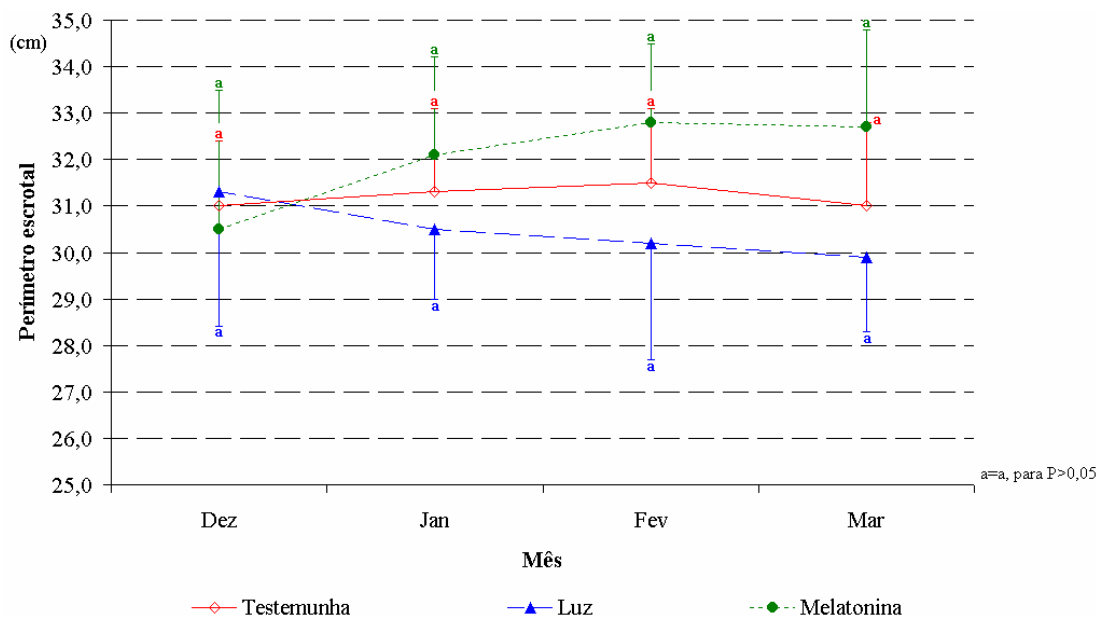


FIGURA 45 – Variação mensal do perímetro escrotal médio (cm) dos carneiros dos vários grupos estudados, durante o período pré-tratamentos ($\bar{x} \pm sd$).

Durante o período pré-tratamentos, as diferenças registadas entre grupos, relativamente ao tamanho dos testículos, só podem ser fruto do acaso, já que, no decurso deste período, todos os carneiros foram sujeitos ao mesmo tipo de manejo (regime luminoso, alimentação, tipo de alojamento, etc.).

Nos ovinos, a passagem de um regime luminoso de “dias longos” para outro de “dias curtos” determina um aumento imediato do tamanho testicular (LINCOLN, 1976, LINCOLN e DAVIDSON, 1977, LINCOLN, 1978, BARRELL e LAPWOOD, 1979, THIMONIER, 1981, LINCOLN e ALMEIDA, 1982, LINDSAY *et al.*, 1984, CHEMINEAU *et al.*, 1996, GORDON, 1997, ROSA *et al.*, 2000, ANDERSON *et al.*, 2003 e ROSA e BRYANT, 2003). Este aumento torna-se significativo no prazo de 2-3 semanas (LINCOLN, 1976 e ROSA e BRYANT, 2003) ou de 2-5 semanas (LINCOLN e DAVIDSON, 1977). Contudo, a actividade testicular só é

máxima 2-3 meses após o aumento da secreção pulsátil de LH (ANDERSON *et al.*, 2003). No nosso estudo, a aplicação do tratamento luminoso de “dias curtos” traduziu-se num aumento efectivo do tamanho testicular, que alcançou significado estatístico cerca de 8 semanas mais tarde, ou seja, simultaneamente com os níveis plasmáticos médios de testosterona total. No ensaio levado a cabo por BOLAND *et al.* (1985), a aplicação deste tratamento não afectou significativamente o tamanho testicular de carneiros Suffolk, Texel e Dorset Horn.

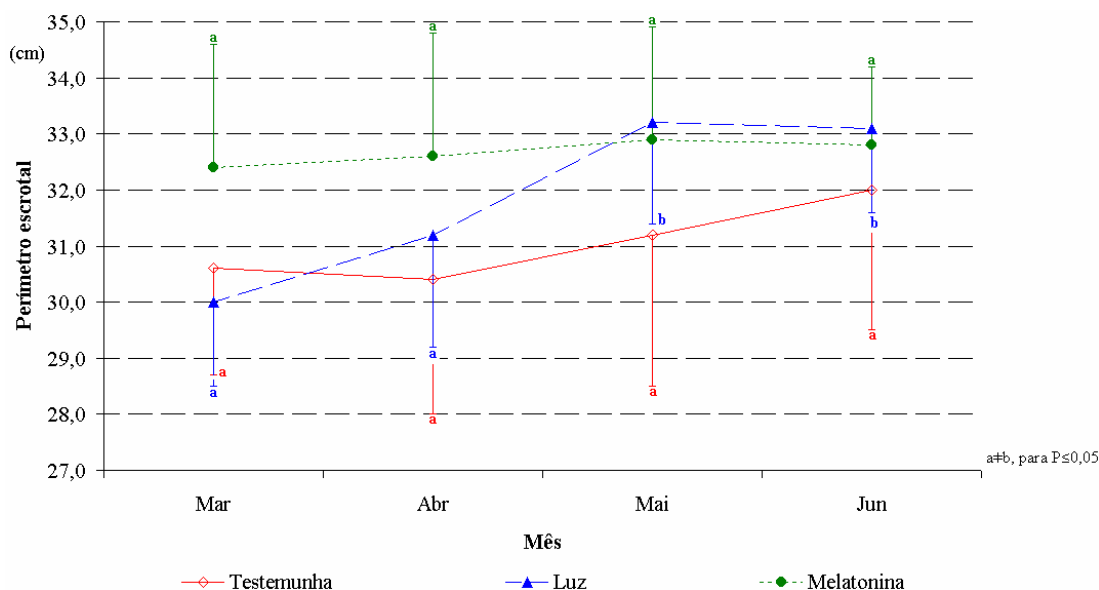


FIGURA 46 – Variação mensal do perímetro escrotal médio (cm) dos carneiros dos vários grupos estudados, durante o período de tratamentos ($\bar{x} \pm sd$).

Nos carneiros, a colocação de implantes subcutâneos de melatonina determina um aumento do tamanho dos testículos (FITZGERALD e STELLFLUG, 1991, WEBSTER *et al.*, 1991, CHEMINEAU *et al.*, 1996, GORDON, 1997 e ROSA *et al.*, 2000). Este aumento não foi, no entanto, observado em ovinos das raças Merino Preto e Campaniça (BETTENCOURT *et al.*, 2003). No nosso estudo, o tratamento com melatonina exógena também não condicionou significativamente o tamanho testicular. Tendo em conta que a administração de melatonina exógena também não alterou significativamente os níveis plasmáticos de testosterona total, parece que a aplicação deste tratamento não terá afectado significativamente os testículos dos carneiros Churros Bragançanos. Neste sentido, é possível que o tratamento com melatonina exógena não tenha sido capaz de modificar significativamente a frequência de secreção ou os níveis circulantes de LH/testosterona (e eventualmente de FSH), principais hor-

monas controladoras da actividade testicular nos ovinos (COURROT e ORTAVANT, 1981, ORTAVANT *et al.*, 1988 e CHEMINEAU *et al.*, 1991). Este facto pode também estar eventualmente associado à utilização de uma dose excessiva de melatonina exógena. Contudo, esta hipótese não pôde ser avaliada neste estudo.

2.2.3.1 – RELAÇÃO ENTRE TAMANHO DOS TESTÍCULOS E PRODUÇÃO SEMINAL

No decurso do período pré-tratamentos, apenas o volume seminal produzido pelos carneiros do grupo Testemunha se correlacionou significativamente com o tamanho dos testículos medido na mesma altura ($r = 0,400$; para $P \leq 0,05$). A expressividade desta correlação mostrou-se extremamente reduzida (16,0%). Em todos os grupos estudados, nenhum dos parâmetros seminais analisados se correlacionou significativamente com o tamanho dos testículos avaliado 8 semanas antes ($P > 0,05$).

Durante o período de tratamentos, entre os carneiros do grupo Testemunha, somente o volume seminal se correlacionou significativamente com o tamanho testicular determinado na mesma altura ($r = 0,510$; para $P \leq 0,01$). A expressividade desta correlação revelou-se muito baixa (26,0%), embora tenha sido estatisticamente superior à observada no período pré-tratamentos. Por seu turno, entre os carneiros do grupo Luz, apenas a percentagem de espermatozóides vivos se correlacionou significativamente com o tamanho dos testículos medido na mesma altura ($r = 0,321$; para $P \leq 0,05$). A expressividade desta correlação foi extremamente reduzida (10,3%). Entre os carneiros do grupo Melatonina, nenhum dos diferentes parâmetros seminais analisados se correlacionou significativamente com o tamanho testicular determinado na mesma altura ($P > 0,05$). Também neste período, independentemente do grupo considerado, os diferentes parâmetros seminais avaliados não se correlacionaram significativamente com o tamanho dos testículos avaliado 8 semanas antes ($P > 0,05$).

Ainda que alguns autores afirmem ser possível estabelecerem-se correlações estatisticamente significativas entre o tamanho testicular e a produção de sémen, outros dizem exactamente o oposto. De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, os efeitos a curto e a médio prazo do tamanho dos testículos sobre a produção quantitativa e qualitativa de sémen foram muitíssimo baixos, independentemente do grupo considerado.

2.2.3.2 – RELAÇÃO ENTRE TAMANHO DOS TESTÍCULOS E COMPORTAMENTO SEXUAL

No período pré-tratamentos, o tamanho dos testículos só se correlacionou significativamente com o número de montas realizadas pelos carneiros do grupo Luz antes da primeira cobrição ($r = 0,380$; para $P \leq 0,05$). A expressividade desta correlação foi extremamente baixa (14,4%).

No decurso do período de tratamentos, entre os carneiros do grupo Testemunha, o tamanho testicular correlacionou-se significativamente com o número total de cobrições efectuadas por sessão ($r = 0,481$; para $P \leq 0,01$) e com a duração do intervalo entre a 1ª e a 2ª cobrições ($r = 0,581$; para $P \leq 0,01$). A expressividade destas correlações revelou-se reduzida (23,1% e 34,2%, respectivamente). Nos carneiros do grupo Luz, o tamanho testicular correlacionou-se significativamente apenas com o tempo de reacção ($r = 0,419$; para $P \leq 0,01$). A expressividade desta correlação foi muito baixa (17,6%). Entre os carneiros do grupo Melatonina, o tamanho dos testículos não se correlacionou significativamente com nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados ($P > 0,05$).

Ao que tudo parece indicar, a acção do tamanho dos testículos sobre o comportamento sexual foi sempre muito reduzida, qualquer que tenha sido o grupo considerado, ou seja, tal como BOLAND *et al.* (1985) e BENCH *et al.* (2001) não fomos capazes de estabelecer uma relação clara de causa e efeito entre o tamanho testicular e a libido.

2.2.4 – VARIAÇÃO DA PRODUÇÃO SEMINAL

Nesta parte do estudo, o conjunto de carneiros avaliados produziu ejaculados com um volume médio de $1,2 \pm 0,4$ ml (c.v. = 31,0%), uma concentração espermática média de $3.317,7 \times 10^6 \pm 894,1 \times 10^6$ espermatozóides/ml (c.v. = 27,0%), uma concentração média de $3.898,7 \times 10^6 \pm 1.364,9 \times 10^6$ espermatozóides (c.v. = 35,0%), uma percentagem média de espermatozóides vivos de $80,6 \pm 8,6$ (c.v. = 10,7%), uma percentagem média de espermatozóides normais de $87,4 \pm 7,9$ (c.v. = 9,0%). O valor médio da motilidade massal foi de 4,5 e o da motilidade individual de 4,3. As diferenças encontradas entre carneiros só foram estatisticamente significativas no que concerne ao volume e à concentração do ejaculado ($P \leq 0,001$).

Durante o período pré-tratamentos, o volume seminal médio dos carneiros do grupo Melatonina ($1,5 \pm 0,3$ ml) foi significativamente superior ao dos carneiros dos grupos Tes-

temunha ($1,2 \pm 0,4$ ml) e Luz ($1,2 \pm 0,4$ ml) ($P \leq 0,05$). De igual modo, a concentração média do ejaculado dos carneiros do grupo Melatonina ($5.061,6 \times 10^6 \pm 1.191,1 \times 10^6$ espermatozóides) mostrou-se estatisticamente superior à dos carneiros dos grupos Testemunha ($4.091,1 \times 10^6 \pm 1.349,7 \times 10^6$ espermatozóides) e Luz ($4.054,4 \times 10^6 \pm 1.225,3 \times 10^6$ espermatozóides) ($P \leq 0,05$). Os carneiros do grupo Melatonina produziram ejaculados com melhores motilidades massal e individual do que os carneiros do grupo Testemunha ($\chi^2 = 6,186$; para $P \leq 0,05$). Por seu turno, as motilidades massal e individual dos ejaculados dos carneiros do grupo Luz não diferiram significativamente das dos carneiros dos grupos Testemunha ($\chi^2 = 1,047$; para $P > 0,05$) e Melatonina ($\chi^2 = 3,046$; para $P > 0,05$). As diferenças entre grupos, relativamente aos restantes parâmetros seminais analisados, foram estatisticamente não significativas ($P > 0,05$).

Neste período, entre os carneiros do grupo Luz, o volume seminal médio e a concentração média do ejaculado variaram significativamente em função do mês ($P \leq 0,05$), embora de uma forma aparentemente aleatória (Quadro II dos Anexos). Ao que tudo parece indicar, a variação mensal da concentração média do ejaculado resultou, fundamentalmente, da variação mensal do volume do ejaculado, uma vez que a variação mensal da concentração espermática foi estatisticamente não significativa ($P > 0,05$). Nos carneiros dos grupos Testemunha e Melatonina, nenhum dos parâmetros seminais quantitativos analisados apresentou variações mensais estatisticamente significativas ($P > 0,05$). No que se refere aos parâmetros seminais qualitativos, as percentagens médias de espermatozóides vivos e normais variaram significativamente em todos os grupos estudados ($P \leq 0,01$), ainda que de uma forma aparentemente aleatória (Quadro III dos Anexos). Nos carneiros dos grupos Testemunha e Luz, as motilidades massal e individual elevaram-se de Dezembro para Janeiro e permaneceram elevadas em Fevereiro (Quadro IV dos Anexos). Porém, enquanto que nos carneiros do grupo Testemunha ambas as motilidades diminuíram ligeiramente entre Fevereiro e Março, nos carneiros do grupo Luz elas mantiveram-se elevadas. Entre os carneiros do grupo Melatonina, a variação mensal das motilidades massal e individual foi estatisticamente não significativa ($P > 0,05$).

No período de tratamentos, os carneiros do grupo Melatonina produziram, em média, ejaculados mais volumosos do que os carneiros do grupo Testemunha ($1,2 \pm 0,3$ ml vs. $1,0 \pm 0,4$ ml; $P \leq 0,05$). O volume médio do ejaculado dos carneiros do grupo Luz ($1,1 \pm 0,3$

ml) não diferiu significativamente do dos carneiros dos grupos Testemunha e Melatonina ($P>0,05$). Nenhum dos restantes parâmetros seminais quantitativos variou significativamente em função do grupo considerado ($P>0,05$). No que concerne aos parâmetros qualitativos, há que referir que as percentagens médias de espermatozóides vivos e normais não variaram significativamente entre grupos ($P>0,05$). Os carneiros do grupo Luz produziram ejaculados com uma motilidade massal superior à dos carneiros do grupo Testemunha ($\chi^2 = 4,714$; para $P\leq 0,05$). A motilidade massal dos ejaculados dos carneiros do grupo Melatonina não diferiu significativamente da dos ejaculados dos carneiros dos grupos Testemunha ($\chi^2 = 1,229$; para $P>0,05$) e Luz ($\chi^2 = 1,332$; para $P>0,05$). No que se refere à motilidade individual, ela foi maior entre os carneiros dos grupos Luz ($\chi^2 = 13,085$; para $P\leq 0,001$) e Melatonina ($\chi^2 = 7,354$; para $P\leq 0,01$) do que entre os carneiros do grupo Testemunha. A diferença encontrada entre a motilidade individual dos ejaculados dos carneiros dos grupos Luz e Melatonina mostrou-se estatisticamente não significativa ($\chi^2 = 1,332$; para $P>0,05$).

Com exceção das motilidades (massal e individual), em nenhum dos grupos estudados os diferentes parâmetros seminais avaliados (quantitativos e qualitativos) variaram significativamente em função do mês ($P>0,05$) (Quadros V, VI e VII dos Anexos). Entre os carneiros do grupo Testemunha, o padrão evolutivo da motilidade massal foi ligeiramente diferente do da motilidade individual (Quadro VII dos Anexos). Contudo, por nos parecer ser mais cuidada, considerou-se mais próxima da realidade a curva evolutiva da motilidade individual. Assim, a motilidade individual baixou entre Março e Abril, após o que se manteve constante. Entre os carneiros do grupo Luz, as motilidades diminuíram de Março para Abril, subiram de Abril para Maio, após o que estabilizaram. Nos carneiros do grupo Melatonina, as motilidades baixaram entre Março e Abril, permaneceram constantes entre Abril e Maio e aumentaram em Junho.

No período de Dezembro a Março, as diferenças encontradas entre grupos, relativamente a alguns dos parâmetros seminais estudados, parecem poder ser interpretados como fruto do acaso, pois o conjunto de carneiros estudados foi sujeito às mesmas condições de manejo (regime luminoso, alimentação, tipo de alojamento, etc.).

Nos carneiros, os tratamentos luminosos de “dias curtos” (LINCOLN, 1976, LINCOLN e DAVIDSON, 1977, LINCOLN, 1978, BARRELL e LAPWOOD, 1979, THIMONIER, 1981,

CHEMINEAU *et al.*, 1996, GORDON, 1997, ROSA *et al.*, 2000, EL-ALAMY *et al.*, 2001 e ROSA e BRYANT, 2003) e com melatonina exógena (FITZGERALD e STELLFLUG, 1991, CHEMINEAU *et al.*, 1996 e BRAVO e ROY, 2003) resultam num aumento quantitativo e qualitativo da produção seminal. No ensaio levado a cabo por BARRELL e LAPWOOD (1979), o tratamento luminoso de “dias curtos” resultou numa melhoria generalizada dos parâmetros seminais qualitativos de carneiros Romney (percentagem de espermatozóides móveis, percentagem de espermatozóides vivos e percentagem de espermatozóides normais). Porém, a aplicação deste tratamento luminoso não afectou significativamente os vários parâmetros quantitativos avaliados (volume seminal, concentração espermática e concentração do ejaculado) (BARRELL e LAPWOOD, 1979). No presente estudo, os efeitos da aplicação do tratamento luminoso de “dias curtos” sobre a produção quantitativa e qualitativa de sémen de carneiros Churros Bragançanos foram pouco marcados e circunscreveram-se apenas à motilidade dos ejaculados. A aplicação deste tratamento a carneiros Suffolk, Texel e Dorset Horn não afectou significativamente a sua produção seminal (volume seminal, concentração do ejaculado, motilidades massal e individual e percentagens de espermatozóides anormais e mortos) (BOLAND *et al.*, 1985).

No que se refere ao tratamento com melatonina exógena, os resultados alcançados por diferentes investigadores são algo contraditórios (BRAVO e ROY, 2003). Nos malatos da raça Manchega, a administração de melatonina exógena eleva a concentração do ejaculado e a percentagem de espermatozóides com acrossoma intacto, mas não afecta significativamente o volume seminal e a motilidade individual (GARDE *et al.*, 1993). Nos carneiros Ile-de-France, Merino Precoce e Fleischschaf, a colocação de implantes subcutâneos de melatonina determina apenas uma melhoria significativa da concentração do ejaculado; o volume seminal, a concentração espermática e a motilidade individual não sofrem qualquer variação estatisticamente significativa (BRAVO e ROY, 2003). Por seu turno, a aplicação deste tratamento a carneiros Manchegos (ALCAIDE *et al.*, 2001), Merino Preto e Campaniça (BETTENCOURT *et al.*, 2003 e ROMÃO *et al.*, 2003) não surte qualquer efeito estatisticamente significativo sobre a sua produção de sémen. No nosso trabalho, os efeitos da administração de melatonina exógena a carneiros Churros Bragançanos foram muito pouco marcados. No caso particular dos carneiros tratados com melatonina exógena, há que ter presente que, já antes de se ter procedido à colocação dos implantes subcutâneos de melatonina, eles

apresentavam algumas características seminais superiores às dos carneiros do grupo Testemunha e inclusive à dos carneiros do grupo Luz. Assim sendo, o único efeito detectável foi uma melhoria da motilidade dos ejaculados.

Chama-se de novo a atenção para o facto dos resultados obtidos, relativamente à produção seminal, poderem ter sido condicionados pela metodologia utilizada, particularmente no que diz respeito à frequência de recolha de amostras de sémen para análise. É possível que, caso a frequência de recolha de amostras de sémen tivesse sido maior, algumas das diferenças acima encontradas tivessem sido mais claras e que outras pudessem ter alcançado significado estatístico. BRAVO e ROY (2003) admitem igualmente a hipótese do facto de terem usado uma frequência de recolha de amostras de sémen muito baixa (1 vez/semana) os ter impedido de identificar diferenças estatisticamente significativas entre a produção de sémen de carneiros tratados com implantes subcutâneos de melatonina e a de carneiros não tratados.

2.2.4.1 – RELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO SEMINAL E COMPORTAMENTO SEXUAL

Em momento algum foi possível estabelecer qualquer correlação estatisticamente significativa entre os diferentes parâmetros seminais analisados e os vários parâmetros comportamentais avaliados ($P > 0,05$). Aparentemente, estes dados contrariam a hipótese levantada por VIJIL (1986), VIJIL (1989) e CELORRIO *et al.* (1994), segundo a qual os carneiros sexualmente mais “reactivos” produzem mais e/ou melhor sémen.

2.2.5 – VARIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL

No decurso desta parte do trabalho, em média, o conjunto dos carneiros estudados realizou $1,9 \pm 1,0$ cobrições por sessão, $2,1 \pm 4,5$ montas antes da consumação da 1ª cobrição, $1,2 \pm 3,1$ antes da 2ª cobrição, $1,0 \pm 3,1$ antes da 3ª cobrição, $0,5 \pm 1,5$ antes da 4ª cobrição e de 0,0 antes da 5ª cobrição (somente um carneiro e por apenas uma vez, realizou 5 cobrições/sessão). Em média, o tempo de reacção foi de $59,5 \pm 85,4$ segundos e o intervalo entre a 1ª-2ª cobrições foi de $244,4 \pm 139,4$ segundos, entre a 2ª-3ª cobrições de $357,2 \pm 141,6$ segundos, entre a 3ª-4ª cobrições de $431,8 \pm 120,3$ segundos e entre a 4ª-5ª cobrições de 433 segundos. As diferenças entre carneiros, relativamente aos parâmetros comportamentais que puderam ser estatisticamente comparados, revelaram-se significativas

($P \leq 0,001$), ou seja, o grupo de carneiros estudados, no que ao comportamento sexual diz respeito, revelou-se também bastante heterogéneo.

No período pré-tratamentos, nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados variou significativamente em função do grupo considerado ($P > 0,05$). Em termos mensais, apenas o número médio de montas efectuadas pelos carneiros do grupo Testemunha antes da 1ª cobrição variou significativamente ($P \leq 0,05$) (Quadros VIII, IX e X dos Anexos). O número médio de montas realizadas por estes carneiros no mês de Dezembro revelou-se estatisticamente superior ao registado nos meses de Fevereiro e Março ($P \leq 0,01$).

Durante o período de tratamentos, os carneiros do grupo Testemunha realizaram, em média, um menor número de montas antes da 1ª cobrição do que os carneiros do grupo Luz ($0,4 \pm 1,0$ vs. $2,1 \pm 4,1$; para $P \leq 0,05$). O número médio de montas realizados pelos carneiros do Grupo Melatonina ($1,5 \pm 1,9$) antes da 1ª cobrição não diferiu significativamente do produzido pelos carneiros dos grupos Testemunha e Luz ($P > 0,05$). O intervalo médio de tempo observado entre a 1ª-2ª cobrições atingiu o seu valor mais alto entre os carneiros Melatonina ($325,9 \pm 152,5$ segundos), intermédio entre os carneiros do grupo Testemunha ($243,3 \pm 127,5$ segundos) e mais baixo entre os carneiros do grupo Luz ($134,4 \pm 76,3$ segundos) ($P \leq 0,05$). As diferenças entre grupos, relativamente aos restantes parâmetros comportamentais estudados, foram estatisticamente não significativas ($P > 0,05$). As variações mensais dos vários parâmetros comportamentais avaliados mostraram-se estatisticamente não significativas em todos os grupos estudados ($P > 0,05$) (Quadros XI, XII e XIII dos Anexos).

Nos carneiros, a aplicação de um tratamento luminoso de “dias curtos” (LINCOLN e DAVIDSON, 1977, LINCOLN, 1978, THIMONIER, 1981, CHEMINEAU *et al.*, 1996, GORDON, 1997, ROSA *et al.*, 2000 e ROSA e BRYANT, 2003) e a administração de melatonina exógena (CHEMINEAU *et al.*, 1996, ROSA *et al.*, 2000 e BRAVO e ROY, 2003) determinam uma melhoria do desempenho sexual. Porém, a aplicação de um tratamento de “dias curtos” a carneiros Suffolk, Texel e Dorset Horn não se traduziu numa melhoria significativa do seu comportamento sexual (BOLAND *et al.*, 1985). O número de trabalhos realizados, com o objectivo de estudar os efeitos da aplicação de implantes subcutâneos de melatonina sobre o comportamento sexual dos carneiros, é muito escasso (BRAVO e ROY, 2003). A libido dos carneiros Ile-de-France, Merino Precoce, Fleischschaf (BRAVO e ROY, 2003), Texel e Cha-

rollais (ROSA *et al.*, 2000) eleva-se após a administração de melatonina exógena. No nosso ensaio, os efeitos da aplicação dos tratamentos – luminoso de “dias curtos” e com melatonina exógena – sobre o comportamento sexual dos carneiros Churros Bragançanos foram muitíssimo reduzidos e fisiologicamente pouco coerentes. Mais, o grau de significância das diferenças observadas entre grupos foi baixo, o que nos leva a supor que eles são fruto do acaso. É possível que estes resultados estejam relacionados com questões metodológicas. Por outro lado, há que referir que o comportamento sexual, assim como a generalidade dos restantes parâmetros sexuais analisados neste trabalho (níveis circulantes de testosterona total, tamanho testicular e produção quantitativa de sémen), variaram muito de carneiro para carneiro. À partida este facto não se revelou surpreendente, pois sabemos que os ovinos da raça Churra Galega Bragançana são criados numa região do país com condicionamentos locais variáveis e que por isso mesmo nunca foram sujeitos a um modelo único e coerente de selecção animal.

2.3 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, os carneiros da raça Churra Galega Bragançana apresentam alguma sazonalidade sexual que, no entanto, tal como sucede nas ovelhas da mesma raça (CORREIA, 1996), é de baixa intensidade. Neste sentido, os carneiros Churros Bragançanos, assim como a generalidade dos carneiros das raças originárias da Península Ibérica, apresentam uma diminuição da sua actividade sexual no período de Inverno-Primavera, mas cuja intensidade é claramente inferior à que se produz, normalmente, entre os carneiros originários do norte da Europa.

Na Primavera, a actividade cíclica das ovelhas originárias da região mediterrânea depende fortemente das disponibilidades de alimentos, conforme foi já demonstrado relativamente às originárias do norte de África (FOLCH, informação pessoal, 2004). Nesta estação do ano, 20-40% de ovelhas Rasa Aragonesa, bem alimentadas, manifestam cio, mas 80% das ovulações espontâneas são silenciosas (FOLCH, informação pessoal, 2004). Durante a Primavera, 28-44% de ovelhas Churras Bragançanas, bem alimentadas, manifestam cio, mas 64% das ovulações espontâneas são silenciosas (CORREIA, 1996). Nestas condições, a

aplicação de um estímulo externo, como o “efeito macho”, é capaz de determinar a ocorrência de cobrições, sem necessidade de se recorrer à aplicação de tratamentos hormonais (CORREIA *et al.*, 1998, CORREIA *et al.*, 1999 e FOLCH e ALABART, 2000).

A informação, relativa aos efeitos da alimentação sobre a actividade sexual dos carneiros originários da região mediterrânea, é muito escassa. No presente trabalho, estes efeitos também não puderam ser devidamente avaliados, uma vez que os carneiros estudados foram sempre alimentados *ad libitum* com feno de prados naturais. Porém, ainda que os carneiros Churros Bragançanos, bem alimentados, apresentem uma ligeira depressão da actividade sexual durante a Primavera, esta pode ser controlada através da aplicação de um tratamento luminoso de “dias curtos” (8L:16E). Porém, a utilização de implantes subcutâneos de melatonina não permitiu o mesmo tipo de controlo.

3 – CONCLUSÕES

A actividade sexual dos carneiros da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana variou ao longo do ano. De um modo geral, a actividade sexual destes carneiros foi maior no período do Verão-Outono do que no do Inverno-Primavera.

As diferenças entre carneiros, relativamente à generalidade dos parâmetros sexuais estudados, revelaram-se muito elevadas. Somente os parâmetros definidores da qualidade seminal não variaram significativamente entre carneiros.

Os efeitos do peso corporal e da condição corporal sobre a quase totalidade dos parâmetros sexuais avaliados mostraram-se desprezáveis. O peso corporal apenas afectou, com uma reduzida expressividade, o tamanho dos testículos. De igual modo, a condição corporal só influenciou significativamente o tamanho testicular.

A passagem abrupta de um regime luminoso natural de “dias crescentes” para outro artificial de “dias curtos” desencadeou, no prazo de 8 semanas, uma resposta testicular (endócrina e de tamanho) significativa, ou seja, cerca de um mês antes da observada entre os carneiros Testemunha.

A aplicação de três implantes subcutâneos de melatonina (3 x 18 mg) por carneiro não produziu efeitos sobre a resposta testicular semelhantes aos do tratamento luminoso de “dias curtos”.

Os efeitos dos tratamentos luminoso de “dias curtos” e com melatonina exógena sobre o comportamento sexual dos carneiros Churros Bragançanos foram desprezáveis.

Novos trabalhos deverão ser realizados no futuro, aproveitando os ensinamentos e a experiência técnico-laboratorial conseguidos ao longo deste trabalho, que foi pioneiro no estudo da sazonalidade sexual entre os carneiros da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana.

PARTE III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECIA, J.-A., FORCADA, F., VALARES, J.-A., ZÚÑIGA, O. e KINDAHL, H., 2003. Effect of exogenous melatonin on in vivo and in vitro prostaglandin secretion in Rasa Aragonesa ewes. *Theriogenology*, **60**, 1345-1355.
- ADAM, C.L., ARCHER, Z.A. e MILLER, D.W., 2003. Leptin actions on the reproductive neuroendocrine axis in sheep. *Reproduction*, **61**, (Suppl), 283-297.
- AKIYAMA, M., MINIMI, Y., NAKAJIMA, T., MORIYA, T. e SHIBATA, S., 2001. Calcium and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induced expression of circadian clock gene *mPer1* in the mouse cerebellar granule cell culture. *J Neurochemistry*, **78**, 499-508.
- ALCAIDE, V.A., MANSO, A.G., MOYANO, J.C.J., GÁRCIA-CERVIGÓN, M., PALOMARES, M.D.P. e MONTORO, V.A., 2001. Influencia de los implantes de melatonina sobre la calidad seminal en los moruecos del esquema de selección de la raza ovina Manchega. *In: Producción Ovina y Caprina*, nº XXVI, Sevilla, 977-982.
- ALEXANDER, B.M., PERKINS, A., VANKIRK, E.A., MOSS, G.E. e FITZGERALD, J.A., 1994. High and low sexually performing rams have differences in brain estrogen receptor content. *In: Sheep Research Progress Report nº3*, Idaho, EUA 78-79.
- ALEXANDER, B.M., STELLFLUG, J.N., ROSE, J.D., FITZGERALD, J.A. e MOSS, G.E., 1999. Behavior and endocrine changes in high-performing, low-performing, and male-oriented domestic rams following exposure to rams and ewes in estrus when copulation is precluded. *J Anim Sci*, **77**, 1869-1874.
- ALILA-JOHANSSON, A., ERIKSSON, L., SOVERI, T. e LAAKSO, M.-L., 2001. Seasonal variation in endogenous serum melatonin profiles in goats: a difference between spring and fall? *J Biol Rhythms*, **16** (2), 254-263.

- AMANN, R.P. e SCHANBACHER, B.D., 1983. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci*, **55** (Suppl 2), 380-403.
- ANDERSON, G.M., LAPWOOD, K.R., KNIGHT, P.G. e PARKINSON, T.J., 2003. The reproductive response of rams to thyroidectomy: mediation by impaired inhibin feedback rather than a change in LH pulsatility. *Reproduction*, **126** (3), 353-364.
- ANDERSON, H., LILLPERS, K., RYDHMER, L. e FORSBERG, M., 2000. Influence of light environment and photoperiod on plasma melatonin and cortisol profiles in young domestic boars, comparing two commercial melatonin assays. *Dom Anim Endocrinol*, **19**, 261-274.
- ANEL, E., 1999. Automatização en la contrastación espermática. *In*: Ponencias y Comunicaciones del II Congreso Ibérico de Reproducción Animal, FIRA, Lugo, Espanha, 292-296.
- ANÓNIMO, 2002. Dopamine – a sample neurotransmitter. <http://www.utexas.edu/research/asrec/dopamine.htm>
- ARGIOLAS, A., 1999. Neuropeptides and sexual behaviour – review. *Neuroscience and biobehavioral Reviews*, **23**, 1127-1142.
- ARMSTRONG, S.M. e REDMAN, J.R., 1991. Melatonin: a chronobiotic with anti-aging properties? *Med Hypotheses*, **34** (4), 300-309.
- BAPTISTA, M.C. e MASCARENHAS, R., 1987. La variation saisonnière de l'activité sexuelle chez le bélier "Serra da Estrela" au cours de l'anne. *In*: 38^{ème} Réunion Annuelle de la FEZ, Lisboa, Portugal, 1-9.
- BARBAS, J.P., FERREIRA, G.M.B.C., SOUSA, J.P.F., BAPTISTA, M.C. e HORTA, A.E.M., 2000a. Efeito da congelação de sêmen de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela, sobre as características seminais à descongelação. *In*: Resumos do X Congresso de Zootecnia, Vale de Santarém, Portugal, 86.

- BARBAS, J.P., SOUSA, J.P.F., FERREIRA, G.M.B.C., BAPTISTA, M.C. e HORTA, A.E.M., 2000b. Variação anual das características seminais de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela, em sémen fresco. *In: Resumos do X Congresso de Zootecnia, Vale de Santarém, Portugal*, 88.
- BARRELL, G.K. e LAPWOOD, K.R., 1979. Effects of various lighting regimens and pinealectomy on semen production in Romney rams. *J Reprod Fert*, **57**, 273-279.
- BARRELL, G.K., LAPWOOD, K.R. e ELGAR, H.J., 1985. FSH secretion in pinealectomized rams subjected to artificial photoperiods. *J Endocrinol*, **106**, 167-171.
- BARRETT, P., MESSEAGER, S., SCHUSTER, C., MOAR, K.M., MERCER, J.G. e MORGAN, P.J., 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide acts as a paracrine regulator of melatonin-responsive cells of the ovine *pars tuberalis*. *Endocrinology*, **143** (6), 2366-2375.
- BARRETT, P., MORRIS, M., CHOI, W-S., ROSS, A. e MORGAN, P.J., 1999. Melatonin receptors and signal transduction mechanisms. *Biological Signals Receptors*, **8**, 6-14.
- BARRIGA, C., MARCHENA, J.M., ORTEGA, E., MARTÍN, M.I. e RODRÍGUEZ, A.B., 2000. Melatonin levels and exercise in adolescent boys and girls. *Biogenic Amines*, **15** (6), 643-665.
- BARTNESS, T.J., SONG, C.K. e DEMAS, G.E., 2001. SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms*, **16** (2), 196-204.
- BAYDAS, G., NEDZVETSKY, V.S., NERUSH, P.A., KIRICHENKO, S.V., DEMCHENKO, H.M. e REITER, R.J., 2002. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex. *Neuroscience Letters*, **326**, 109-112.
- BECCA VIN, C., MALPAUX, B. e TILLET, Y., 1998. Effect of estradiol and photoperiod on TH mRNA concentrations in A15 e A12 dopamine cell groups in the ewe. *J Neuroendocrinol*, **10**, 59-66.

- BENCH, C.J., PRICE, E.O., DALLY, M.R. e BORGWARDT, R.E., 2001. Artificial selection of rams for sexual performance and its effect on the sexual behaviour and fecundity of male and female progeny. *Appl Anim Behav Sci*, **72**, 41-50.
- BERCZI, I., CHOW, D.A. e SABBADINI, E.R., 1998. Neuroimmunoregulation and natural immunity. *Dom Anim Endocrinol*, **15** (5), 273-281.
- BERGSTRON, W.H. e HAKANSON, D.O., 1998. Melatonin: the dark force. *Adv Pediatr*, **45**, 91-106.
- BETTENCOURT, E.M., ROMÃO, R.J., BETTENCOURT, C.M. e MATOS, C.A., 2003. Sazonalidade reprodutiva em carneiros das raças Merina e Campaniça no sul de Portugal. In: Ponencias y Comunicaciones del IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal, Arucas (Las Palmas), Espanha, 78.
- BICKNELL, R.J., 1999. Signals to GnRH neurones. *J Reprod Fert*, **24** (Abst), 2.
- BITTMAN, E.L., KAYNARD, A.H., OLSTER, D.H., ROBINSON, J.E., YELLON, S.M. e KARSCH, F.J., 1985. Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology*, **40**, 409-418.
- BLACHE, D., CHAGAS, L.M., BLACKBERRY, M.A., VERCOE, P.E. e MARTIN, G.B., 2000. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep: review. *J Reprod Fert*, **120**, 1-11.
- BOCQUIER, F., BONNET, M., FAULCONNIER, Y., GUERRE-MILLO, M., MARTIN, P. e CHILLIARD, Y., 1998. Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Reprod Nutr Dev*, **38** (5), 489-498.
- BOLAND, M.P., AL-KAMALI, A.A., CROSBY, T.F., HAYNES, N.B., HOWLES, C.M., KELLEHER, D.L. e GORDON, I., 1985. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams. *Anim Reprod Sci*, **9**, 241-252.

- BORGHESE, A., TERZANO, G.M., BARILE, V.L., CATILLO, G., MARCHIORI, E., MALFATTI, A. e COSTARELLI, S., 1996. Melatonin trend in Comisana sheep and in Maltese and Derivata di Siria goats. *In: EAAP – 47th Annual Meeting*, Lillehammer, Noruega, 222.
- BORJIGIN, J., Li, X. e SNYDER, S.H., 1999. The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 53-65.
- BORQUE, M.C.I. e SANGÜÉS, A.N., 1993. Influencia de la estación del año en las concentraciones de testosterona plasmática y en la composición bioquímica del yaculado en moruecos de raza Manchega *In: V Jornadas Producción Animal de ITEA*, Vol. Extra 12, Tomo II, 468-470.
- BRANN, D.W., WADE, M.F., DHANDAPANI, K.M., MAHESH, V.B. e BUCHANAN, C.D., 2002. Leptin and reproduction. *Steroids*, **67**, 95-104.
- BRAVO, J.A. e ROY, T.J., 2003. Influencia de los implantes de melatonina sobre las características espermáticas y actividad sexual del morueco en estación no sexual. *In: Producción Ovina y Caprina*, nº XXVIII, SEOC, Badajoz, 152-154.
- BROOKS, A.N., HAGAN, D.M., SHENG, C., MCNEILLY, A.S. e SWEENEY, T., 1996. Prenatal gonadotrophins in the sheep. *Anim Reprod Sci*, **42**, 471-481.
- BROOKS, A.N., HAYNES, N.B., YANG, K. e LAMMING, G.E., 1986b. Ovarian steroid involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion in seasonally anoestrous mature ewes. *J Reprod Fert*, **76**, 709-715.
- BROOKS, A.N., LAMMING, G.E., LEES, P.D. e HAYNES, N.B., 1986a. Opioid modulation of LH secretion in the ewe. *J Reprod Fert*, **76**, 693-708.
- BRYDON, L., PETIT, L., DE COPPET, P., BARRETT, P., MORGAN, P.J., STROSBERG, A.D. e JOCKERS, R., 1999. Polymorphism and signaling of melatonin receptors. *Reprod Nutr Dev*, **39** (3), 315-324.

- BURKE, Z., WELLS, T., CARTER, D., KLEIN, D. e BALER, R., 1999. Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectively in the pineal gland and retina of transgenic rats. *Journal of Neurochemistry*, **73** (4), 1343-1349.
- CALDANI, M., ANTOINE, M., BATAILLER, M. e DUITTOZ, A., 1995. Ontogeny of GnRH systems. *J Reprod Fert*, **49** (Suppl), 147-162.
- CALDEIRA, R.M., 1998. Contributo para a interpretação metabólica da condição corporal e da sua variação na fêmea ovina. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 388 pp.. (Tese de Doutoramento)
- CANNY, B.J., O'FARRELL, K.A., CLARKE, I.J. e TILBROOK, A.J., 1999. The influence of sex and gonadectomy on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis of the sheep. *J Endocrinol*, **162** (2), 215-225.
- CASSONE, V.M. e NATESAN, A.K., 1997. Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J Biol Rhythms*, **12** (6), 489-497.
- CASSONE, V.M., WARREN, W.S., BROOKS, D.S. e LU, J., 1993. Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J Biol Rhythms*, **8** (Suppl), S73-S81.
- CASTEILLA, L., ORGEUR, P. e SIGNORET, J.P., 1987. Effects of rearing conditions on sexual performance in the ram: practical use. *Appl Anim Behav Sci*, **19**, 111-118.
- CELORRIO, L., MANSO, A., SEVILLANO, C., GAMILLO, J.A., OLMEDO, J.A., DOMÍNGUEZ, J.C., ALVAREZ, M., GUTIERREZ, G. e ANEL, E., 1994. Estudio comparativo de las características seminales de las razas ovinas Churra e Assaf. In: Ponencias y Comunicaciones de las 7^{as} Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Murcia, Espanha, 299.
- CESPUGLIO, R., 2002. Dormir, demande de l'énergie. *Science & Vie*, **220**, 28-33.

- CHABOT, V., CALDANI, M., DE RIVIERES, M.M. e PELLETIER, J., 1998. Localization and quantification of melatonin receptors in the diencephalon and posterior telencephalon of the sheep brain. *J Pineal Res*, **24**, 50-57.
- CHALLET, E. e PEVET, P., 1997. Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature and locomotor activity of food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms*, **12** (1), 65-79.
- CHAN, G.C.-K., LERNMARK, U., XIA, Z. e STORM, D.R., 2001. DNA elements of the type 1 adenylyl cyclase gene locus enhance reporter gene expression in neurons and pinealocytes. *European Journal of Neuroscience*, **13**, 2054-2066.
- CHEMINEAU, P., COGNIÉ, Y., GUERIN, Y., ORGEUR, P. e VALLET, J.-C., 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO Animal Production and Health Paper 83, FAO, Roma, Itália, 222 pp..
- CHEMINEAU, P., MALPAUX, B., PELLETIER, J., LÉBOUF, B., DELGADILLO, J.A., DELETANG, F., POBEL, T. e BRICE, G., 1996. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA Prod Anim*, **9** (1), 45-60.
- CHILLIARD, Y., BOCQUIER, F., DELAVAUD, C., FAULCONNIER, Y., BONNET, M., GUERRE-MILLO, M., MARTIN, P. e FERLAY, A., 1999. La leptine chez le ruminant. Facteurs de variation physiologiques et nutritionnels. *INRA Prod Anim*, **12**, 225-237.
- CLARKE, I.J., SCOTT, C.J., PEREIRA, A. e RAWSON, J., 1999. Levels of dopamine b-hydroxylase immunoreactivity in the preoptic hypothalamus of the ovariectomised ewe following injection of oestrogen: evidence for increased noradrenaline release around the time of the oestrogen-induced surge in luteinizing hormone. *J Neuroendocrinol*, **11**, 503-512.

- COOKE, P.S., 1996. Thyroid hormone and the regulation of testicular development. *Anim Reprod Sci*, **42**, 333-341.
- COON, S.L., ZARAZAGA, L.A., MALPAUX, B., RAVAUULT, J.P., BODIN, L., VAISIN, P., WELLER, J.L., KLEIN, D.C. e CHEMINEAU, P., 1999. Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzyme activities. *Am J Physiol*, **277** (5 Pt 1), E792-797.
- CORREIA, T.M., VALENTIM, R.C., AZEVEDO, J. e TEIXEIRA, A., 1999. Acção do “efeito macho” e do “efeito fêmea” sobre ovelhas da raça Churra Galega Bragançana durante o período de anestro sazonal. *Revista de Ciências Agrárias*, **22** (1), 3-12.
- CORREIA, T.M., VALENTIM, R.C., TEIXEIRA, A., AZEVEDO, J. e JORGE, J., 1998. Acção de diferentes tratamentos com o “efeito macho” sobre o reinício da actividade ovárica sazonal de ovelhas Churras Bragançanas. *Revista Veterinária Técnica*, **3**, 12-16.
- CORREIA, T.M.M.A.A., 1996. Contributo para o estudo da sazonalidade reprodutiva das ovelhas da raça autóctone portuguesa Churra da Terra Quente. Tese de Mestrado em Ciência Animal, Instituto Agronómico Mediterrâneo de Saragoça, Saragoça, Espanha, 84 pp..
- CRUZ E SILVA, J.C., 1989. Variações sazonais das características dos ejaculados obtidos por electroejaculação de ovinos Saloios. In: IV Symposium Internacional de Reprodução Animal, Volume II, Lisboa, Portugal, 139-157.
- CUNNINGHAM, M.J., CLIFTON, D.K. e STEINER, R.A., 1999. Leptin's actions on the reproduction axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod*, **60**, 216-222.
- CURLEWIS, J.D. e MCNEILLY, A.S., 1991. Prolactin short-loop feedback and prolactin inhibition of luteinizing hormone secretion during the breeding season and seasonal anestrus in the ewe. *Neuroendocrinology*, **54**, 279-285.

- CURLEWIS, J.D., 1992. Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review. *Reprod Fertil Dev*, **4** (1), 1-23.
- CURLEWIS, J.D., THIÉRY, J-C. e MALPAUX, B., 1995. Evidence for dopamine D₁ receptor-mediated stimulation of prolactin secretion in ewes under long daylength. *J Reprod Fert*, **49**, 539-543.
- CURRIE, W.D., COOK, S.J. e RAWLINGS, N.C., 1991. LH secretion in ovariectomized ewes: effects of morphine and ovarian steroid interactions with naloxone during the breeding season and *anestrus*. *Can J Anim Sci*, **71**, 333-342.
- CURRY, K.C., BERARDINELLI, J.G., BURFENING, P.J. e ADAIR, R., 1993. Selection for reproductive rate in females and feeding regimen on testicular traits and epididymal sperm reserves in Rambouillet rams. *Small Ruminant Research*, **11**, 257-265.
- DARBEÏDA, H. e BRUDIEUX, R., 1980. Seasonal variations in plasma testosterone and dihydrotestosterone levels and in metabolic clearance rate of testosterone in rams in Algeria. *J Reprod Fert*, **59**, 229-235.
- DAUVILLIERS, Y., 2002. Les gènes de notre horloge. *Science & Vie*, **220**, 34-40.
- DAVIS, F.C., 1997. Melatonin: role in development. *J Biol Rhythms*, **12** (6), 498-598.
- DE ANGELIS, J., GASTEL, J., KLEIN, D.C. e COLE, P.A., 1998. Kinetic analysis of the catalytic mechanism of serotonin N-acetyltransferase. *J Biol Chem*, **273** (5), 3045-3050.
- DIAZ, E., PAZO, D., ESQUIFINO, A.I. e DIAZ, B., 2000. Effects of ageing and exogenous melatonin on pituitary responsiveness to GnRH in rats. *J Reprod Fert*, **119**, 151-156.
- DIKSIC, M. e YOUNG, S.N., 2001. Study of the brain serotonergic system with labeled α -methyl-L-tryptophan. *J Neurochemistry*, **78**, 1185-1200.

- DILEO, H.A., REITER, R.J. e TALIAFERRO, D.H., 2002. Chronobiology, melatonin, and sleep in infants and children. *Pediatric Nursing*, **28** (1), 35-39.
- DODGE, J.C. e BADURA, L.L., 2002. 5HT and 5HIAA dialysate levels within the arcuate nucleus of the hypothalamus: relationship with photoperiod-driven differences in serum prolactin and luteinizing hormone in the Siberian hamster. *Brain Research*, **946**, 171-178.
- DRAZEN, D.L., KRIEGSFELD, L.J., SCHNEIDER, J.E. e NELSON, R.J., 2000. Leptin, but not immune function, is linked to reproductive responsiveness to photoperiod. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **278** (6), R1401-R1407.
- DREW, J.E., BARRETT, P., WILLIAMS, L.M., CONWAY, S. e MORGAN, P.J., 1998. The ovine melatonin related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies. *J Neuroendocrinol*, **10**, 651-661.
- DUNCAN, M.J., 1998. Photoperiodic regulation of hypothalamic neuropeptide messenger RNA expression: effect of pinealectomy and neuroanatomical location. *Molecular Brain Research*, **57**, 142-148.
- DUNN, O.J., 1961. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, **56**, 52-64.
- EL-ALAMY, M.A., FOOTE, R.H. e HARE, E., 2001. Sperm output and hormone concentrations in Finn and Dorset rams exposed to long-and short-day lighting. *Theriogenology*, **58**, 839-854.
- ELDON, J., 1993. Effect of exogenous melatonin and exposure to a ram on the time of onset and duration of the breeding season in Iceland sheep. *J Reprod Fert*, **99**, 1-6.
- EL-SHERIF, Y., HOGAN, M.V., TESORIERO, J. e WIERASZKO, A., 2002. Factors regulating the influence of melatonin on hippocampal evoked potentials: comparative studies on different strains of mice. *Brain Research*, **945**, 191-201.

- ESTIENNE M.J., HURLOCK, W.F. e BARB, C.R., 1998. Serum concentrations of luteinizing hormone, growth hormone, and cortisol in gilts treated with n-methyl-D,L-aspartate during the estrous cycle or after ovariectomy. *J Anim Sci*, **76**, 2162-2168.
- ESTIENNE, M.J., BARB, C.R. e KRAELING, R.R., 1999. Neuroendocrine regulation of reproduction in male domestic animal species: role of excitatory amino acids. *In: Proceedings of the American Society of Animal Science*, 1-10.
- EVERETT, R.W. e BEAN, B., 1982. Environmental influences on semen output. *J Dairy Sci*, **65** (7), 1303-1310.
- FABRE, V. e BOURGIN, P., 2002. Appétit et éveil: une même clé. *Science & Vie*, **220**, 44-49.
- FABRE-NYS, C., 2000. Le comportement sexuel des caprins: contrôle hormonal et facteurs sociaux. *INRA Prod Anim*, **13**, 11-23.
- FALVO, R.E., BUHL, A.E., REIMERS, T.J., FOXCROFT, G.R., DUNN, M.H. e DZIUK, 1975. Diurnal fluctuations of testosterone and LH in the ram: effect of hCG and gonadotrophin-releasing hormone. *J Reprod Fert*, **42**, 503-510.
- FAULCONNIER, Y., BONNET, M., BOCQUIER, F., LEROUX, C., HOCQUETTE, J.F., MARTIN, P. e CHILLIARD, Y., 1999. Régulation du métabolisme lipidique des tissus adipeux et musculaires chez le ruminant. Effets du niveau alimentaire et de la photopériode. *INRA Prod Anim*, **12**, 287-300.
- FERNANDEZ-ABELLA, D., BECU-VILLALOBOS, D., LACAU-MENGIDO, I.M., VILLEGAS, N. e BENTANCUR, O., 1999. Sperm production, testicular size, serum gonadotrophins and testosterone levels in Merino and Corriedale breeds. *Reprod Nutr Dev*, **39** (5-6), 617-624.
- FIGLEWICZ, D.P., 1999. Endocrine regulation of neurotransmitter transporters. *Epilepsy Research*, **37**, 203-210.

- FITZGERALD, B.P. e MCMANUS, C.J., 2000. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. *Biol Reprod*, **63**, 335-340.
- FITZGERALD, J.A. e PERKINS, A., 1994. Measures in blood plasma that indicate differences in ram sexual performance. *In: Sheep Research Progress Report n°3*, Idaho, EUA, 76-77.
- FITZGERALD, J.A. e STELLFLUG, J.N., 1991. Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. *J Anim Sci*, **69**, 264-275.
- FLEMING, J.V., BARRETT, P., COON, S.L., KLEIN, D.C. e MORGAN, P.J., 1999. Ovine arylamine N-acetyltransferase in the pineal and pituitary glands: differences in function and regulation. *Endocrinology*, **140** (2), 972-978.
- FOLCH, J. e ALABART, J.L., 2000. Características reproductivas de la oveja Rasa Aragonesa. *Ovis*, **68**, 27-35.
- FOLCH, J., 1984. The influence of age, photoperiodism and temperature on semen production of rams. *In: The male in farm animal reproduction*, M. Nishoff Publisher, Haia, Holanda, 141-158.
- FOLCH, J., 1993. Estacionalidad sexual de los ovinos y caprinos en la Península Ibérica. *In: Publicações do 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal*, Luso, Portugal, 99-112.
- FOLCH, J.P., 1983. Estacionalidad sexual del morueco. Influencia de la época de nacimiento. *In: Simposio sobre Reproducción de ovinos y Bovinos de Carne. Estado actual y posibilidades de aplicar a la reproducción las técnicas de manejo y de selección*, Colección Monografías INIA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Espanha, **42**, 177-206.
- FORCADA, F., ZÚÑIGA, O. e ABECIA, J.A., 2002. The role of nutrition in the regulation of LH secretion during anestrus by the serotonergic and dopaminergic systems in Mediterranean ewes treated with melatonin. *Theriogenology*, **58**, 1303-1313.

- FOSTER, D.L., EBLING, F.J.P. e CLAYPOOL, L.E., 1988. Timing of puberty by photoperiod. *Reprod Nutr Dévelop*, **28** (2B), 349-364.
- FRASER, A.F., 1980. Comportamiento de los animales de granja. Editorial Acribia, Saragoça, Espanha, 291 pp..
- FUENTES, V.O., SANCHEZ, V., ROSILES, R. e FUENTES, P.I., 2001. The effect of low doses of naloxone on the preovulatory surge of LH and on the onset and duration oestrus in the ewe with induced oestrous during the non-breeding season. *Anim Reprod Sci*, **65**, 225-230.
- GALLEGOS-SANCHEZ, J., MALPAUX, B. e THIÉRY, J.C., 1998. Control of pulsatile LH secretion during seasonal anoestrus in the ewe. *Reprod Nutr Dev*, **38** (1), 3-15.
- GARDE, J., RESCALVO, L.A., MADRIDANO, J.M., GRACIA, O., PÉREZ, S., GARRIDO, D. e PÉREZ GUZMÁN, M.D., 1993. Efecto de la melatonina sobre las características seminales en el morueco joven de raza Manchega. *In: V Jornadas Producción Animal de ITEA*, Vol. Extra 12, Tomo II, 462-464.
- GATES, P.J., HEMNINGSSON, T., TENGROTH e FORSBERG, M., 1998. Effects of melatonin, progestagens, and the ram on out-of-season reproduction in Swedish Landrace Finewool sheep. *Acta Vet Scand*, **39**, 499-510.
- GAZAL, O.S., KOUAKOU, B., AMOAH, E.A., BARB, C.R., BARRETT, J.B., e GELAYE, S., 2002. Effects of N-methyl-D,L-aspartate on LH, GH, and testosterone secretion in goat bucks maintained under long or short photoperiods. *J Anim Sci*, **80**, 1623-1628.
- GERLACH, T. e AURICH, J.E., 2000. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim Reprod Sci*, **58**, 197-213.
- GODDARD, S., 1991. A practical application of melatonin for use in sheep and goats. *In: Sazonalidade e manejo reprodutivo*, M.H. THEMUDO, A.L. SILVADO e J.S., SIL-

- VA (Eds), Série Divulgação e Desenvolvimento, Sociedade Portuguesa de Ovinotecnica e Caprinocultura, Lisboa, Portugal, **2** (1), 71-76.
- GOLDMAN, B.D., 2001. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms*, **16** (4), 283-301.
- GONZALEZ, R., POINDRON, P. e SIGNORET, J.P., 1988. Temporal variation in LH and testosterone responses of rams after the introduction of oestrous females during breeding season. *J Reprod Fert*, **83**, 201-208.
- GOODMAN, R.L. e KARSCH, F.J., 1981. A critique of the evidence on the importance of steroid feedback to seasonal changes in gonadotrophin secretion, *J Reprod Fert*, **30** (Suppl), 1-13.
- GOODMAN, R.L., ANDERSON, G.M., ADAMS, V.L., HARDY, S.L., CONNORS, J.M. e LEHMAN, M.N., 2002. Neuroendocrine mechanisms underlying seasonal breeding in the ewe. *J Anim Sci*, **80** (Suppl 1), 117.
- GORDON, I., 1997. Controlled reproduction in sheep & goats. Controlled Reproduction in Farm Animals Series, Vol. 2, CAB International, Cambridge, Reino Unido, 450 pp..
- GOTTESMANN, C., 2002. GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience*, **III** (2), 231-239.
- GRAVANCE, C.G., CHAMPION, Z.J. e CASEY, P.J., 1998. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, **49**, 1219-1230.
- GREGORY, S.J., SWANSTON, I., MCNEILLY, A.S. e TORTONESE, D.J., 2000. Effects of PRL on the GnRH-induced LH response in ovine primary cell cultures throughout the annual reproductive cycle. *J Reprod Fert*, **25** (Abst), 36.

- GUERIN, M.V. e MATTHEWS, C.D., 1998. Alterations of estrous activity in the ewe by circadian-based manipulation of the endogenous pacemaker. *J Biol Rhythms*, **13** (1), 60-69.
- GUERIN, M.V., DEED, J.R. e MATTHEWS, C.D., 2000. The coincidence of light and melatonin with a specific phase of the circadian pacemaker is important for the timing of seasonal breeding in the ewe. *J Biol Rhythms*, **15** (6), 514-523.
- GUIDO, M.E., PICO, E.G. e CAPUTTO, 2001. Circadian regulation of phospholipid metabolism in retinal photoreceptors and ganglion cells. *Journal of Neurochemistry*, **76**, 835-845.
- GÜNDÜZ, B., 2002. Daily rhythm in serum melatonin and leptin levels in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **132**, 397-401.
- HANSEN, P.J., 1985. Photoperiodic regulation of reproduction in mammals breeding during long days *versus* mammals breeding during short days. *Anim Reprod Sci*, **9**, 301-315.
- HARD, D.L., BHATNAGAR, R.K., MOLINA, J.R. e ANDERSON, L.L., 2001. Secretion of dopamine and norepinephrine in hypophyseal portal blood and prolactin in peripheral blood of Holstein cattle. *Dom Anim Endocrinol*, **20**, 89-100.
- HARESIGN, W., 1993. New techniques for reducing seasonal breeding in males and females. In: 44th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Aarhus, Dinamarca.
- HASEGAWA, M. e CAHILL, G.M., 1999. A role for cyclic AMP in entrainment of the circadian oscillator in *Xenopus* retinal photoreceptors by dopamine but not by light. *Journal of Neurochemistry*, **72** (5), 1812-1820.
- HASTINGS, M.H. e FOLLETT, B.K., 2001. Toward a molecular biological calendar? *J Biol Rhythms*, **16** (4), 424-430.

- HAZLERIGG, D.G., MORGAN, P.J. e MESSENGER, S., 2001. Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: what can we learn from the *pars tuberalis*? *J Biol Rhythms*, **16** (4), 326-335.
- HERBOSA, C.G. e FOSTER, D.L., 1996. Defeminization of the reproductive response to photoperiod occurs early in prenatal development in the sheep. *Biol Reprod*, **54**, 420-428.
- HERBOSA, C.G., WOOD, R.I. e FOSTER, D.L., 1995. Prenatal androgens modify the reproductive response to photoperiod in the developing sheep. *Biol Reprod*, **52**, 163-169.
- HICKMAN, A.B., KLEIN, D.C. e DYDA, F., 1999. Melatonin biosynthesis: the structure of serotonin N-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism. *Mol Cell*, **3** (1), 23-32.
- HILEMAN, S.M. e JACKSON, G.L., 1999. Regulation of gonadotrophin-releasing hormone secretion by testosterone in male sheep. *J Reprod Fert*, **54**, 231-242.
- HILEMAN, S.M., HANDA, R.J. e JACKSON, G.L., 1999. Distribution of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in the male sheep hypothalamus. *Biol Reprod*, **60**, 1275-1284.
- HILEMAN, S.M., KUEHL, D.E. e JACKSON, G.L., 1998. Photoperiod affects the ability of testosterone to alter proopiomelanocortin mRNA, but not luteinizing hormone-releasing hormone mRNA, levels in male sheep. *J Neuroendocrinol*, **10**, 587-592.
- HILEMAN, S.M., PIERROZ, D.D. e FLIER, J.S., 2000. Editorial. Leptin, nutrition and reproduction: timing is everything. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **85** (2), 804-807.
- HOLLANDER, A.B., 2001. Circadian rhythms. <http://serendip.brynmawr.edu/bb/neuro/neuro00/web3/Hollander.htm>

- HONARAMOOZ, A., CHANDOLIA, R.K., BEARD, A.P. e RAWLINGS, N.C., 2000. Opioidergic, dopaminergic and adrenergic regulation of LH secretion in prepubertal heifers. *J Reprod Fert*, **119**, 207-215.
- HORTON, T.H. e YELLON, S.M., 2001. Aging, reproduction, and the melatonin rhythm in the Siberian hamster. *J Biol Rhythms*, **16** (2), 243-253.
- ILLNEROVÁ, H. e SUMOVA, A., 1997. Photic entrainment of the mammalian rhythm in melatonin production. *J Biol Rhythms*, **12** (6), 547-556.
- JACKSON, G.L. e KUEHL, D.E., 2000. Interactions of photoperiod, testosterone, and naloxone on GnRH and LH pulse parameters in the male sheep. *Domest Anim Endocrinol*, **18** (1), 97-110.
- JOHNSON, L., ING, N.H., WELSH, T.H., VARNER, D.D., SCRUTCHFIELD, W.L. e MARTIN, M.T., 2001. Efficiency of spermatogenesis in animals and humans. *In*: ASAS National Meeting, **80 E** (Suppl 2), 1-47.
- KAKEE, A., TAKANAGA, H., TERASAKI, T., NAITO, M., TSURUO, T. e SUGIYAMA, Y., 2001. Efflux of a suppressive neurotransmitter, GABA, across the blood-brain barrier. *J Neurochemistry*, **79**, 110-118.
- KALRA, P.S., EDWARDS, T.G., XU, B., JAIN, M. e KALRA, S.P., 1998. The anti-gonadotropic effects of cytokines: the role of neuropeptides. *Dom Anim Endocrinol*, **15** (5), 321-332.
- KALSBECK, A., BARASSIN, S., VAN HEERIKHUIZE, J.J., VAN DER VLIET, J. e BUIJIS, R.M., 2000a. Restricted daytime feeding attenuates reentrainment of the circadian melatonin rhythm after 8-h phase advance of the light-dark cycle. *J Biol Rhythms*, **15** (1), 57-66.
- KALSBECK, A., GARIDOU, M.-L., PALM, I.F., J.J., VAN DER VLIET, J., SIMONNEAUX, V., PÉVET, P. e BUIJIS, R.M., 2000b. Melatonin sees the light: blocking

- GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *European Journal of Neuroscience*, **12**, 3146-3154.
- KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., ALEXOPOULOS, C. e AMARANTIDIS, I., 2000. Seasonal variations in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research*, **37**, 125-130.
- KARSCH, F.J., DAHL, G.E., EVANS, N.P., JUDY, M.M., MAYFIELD, K.P., MOENTER, S.M. e FOSTER, D.L., 1993. Seasonal changes in gonadotrophin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod*, **49**, 1377-1383.
- KARSCH, F.J., DAHL, G.E., HACHIGIAN, T.M. e THRUN, L.A., 1995. Involvement of thyroid hormones in seasonal reproduction. *J Reprod Fert*, **49** (Suppl), 409-422.
- KATZ, L.S., PRICE, E.O., WALLACH, S.JR. e ZENCHAK, J.J., 1988. Sexual performance of rams reared with or without females after weaning. *J Anim Sci*, **66**, 1166-1167.
- KAWANO, J., KROUT, K.E. e LOEWY, A.D., 2001. Suprachiasmatic nucleus projections to the paraventricular nucleus of the rat. *Thalamus & Related Systems*, **1**, 197-202.
- KAYA, A., AKSOY, M. e TEKELI, T., 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research*, **44**, 153-158.
- KELLY, M.J., RØNNEKLEIV, O.K., IBRAHIM, N., LAGRANGE, A.H. e WAGNER, E.J., 2002. Estrogen modulation of K⁺ channel activity in hypothalamic neurons involved in the control of the reproductive axis. *Steroids*, **67**, 447-456.
- KENNAWAY, D.J. e HUGEL, H.M., 1992. Mechanisms of action of melatonin within the central nervous system. *Anim Reprod Sci*, **30**, 45-65.

- KENNAWAY, D.J. e ROWE, S.A., 1995. Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction. *J Reprod Fert*, **49** (Suppl), 423-435.
- KENNAWAY, D.J., 2002. Programming of the fetal suprachiasmatic nucleus and subsequent adult rhythmicity. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, **13** (9), 398-402.
- KHALID, M. e JACKSON, G.L., 1991. Exposure of ewes to long-day photoperiods before the winter solstice can disrupt refractoriness to short days. *Anim Reprod Sci*, **25**, 225-232.
- KHALIL, E.M., DE ANGELIS, J. e COLE, P.A., 1998. Indoleamine analogs as probes of the substrate selectivity and catalytic mechanism of serotonin N-acetyltransferase. *J Biol Chem*, **273** (46), 30321-30327.
- KHALIL, E.M., DE ANGELIS, J., ISHII, M. e COLE, P.A., 1999. Mechanism-based inhibition of the melatonin rhythm enzyme: pharmacologic exploitation of active site functional plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96** (22), 12418-12423.
- KIOUSSI, C., CARRIERE, C. e ROSENFELD, M., 1999. A model for the development of the hypothalamic-pituitary axis: transcribing the hypophysis. *Mechanisms of Development*, **81**, 23-35.
- KLEIN, D.C., COON, S.L., ROSEBOOM, P.H., WELLER, J.L., BERNARD, M., GASTEL, J.A., ZATZ, M., IUVONE, P.M., RODRIGUEZ, I.R., BÉGAY, V., FALCÓN, J., CAHILL, G.M., CASSONE, V.M. e BALER, R., 1997. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Progress in Hormone Research*, **52**, 307-357.
- KNIGHT, T. W., 1977. Methods for indirect estimate of testis weight and sperm numbers in Merino and Romney rams. *N Z J Agric Res*, **27**, 291-296.
- KOHLER, M., KALKOWSKI, A. e WOLLNIK, F., 2000. Species differences between hamsters and rats with regard to the putative role of serotonin in the circadian system. *Biological Rhythm Research*, **31** (3), 340-354.

- KOPP, M.D.A., MEISSEL, H., DEHGHANI, F. e KORF, H.-W., 2001. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates glutamatergic calcium signaling: investigations on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurochemistry*, **79**, 161-171.
- KORPI, E.R., GRÜNDER, G. e LÜDDENS, H., 2002. Drug interactions at GABA_A receptors. *Progress in Neurobiology*, **67**, 113-159.
- KRIDLI, R.T. e HALLFORD, D.M., 1997. Luteinizing hormone and ovarian responses of early postpartum Debouillet ewes treated with cyproheptadine and(or) melatonin. *J Anim Sci*, **75**, 2535-2540.
- KUMAR, V. e FOLLETT, B.K., 1993. The nature of the photoperiodic clock in vertebrates. *Proc Zool Soc, Calcuta, Haldane Comm Vol*, 217-227.
- KUŞ, I., SARSILMAZ, M., ÖGETÜRK, M., YLMAZ, B., KELEŞTIMUR, H. e ÖNER, H., 2000. Ultrastructural interrelationship between the pineal gland and the testis in the male rat. *Archives of Andrology*, **45**, 119-124.
- KUSAKARI, N. e OHARA, M., 1999. Effect of accelerated lambing system with melatonin feeding on reproductive performance for 2 years in Suffolk sheep raised in Hokkaido. *J Reprod Develop*, **45** (4), 283-288.
- KVETNOY, I., SANDVIK, A.K. e WALDUM, H.L., 1997. The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin. *J Mol Endocrinol*, **18**, 1-3.
- LEHMAN, M.N., DURHAM, D.M., JANSEN, H.T., ADRIAN, B. e GOODMAN, R.L., 1996. Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative feedback in anestrous, but not breeding season, ewes. *Endocrinology*, **137**, 4443-4450.
- LEHMAN, M.N., GOODMAN, R.L., KARSCH, F.J., JACKSON, G.L., BERRIMAN, S.J. e JANSEN, H.T., 1997. The GnRH system of seasonal breeders: anatomy and plasticity. *Brain Research Bulletin*, **44** (4), 445-457.

- LINCOLN, G.A. e ALMEIDA, O.F.X., 1982. Inhibition of reproduction in rams by long daylengths and the acute effect of superior cervical ganglionectomy. *J Reprod Fert*, **66**, 417-423.
- LINCOLN, G.A. e BAKER, B.I., 1995. Seasonal and photoperiod-induced changes in the secretion of α -melanocyte-stimulating hormone in Soay sheep: temporal relationships with changes in β -endorphin, prolactin, follicle-stimulating hormone, activity of the gonads and growth of wool and horns. *J Endocrinol*, **144**, 471-481.
- LINCOLN, G.A. e CLARKE, I.J., 1995. Evidence that melatonin acts in the pituitary gland through a dopamine-independent mechanism to mediate effects of daylength on the secretion of prolactin in the ram. *J Neuroendocrinol*, **7**, 637-643.
- LINCOLN, G.A. e CLARKE, I.J., 1997. Refractoriness to a static melatonin signal develops in the pituitary gland for the control of prolactin secretion in the ram. *Biol Reprod*, **57**, 460-467.
- LINCOLN, G.A. e CLARKE, I.J., 1998. Absence of photoperiodic modulation of gonadotrophin secretion in HPD rams following chronic pulsatile infusion of GnRH. *J Neuroendocrinol*, **10**, 461-471.
- LINCOLN, G.A. e CLARKE, I.J., 2000a. Photoperiodic control of reproduction in sheep: role of the caudal arcuate/premammillary hypothalamus. *J Reprod Fert*, **25** (Abst), 23.
- LINCOLN, G.A. e CLARKE, I.J., 2000b. Role of pituitary gland in the development of photorefractoriness and generation of long-term changes in prolactin secretion in rams. *Biol Reprod*, **62** (2), 432-438.
- LINCOLN, G.A. e DAVIDSON, W., 1977. The relationship between sexual and aggressive behaviour and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *J Reprod Fert*, **49**, 267-476.

- LINCOLN, G.A. e MAEDA, K.-I., 1992a. Effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area on the secretion of prolactin and β -endorphin in rams. *J Endocrinol*, **134**, 437-453.
- LINCOLN, G.A. e MAEDA, K.-I., 1992b. Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *J Endocrinol*, **132**, 201-215.
- LINCOLN, G.A. e SSEWANNYANA, E., 1989. Opioid peptides and seasonal reproduction. In: Brain opioid systems, R.G. BYER e R.J. BICKNELL (Eds), Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 52-69.
- LINCOLN, G.A. e TORTONESE, D.J., 1999. Prolactin replacement fails to inhibit reactivation of gonadotropin secretion in rams treated with melatonin under long days. *Biol Reprod*, **60** (3), 602-610.
- LINCOLN, G.A., 1976. Secretion of LH in rams exposed to two different photoperiods. *J Reprod Fert*, **47**, 351-353.
- LINCOLN, G.A., 1978. Induction of testicular growth and sexual activity in rams by a "skeleton" short-day photoperiod. *J Reprod Fert*, **52**, 179-181.
- LINCOLN, G.A., 1992. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. *Anim Reprod Sci*, **28**, 203-217.
- LINCOLN, G.A., 1994. Effects of placing micro-implants of melatonin in the *pars tuberalis*, *pars distalis* and the lateral *septum* of the forebrain on the secretion of FSH and prolactin, and testicular size rams. *J Endocrinol*, **142**, 267-276.
- LINCOLN, G.A., 1999. Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. *Adv Exp Med Biol*, **460**, 137-153.

- LINCOLN, G.A., 2000. Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. *In: Melatonin after four decades. Systems ancient and modern.* J. OLCESE (Ed), Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nova Iorque, EUA, 137-153.
- LINCOLN, G.A., ALMEIDA, O.F.X. e ARENDT, J., 1981. Role of melatonin and circadian rhythms in seasonal reproduction in rams. *J Reprod Fertil*, **30** (Suppl), 23-31.
- LINCOLN, G.A., CLARKE, I.J. e SWEENEY, T., 1996. "Hamster-like" cycles in testicular size in the absence of gonadotrophin secretion in HPD rams exposed to long-term changes in photoperiod and treatment with melatonin. *Neuroendocrinology*, **8**, 855-866.
- LINCOLN, G.A., LINCOLN, C.E. e MCNEILLY, A.S., 1990. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *J Reprod Fertil*, **88**, 623-633.
- LINCOLN, G.A., MESSENGER, S., ANDERSSON, H. e HAZLERIGG, D., 2002. Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the *pars tuberalis* of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *PNAS*, **99** (21), 13890-13895.
- LINCOLN, G.A., RHIND, S.M., POMPOLO, S. e CLARKE, I.J., 2001. Hypothalamic control of photoperiod-induced cycles in food intake, body weight, and metabolic hormones in rams. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, **281**, R76-R90.
- LINDSAY, D.R., 1996. Environment and reproductive behaviour. *Anim Reprod Sci*, **42**, 1-12.
- LINDSAY, D.R., PELLETIER, J., PISSELET, C. e COUROT, M., 1984. Changes in photoperiod and nutrition and their effect on testicular growth of rams. *J Reprod Fert*, **71**, 351-356.
- LOPEZ SEBASTIAN, A., 1989. Estacionalidad de la reproducción. *Ovis*, **1**, 59-73.

- LUNDKVIST, G.B., KRISTENSSON, K. e RUSSELL, H.H., 2002. The suprachiasmatic nucleus exhibits diurnal variations in spontaneous excitatory postsynaptic activity. *J Biol Rhythms*, **17** (1), 40-51.
- LYONS, H.R., LAND, M.B., GIBBS, T.T. e FARB, D.H., 2001. Distinct signal transduction pathways for GABA-induced GABA_A receptor down-regulation and uncoupling in neural culture: a role for voltage-gated calcium channels. *J Neurochemistry*, **78**, 1114-1125.
- MADDOCKS, S., KERN, S. e SETCHELL, B.P., 1995. Investigating local regulation of the testes of ruminants. *J Reprod Fert*, **49** (Suppl), 309-319.
- MALPAUX, B., DAVEAU, A., MAURICE-MANDON, F., DUARTE, G. e CHEMINEAU, P., 1998. Evidence that melatonin acts in premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by *in situ* microimplant delivery. *Endocrinology*, **139**, 1508-1516.
- MALPAUX, B., MIGAUD, M., TRICOIRE, H. e CHEMINEAU, P., 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms*, **16** (4), 336-347.
- MALPAUX, B., ROBINSON, J.E., BROWN, M.B. e KARSCH, F.J., 1988. Importance of changing photoperiod and melatonin secretory pattern in determining the length of the breeding season in the Suffolk ewe. *J Reprod Fert*, **83**, 461-470.
- MALPAUX, B., ROBINSON, J.E., WAYNE, N.L. e KARSCH, F.J., 1989. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *J Endocrinol*, **122**, 269-278.
- MALPAUX, B., VIGUIÉ, C., SKINNER, D.C., THIÉRY, J.C., PELLETIER, J. e CHEMINEAU, P., 1996a. Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. *Anim Reprod Sci*, **42**, 109-117.

- MALPAUX, B., VIGUIÉ, C., THIÉRY, J.C. e CHEMINEAU, P., 1996b. Contrôle photo-périodique de la reproduction. *INRA Prod Anim*, **9** (1), 9-23.
- MALPAUX, B., VIGUIÉ, C., SKINNER, D.C., THIÉRY, J.C. e CHEMINEAU, P., 1997. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull*, **44** (4), 431-438.
- MALVEN, P.V., BOSSUT, D.F.B. e DIEKMAN, M.A., 1984. Effects of naloxone and electroacupuncture treatment on plasma concentrations of LH in sheep. *J Endocr*, **101**, 75-80.
- MALVEN, P.V., HAGLOF, S.A. e JIANG, H., 1995. Serum concentrations of luteinizing hormone, growth hormone, and prolactin in untreated and estradiol-treated ovariectomized ewes after immunoneutralization of hypothalamic neuropeptide Y. *J Anim Sci*, **73**, 2105-2112.
- MARANGOS, P.J., PATEL, J., HIRATA, F., SONHEIN, D., PAUL, S.M., SKOLNICK, P. e GOODWIN, F., 1981. Inhibition of diazepam binding by tryptophan derivatives including melatonin and its brain metabolite n-acetyl-5-methoxy kynurenamine. *Life Sci*, **29**, 259-267.
- MARCO-JIMÉNEZ, F., PUCHADES, S., RODRÍGUEZ, M. e VICENTE, J.S., 2003. Estudio de la influencia de la estacionalidad sobre la calidad seminal de moruecos de la raza Guirra. *In: Producción Ovina y Caprina*, nº XXVIII, SEOC, Badajoz, 188-191.
- MARIE, M., FINDLAY, P.A., THOMAS, L. e ADAM, C.L., 2001. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *J Endocrinol*, **170** (1), 277-286.
- MARITIM, A.C., MOORE, B.H., SANDERS, R.A. e WATKINS III, J.B., 1999. Effects of melatonin on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Toxicology*, **18**, 161-166.

- MARNET, B., VIEITEZ, G., MILHET, P., RICHAILLEY, G., LESOURD, F. e PARI-NAUD, J., 2000. Computer-assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques. *International Journal of Andrology*, **23**, 22-28.
- MARTIN, G.B., FORD, J.R. e PURVIS, I.W., 1990. Environmental and genetic factors affecting reproductive activity in the Merino ram. *In: Reproductive physiology of Merino sheep – concepts and consequences* OLDHAM, C.M., MARTIN, G.B. e PURVIS, I.W. (Eds), University of Western Australia, Nedlands, Austrália, 109-129.
- MARTIN, G.B., HÖTZEL, M.J., BLACHE, D., WALKDEN-BROWN, S.W., BLACK-BERRY, M.A., BOUKHLIQ, R., FISCHER, J.S. e MILLER, D.W., 2002. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. *Reprod Fertil Dev*, **14**, 165-175.
- MASCARENHAS, R., SILVA, J.R., HORTA, A. e LEITÃO, R., 1980. Variação sazonal da actividade sexual de carneiros Merino Precoces e Frisserra. *In: II Congresso Internacional de Veterinária em Língua Portuguesa*, Lisboa, Portugal, 1-14.
- MASSON-PEVET, M. e GAUER, F., 1994. Seasonality and melatonin receptors in the *pars tuberalis* in some long day breeders. *Biol Signals*, **3**, 63-70.
- MATEOS, E. e ZUBIETA, M., 1990. Influencia del estímulo sexual en los niveles de testosterona plasmática de machos cabrios. *Invest Agr: Prod Sanid Anim*, **5** (3), 109-119.
- MATTHEWS, C.D. e GUERIN, M.V., 1995. Is a critical interval of the circadian pacemaker at dusk responsive to light and melatonin responsible for the timing of estrus in the Romney Marsh ewe? *J Biol Rhythms*, **10** (4), 308-319.
- MATTHEWS, C.D., GUERIN, M.V. e DEED, J.R., 1993. Melatonin and photoperiodic time measurement: seasonal breeding in the sheep. *J Pineal Res*, **14**, 105-116.

- MCCANN, S.M., KIMURA, M., WALCZEWSKA, A., KARANTH, S., RETTORI, V., e YU, W.H., 1998. Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines, and leptin. *Dom Anim Endocrinol*, **15** (5), 333-344.
- MCLACHLAN, R.I., WREFORD, N.G., O'DONNELL, L., KRETZER, D.M. e ROBERTSON, D.M., 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol*, **148**, 1-9.
- MCMILLEN, I.C., HOUGHTON, D.C. e YOUNG, I.R., 1995. Melatonin and development of circadian and seasonal rhythmicity. *J Reprod Fert*, **49** (Suppl), 137-146.
- MENAKER, M., 1997. Commentary: what does melatonin do and how does it do it? *J Biol Rhythms*, **12** (6), 532-534.
- MERCER, J.G., MOAR, K.M., LOGIE, T.J., FINDLAY, P.A., ADAM, C.L. e MORGAN, P.J., 2001. Seasonally inappropriate body weight induced by food restriction: effect on hypothalamic gene expression in male Siberian hamsters. *Endocrinology*, **142** (10), 4173-4181.
- MESSAGER, S., HAZLERIGG, D.G., MERCER, J.G. e MORGAN, P.J., 2000. Photoperiod differentially regulates the expression of *Per1* and *ICER* in the *pars tuberalis* and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *European Journal of Neuroscience*, **12**, 2865-2870.
- MICKELSEN, W.D., PAISLEY, L.G. e DAHMEN, J.J., 1982. The relationship of libido and serving capacity. *Theriogenology*, **18** (1), 79-85.
- MIGAUD, M., GAVET, S. e PELLETIER, J., 2002. Partial cloning and polymorphism of the melatonin_{1a} (Mel_{1a}) receptor gene in two breeds of goat with different reproductive seasonality. *Reproduction*, **124**, 59-64.
- MIKLÓS, I.H. e KOVÁCS, K.J., 2002. GABAergic innervation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-secreting parvocellular neurons and its plasticity as demonstrated by quantitative immunoelectron microscopy. *Neuroscience*, **113** (3), 581-592.

- MISZTAL, T., ROMANOWICZ, K. e BARCIKOWSKI, B., 2002. Effect of melatonin on daily LH secretion in intact and ovariectomized ewes during the breeding season. *Anim Reprod Sci*, **69**, 187-198.
- MITSUSHIMA, D., SHWE, T.-T.-W., FUNABASHI, T., SHINOHARA, K. e KIMURA, F., 2002. GABA release in the medial preoptic area of cyclic female rats. *Neuroscience*, **113** (1), 109-114.
- MORAND-FEHR, P. e DOREAU, M., 2001. Ingestion et digestion chez les ruminants soumis à un stress de chaleur. *INRA Prod Anim*, **14**, 15-27.
- MORGAN, P.J., ROSS, A.W., GRAHAM, E.S., ADAM, C., MESSENGER, S. e BARRETT, P., 1998. *oPer1* is an early response gene under photoperiodic regulation in the ovine *pars tuberalis*. *J Neuroendocrinol*, **10**, 319-323.
- NELSON, R.J. e DEMAS, G.E., 1996. Seasonal changes in immune function. *The Quarterly Review of Biology*, **71** (4), 511-548.
- NELSON, R.J. e DEMAS, G.E., 1997. Role of melatonin in mediating seasonal energetic and immunologic adaptations. *Brain Research Bulletin*, **44** (4), 423-430.
- NETT, T.M., TURZILLO, A.M., BARATTA, M. e RISPOLI, L.A., 2002. Pituitary effects on steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Dom Anim Endocrinol*, **23**, 33-42.
- NETTER, F., 2002. Hypothalamus. <http://www.psycheducation.org/emotion/hypothalamus.htm>
- NONNO, R., CAPSONI, S., LUCINI, V., MØLLER, M., FRASCHINI, F. e STANKOV, B., 1995. Distribution and characterization of the melatonin receptors in the hypothalamus and pituitary gland of three domestic ungulates. *J Pineal Res*, **18**, 207-216.

- NOTTER, D.R. e CHEMINEAU, P., 2001. Nocturnal melatonin and prolactin plasma concentrations in sheep selected for fertility in autumn lambing. *J Anim Sci*, **79**, 2895-2901.
- NUESSLEIN-HILDESHEIM, B., O'BRIEN, J.A., EBLING, F.J.P., MAYWOOD, E.S. e HASTINGS, M.H., 2000. The circadian cycle of mPer clock gene in the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *European Journal of Neuroscience*, **12**, 2856-1864.
- O'CALLAGHAN, D., CROSBY, T.F. e BOLAND, M.P., 1993. Endocrine regulation of seasonal breeding in sheep. *In*: 44th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Aarhus, Dinamarca, 6 pp..
- O'CALLAGHAN, D., KARSCH, F.J., BOLAND, M.P., HANRAHAN, J.P. e ROCHE, J.F., 1992. Variation in the timing of the reproductive season among breeds of sheep in relation to differences in photoperiodic synchronization of an endogenous rhythm. *J Reprod Fert*, **96**, 443-452.
- O'CALLAGHAN, D., SWEENEY, T., TAYLOR, L., ROBLOT, G. e WYLDE, R., 1999. Effect of immunization against melatonin on prolactin concentrations and the timing of reproductive transitions in ewes. *Domest Anim Endocrinol*, **16** (4), 207-217.
- O'DONNELL, L., ROBERTSON, K.M., JONES, M.E. e SIMPSON, E.R., 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, **22** (3), 289-318.
- OKATANI, Y., WAKATSUKI, A., REITER, R.J. e MIYAHARA, Y., 2002. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiology of Aging*, **23**, 639-644.
- ORGEUR, P. e SIGNORET, J.P., 1984. Sexual play and its functional significance in the domestic sheep (*Ovis aris L.*). *Physiol Behav*, **33**, 111-118.
- ORGEUR, P., MIMOUNI, P. e SIGNORET, J.P., 1990. The influence of rearing conditions on the social relationships of young male goats. *Appl Anim Behav Sci*, **27**, 105-113.

- ORGEUR, P., MIMOUNI, P., LEBOEUF, B. e SIGNORET, J.P., 1988. Effet de l'expérience sociale au cours du développement sur le comportement sexuel et la production spermatique de jeunes boucs. *Ann Zootech*, **37** (2), 99-110.
- ORTAVANT, R., BOCQUIER, F., PELLETIER, J., RAVAUULT, J.P., THIMONIER, J. e VOLLAND-NAIL, P., 1988. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Aust J Biol Sci*, **41**, 69-85.
- ORTAVANT, R., DAVEAU, A., GARNIER, D.H., PELLETIER, J., DE REVIERS, M.M. e TERQUI, M., 1982. Diurnal variation in release of LH and testosterone in the ram. *J Reprod Fert*, **64**, 347-353.
- PANDI-PERUMAL, S.R., SEILS, L.K., KAYUMOV, L., RALPH, M.R., LOWE, H., MOLLER, H. e SWAAB, D.F., 2002. Senescence, sleep, and circadian rhythms – review. *Ageing Research Reviews*, **1**, 559-604.
- PANG, S.F., 1998. Melatonin receptors in reproductive tissues: evidence for the multiple sites of melatonin action. *INABIS*, 1-13.
- PARKINSON, T.J. e FOLLETT, B.K., 1994. Effect of Thyroidectomy upon seasonality in rams. *J Reprod Fertil*, **101** (1), 51-58.
- PARKINSON, T.J. e FOLLETT, B.K., 1995. Thyroidectomy abolishes seasonal testicular cycles of Soay rams. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **259** (1354), 1-6.
- PARRAGUEZ, V.H., SALES, F., VALENZUELA, G.J., VERGARA, M., CATALAN, L. e SERON-FERRE, M., 1999. Diurnal changes in light intensity inside the pregnant uterus in sheep. *Anim Reprod Sci*, **52** (2), 123-130.
- PARTHASARATHY, V., PRICE, E.O., ORIHUELA, DALLY, M.R. e ADAMS, T.E., 2002. Passive immunization of rams (*Ovis aries*) against GnRH: effects on antibody titer, serum concentrations of testosterone, and sexual behaviour. *Anim Reprod Sci*, **71**, 203-215.

- PARVIZI, N., 2000. Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female. *Anim Reprod Sci*, **60-61**, 31-47.
- PELLETIER, J. e ALMEIDA, G., 1987. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. *J Reprod Fert*, **34** (Suppl), 215-226.
- PELLETIER, J., 1986. Contribution of increasing and decreasing daylength to the photoperiodic control of LH secretion in the Ile-de-France ram. *J Reprod Fert*, **77**, 505-512.
- PELLETIER, J., BODIN, L., HANOCQ, E., MALPAUX, B., TEYSSIER, J., THIMONIER, J. e CHEMINEAU, P., 2000. Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel_{1a} receptor in the ewe. *Biol Reprod*, **62**, 1096-1101.
- PELLETIER, J., GARNIER, D.H., DE REVIERS, M.M., TERQUI, M. e ORTAVANT, R., 1982. Seasonal variation in LH and testosterone release in rams of two breeds. *J Reprod Fert*, **64**, 341-346.
- PENICAUD, L., COUSIN, B., LELOUP, C., LORSIGNOL, A. e CASTEILLA, L., 2000. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition*, **16**, 903-908.
- PÉREZ, R., LÓPEZ, A., CASTRILLEJO, A., BIELLI, A., LABORDE, D., GASTEL, T., TAGLE, T., QUEIROLO, D., FRANCO, J., FORSBERG, M. e RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., 1997. Reproductive seasonality of Corriedale rams under extensive rearing conditions. *Acta Vet Scand*, **38**, 109-117.
- PÉREZ, R.C., FORSBERG, M. e RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., 1998. Seasonal variation in live weight, testes size, testosterone, LH secretion, melatonin and thyroxine in Merino and Corriedale rams in a subtropical climate. *Acta Vet Scand*, **39**, 35-47.
- PFEFFER, M., KÜHN, R., KRUG, L., KORF, H.-W. e STEHLE, J.H., 1998. Rhythmic variation in β 1-adrenergic receptor mRNA levels in the rat pineal gland: circadian and developmental regulation. *European Journal of Neuroscience*, **10**, 2896-2904.

- PICAZO, R.A. e LINCOLN, G.A., 1995. Light control of the duration of the daily melatonin signal under long and short days in the Soay ram. *J Biol Rhythms*, **10** (1), 55-63.
- PINCKARD, K.L., STELLFLUG, J. e STORMSHAK, F., 2000a. Influence of castration and estrogens replacement on sexual behavior of female-oriented, male-oriented, and asexual rams. *J Anim Sci*, **78**, 1947-1953.
- PINCKARD, K.L., STELLFLUG, J., RESKO, J.A., ROSELLI, C.E. e STORMSHAK, F., 2000. Review: brain aromatization and other factors affecting reproductive behavior with emphasis on the sexual orientation of rams. *Dom Anim Endocrinol*, **18**, 83-96.
- PINCKARD, K.L., STELLFLUG, J., RESKO, J.A., ROSELLI, C.E. e STORMSHAK, F., 2000b. Review: brain aromatization and other factors affecting male reproductive behaviour with emphasis on the sexual orientation of rams. *Dom Anim Endocrinol*, **18**, 83-96.
- POPWELL, J.M., ESTIENNE, M.J., KRAELING, R.R., BARB, C.R., WHITLEY, N.C., UTLEY, R.V. e RAMPACEK, G.B., 1996. The role of excitatory amino acids in pulsatile secretion of luteinizing hormone in gilts and barrows. *J Anim Sci*, **74**, 1067-1073.
- POTHOS, E.N., 2002. Regulation of dopamine quantal size in midbrain and hippocampal neurons. *Behavioural Brain Research*, **130**, 203-207.
- POULTON, A.L., ENGLISH, J., SYMONS, A.M. e ARENDT, J., 1987. Changes in plasma concentrations of LH, FSH and prolactin in ewes receiving melatonin and short-photoperiod treatments to induce early onset of breeding activity. *J Endocrinol*, **112**, 103-111.
- PRICE, E.O., 1987. Male sexual behavior. *Vet Clin of North Am Food Anim Pract*, **3**, 405-422.
- PRICE, E.O., BORGWARDT, R., DALLY, M.R. e HEMSWORTH, 1996. Repeated mating with individual ewes by rams differing in sexual performance. *J Anim Sci*, **74**, 542-544.

- PRIEST, C.A. e PFAFF, D.W., 1995. Actions of sex steroids on behaviours beyond reproductive reflexes. *CIBA Found Symp*, **191**, 74-84.
- PRIVAT, K., RAVAUULT, J.P., CHESNEAU, D. e FEVRE-MONTANGE, M., 1999. Day/night variation of tryptophan hydroxylase and serotonin N-acetyltransferase mRNA levels in the ovine pineal gland and retina. *J Pineal Res*, **26** (4), 193-203.
- PROSSER, R.A., 2000. Serotonergic actions and interactions on the SCN circadian pacemaker: in vitro investigations. *Biological Rhythm Research*, **31** (3), 315-339.
- QUIRKE, J.F., HANRAHAN, J.P., LOUGHNANE, W. e TRIGGS, R., 1986. Components of the breeding and non-breeding seasons in sheep: breed effects and repeatability. *Ir J Agric Res*, **25**, 167-172.
- RAVAULT, J.P. e CHESNEAU, D., 1999. The onset of increased melatonin secretion after the onset of darkness in sheep depends on the photoperiod. *J Pineal Res*, **27** (1), 1-8.
- REA, M.A. e PICKARD, G.E., 2000. Serotonergic modulation of photic entrainment in the Syrian hamster. *Biological Rhythm Research*, **31** (3), 284-314.
- RECIO, J., GAUER, F., SCHUSTER, C., PÉVET, P. e MASSON-PÉVET, M., 1998. Daily and photoperiodic 2-¹²⁵I-melatonin binding changes in the *pars tuberalis* of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*): effect of constant light exposure and pinealectomy. *J Pineal Res*, **24**, 162-167.
- RECIO, J., PÉVET, P. e MASSON-PÉVET, M., 1998. Regulation of melatonin receptors in the *pars tuberalis* of Syrian hamsters transferred from long to short photoperiod: implication of melatonin and testosterone. *J Neuroendocrinol*, **10**, 303-308.
- REDMAN, J.R., 1997. Circadian entrainment and phase shifting in mammals with melatonin. *J Biol Rhythms*, **12** (6), 581-587.
- REITER, R.J., 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, **49**, 654-664.

- REITER, R.J., GARCIA, J.J. e PIE, J., 1998. Oxidative toxicity in models of neurodegeneration: responses to melatonin. *Restorative Neurology and Neuroscience*, **12**, 135-142.
- REPPERT, S.M., 1997. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors, *J Biol Rhythms*, **12** (6), 528-531.
- RESCALDO, L., MADRIDANO, J.M., GRACIA, O., PÉREZ, S., AGUADO, M.J., PÉREZ-GUZMÁN, M.D., MONTOSO, V. e GARDE, J., 1993. Influencia de la estación sobre las características seminales en moruecos adultos de raza Manchega. *In: Publicações do 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal*, Luso, Portugal, 279-285.
- RESKO, J.A., PERKINS, A., ROSELLI, C.E., STELLFLUG, J.N. e STORMSHAK, F.K., 1999. Sexual behaviour of rams: male orientation and its endocrine correlates. *J Reprod Fert*, **54** (Suppl), 259-269.
- RIBELAYGA, C., GARIDOU, M.-L., MALAN, A., GAUER, F., CALGARI, C., PÉVET, P. e SIMONNEAUX, V., 1999. Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J Biol Rhythms*, **14** (2), 105-115.
- ROBINSON, J.E. e FORSDIKE, R.A., 1999. Sex steroids and sexual dimorphism. *J Reprod Fert*, **24** (Abst), 3.
- ROBINSON, J.E. e KARSCH, F.J., 1987. Photoperiodic history and a changing melatonin pattern can determine the neuroendocrine response of the ewe to daylength. *J Reprod Fert*, **80**, 635-640.
- ROBINSON, J.E., 1995. Gamma amino-butyric acid and the control of GnRH secretion in sheep. *J Reprod Fert*, **49** (Suppl), 221-230.

- ROBINSON, J.E., BIRCH, R.L., TAYLOR, J.A., FOSTER, D.L. e PADMANABHAN, V., 2002. *In utero* programming of sexually differentiated gonadotrophin releasing hormone (GnRH) secretion. *Dom Anim Endocrinol*, **23**, 43-52.
- ROBINSON, J.E., KAYNARD, A.H. e KARSCH, F.J., 1986. Does melatonin alter pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone in the ewe? *Neuroendocrinology*, **43**, 635-640.
- ROBINSON, J.E., WIGZELL, S., AITKEN, R.P., WALLACE, J.M., IRELAND, S. e ROBERTSON, I.S., 1991. The modifying effects of melatonin, ram exposure and plane of nutrition on the onset of ovarian activity, ovulation rate and the endocrine status of ewes, *Anim Reprod Sci*, **26**, 73-91.
- ROBINSON, J.J., 1996. Nutrition and reproduction. *Anim Reprod Sci*, **42**, 25-34.
- ROMANOVICZ, K., MISZTAL, T., GAJEWSKA, A. e BARCIKOWSKI, B., 2001. Daily GnRH and LH secretion in ewes is not modified by exogenous melatonin during seasonal anestrus. *Acta Neurobiol Exp*, **61**, 289-297.
- ROMÃO, R.J., BETTENCOURT, E.M.V., BETTENCOURT, C.M.V. e MATOS, C.A.P., 2000. Efecto del tratamiento con implantes de melatonina en la fertilidad del semen congelado de moruecos de las razas ovinas Merina Preta y Campaniça. *In: Producción Ovina y Caprina*, nº XXVIII, SEOC, Badajoz, 204-208.
- ROSA, H.J.D. e BRYANT, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, **48**, 155-178.
- ROSA, H.J.D., JUNIPER, D.T. e BRYANT, M.J., 2000. Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behaviour and ability to induce ovulation in seasonally anoestrous ewes. *J Reprod Fert*, **120**, 169-176.
- ROSS, A.W., WEBSTER, C.A., THOMPSON, M., BARRETT, P. e MORGAN, P.J., 1998. A novel interaction between inhibitory melatonin receptors and protein kinase C –

- dependent signal transduction in ovine *pars tuberalis* cells. *Endocrinology*, **139**, 1723-1730.
- RUSAK, B., ROBERTSON, H.A., WISDEN, W. e HUNT, P.H., 1990. Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, **248**, 1237-1240.
- RUSSEL, A.J.F., DONEY, J.M. e GUNN, R.G., 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci Camb*, **72**, 451-454.
- RUSSEL, J.F., DONEY, J.M. e GUNN, R.G., 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci, Cambridge*, **72**, 451-454.
- SAIJA, A., TOMAINO, A., TROMBETTA, D., PELLEGRINO, M.L., TITA, B., CARUSO, S. e CASTELLI, F., 2002. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **53**, 209-215.
- SALERI, R., BARATTA, M. e TAMANINI, C., 1998. β -endorphin directly influences both basal and GnRH-induced LH release by bovine pituitaries *in vitro*. *Reprod Dom Anim*, **33**, 27-32.
- SALHAB, S.A., ZARKAWI, M., WARDEH, M.F., AL-MASRI, M.R. e KASSEM, R., 2001. Development of testicular dimensions and size, and their relationship to age, bodyweight and parental size in growing Awassi ram lambs. *Small Ruminant Research*, **40** (2), 187-191.
- SALMON, I., COGNIÉ, Y., ORGEUR, P., VENIER, G. e SIGNORET, J.P., 1984. Effet du comportement sexuel et de la production spermatique du bélier sur la fertilité obtenue en accouplement naturel. *Ann Zootech*, **33** (3), 343-352.
- SÁNCHEZ, J.M.S. e FERRERO, M.I.V., 1999. Etología de la reproducción en las especies domésticas. *In: II Congreso Ibérico de Reproducción Animal*, Lugo, Espanha, 569-583.

- SANCHO, M., PÉREZ-SÁNCHEZ, F., TABLADO, L., MONSERRAT, J.J. e SOLER, C., 1998. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology*, **50**, 27-37.
- SANDYK, R., 1990. Possible role of pineal melatonin in the mechanisms of aging. *Int J Neurosci*, **52** (1-2), 85-92.
- SANFORD, L.M. e BAKER, S.J., 1990. Enhanced testosterone secretion in adult rams after establishment of a high-frequency, low-amplitude pattern of LH pulses in the non-breeding season occurs without changes in the number or binding affinity of testicular LH receptors. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **122**, 55-61.
- SANTIAGO-MORENO, J., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., GONZÁLEZ-BULNES, A., GÓMEZ-BRUNET, A. e CHEMINEAU, F., 2000. Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations, in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*) ewes. *Reprod Nutr Dev*, **40**, 421-430.
- SANZ, M.R., PRIETO, I., GIL, F. e FONOLLA, J., 1995. Environmental temperature: composition and conformation of the carcasses of pre-ruminant kid goats and lambs. *In: Body condition of sheep and goats. Methodological aspects and applications*, A. PURROY (Ed), Options Méditerranéennes, Série A: Séminaires Méditerranéens, CI-HEAM-FAO, Paris, França, **27**, 191-195.
- SAUNDERS, P.T.K., 2003. Germ cell-somatic cell interactions during spermatogenesis. *Reproduction*, **61** (Suppl), 91-101.
- SCHOMERUS, C., KORF, H.-W., LAEDTKE, E., WELLER, J.L. e KLEIN, D., 2000. Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from pineal gland. *Journal of Neurochemistry*, **75**, 2123-2132.

- SCHWARTZ, W.J., DE LA IGLESIA, H.O., ZLOMANCZUK, P. e ILLNEROVÁ, H., 2001. Encoding *le quattro stagioni* within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*, **16** (4), 302-311.
- SCOTT, C.J., RAWSON, J.A., PEREIRA, A.M. e CLARKE, I.J., 1999. Oestrogen receptors in the brainstem of the female sheep: relationship to noradrenergic cells and cells projecting to the medial preoptic area. *J Neuroendocrinol*, **11**, 745-755.
- SCOTT, C.J., TILBROOK, A.J., RAWSON, J.A. e CLARKE, I.J., 2000. Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals. *Anim Reprod Sci*, **60-61**, 313-326.
- SEAMARK, R.F., KENNAWAY, D.J., MATTHEWS, C.D., FELLEBERG, A.J., PHILIPOU, G., KOTARAS, P., MCINTOSH, J.E.A., DUNSTAN, E. e OBST, J.M., 1981. The role of the pineal gland in seasonality. *J Reprod Fert*, **30**, 15-21.
- SETCHELL, B.P., PLÖEN, L., RITZEN, E.M., 2002. Effect of local heating of rat testes after suppression of spermatogenesis by pretreatment with GnRH agonist and an anti-androgen. *Reproduction*, **124**, 133-140.
- SIGNORET, J.P., 1975. Influence of the sexual receptivity of a teaser ewe on the mating preference in the ram. *Appl Anim Ethol*, **1**, 229-232.
- SIGNORET, J.P., 1990. Le comportement sexuel des bovines domestiques. *Reproduction des Bovins, Etude n° 1.039*, 1-6.
- SIGNORET, J.-P., LEVY, F., NOWAK, R., ORGEUR, P. e SCHAAL, B., 1997. Le rôle de l'odorat dans les relations interindividuelles des animaux d'élevage. *INRA Prod Anim*, **10**, 339-348.
- SIMÕES, J.M.C., 1984. Fisiologia da reprodução dos ungulados domésticos. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 623 pp..

- SIMONNEAUX, V. e RIBELAYGA, C., 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews*, **55** (2), 325-395.
- SIMONNEAUX, V., RODEAU, J.-L., CALGARI, C. e PEVET, P., 1999. Short communication: neuropeptide Y increases intracellular calcium in rat pinealocytes. *European Journal of Neuroscience*, **11**, 725-728.
- SIROTKIN, A.V. e SCHAEFFER, H.-J., 1997. Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin: review. *J Endocrinol*, **154**, 1-5.
- SKINNER, D.C. e MALPAUX, B., 1999. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology*, **140** (10), 4399-4405.
- SKINNER, D.C. e ROBINSON, J.E., 1996. Luteinising hormone secretion from the perfused ovine *pars tuberalis* and *pars distalis*: effects of gonadotropin-releasing hormone and melatonin. *Neuroendocrinology*, **66**, 263-270.
- SKINNER, D.C., MAURICE, F. e MALPAUX, B., 1994. Is the *pars tuberalis* (PT) the site of action of melatonin in the ewe? *J Reprod Fert*, **14** (Abst), 7.
- SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, W.G., 1980. Statistical methods. 7ª Edição, Iowa State University Press, Ames, EUA, 185 pp..
- SNOWDER, G.D., STELLFLUG, J.N. e VAN VLECK, L.D., 2002. Heritability and repeatability of sexual performance scores of rams. *J Anim Sci*, **80**, 1508-1511.
- SONG, C.K. e BARTNESS, T.J., 1996. The effects of anterior hypothalamic lesions on short-day responses in Siberian hamsters given timed melatonin infusions. *J Biol Rhythms*, **11** (1), 14-26.

- SORENSEN Jr., A.M., 1979. Animal reproduction. Principles and practices. McGraw-Hill Book Company, Nova Iorque, EUA, 496 pp..
- SPESSERT, R., RAPP, M. e VOLLRATH, L., 2001. Serine/threonine phosphatase inhibitors decrease adrenergic arylalkylamine N-acetyltransferase induction in the rat pineal gland. *J Neuroendocrinol*, **13**, 581-587.
- STAPLES, L.D., MCPHEE, S., KENNAWAY, D.J. e WILLIAMS, A.H., 1992. The influence of exogenous melatonin on the seasonal pattern of ovulation and oestrus in sheep. *Anim Reprod Sci*, **30**, 185-223.
- STEEL, R.G.D. e TORRIE, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics. 2ª Edição, McGraw-Hill Company, Nova Iorque, EUA, 633 pp..
- STEHLE, J.H., VON GALL, C. e KORF, H.-W., 2001. Analysis of cell signaling in the rodent pineal gland deciphers regulators of dynamic transcription in neural/endocrine cells. *European Journal of Neuroscience*, **14**, 1-9.
- STELLFLUG, J.N. e BERARDINELLI, J.G., 2002. Ram mating behaviour after long-term selection for reproductive rate in Rambouillet ewes. *J Anim Sci*, **80**, 2588-2593.
- STELLFLUG, J.N., 2002. Influence of classification levels of ram sexual activity on spring breeding ewes. *Anim Reprod Sci*, **70**, 203-214.
- STICKER, L.S., THOMPSON Jr., D.L. e GENTRY, L.R., 2001. Pituitary hormone and insulin responses to infusion of amino acids and N-methyl-D,L-aspartate in horses. *J Anim Sci*, **79**, 735-744.
- SWEENEY, T., DONOVAN, A., ROCHE, J.F. e O'CALLAGHAN, D., 1997. Variation in the ability of a long day followed by a short day photoperiod signal to initiate reproductive activity in ewes at different times of the year. *J Reprod Fert*, **109**, 121-127.
- SWEENEY, T., KELLY, G. e O'CALLAGHAN, D., 1999. Seasonal variation in long-day stimulation of prolactin secretion in ewes. *Biol Reprod*, **60**, 128-133.

- TAHA, T.A., ABDEL-GAWAD, E.I. e AYOUB, M.A., 2000. Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions. 1. Semen characteristics and hormonal levels. *Anim Sci*, **71**, 317-324.
- TAKEKIDA, S., YAN, L., MAYWOOD, E.S., HASTINGS, M.H. e OKAMURA, H., 2000. Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *Period1* and *Period2* in the rat pineal gland. *European Journal of Neuroscience*, **12**, 4557-4561.
- TASKIRAN, D., TANYALCIN, T., SOZMEN, E.Y., PEKER, G.O., GULMEN, V., CAGLI, S., KANIT, L., TEKELI, G., BARCIN, E., ZILELI, M. e KUTAY, F.Z., 2000. The effects of melatonin on the antioxidant systems in experimental spinal injury. *Intern J Neuroscience*, **104**, 63-73.
- TEIXEIRA, A., DELFA, R. e COLOMER-ROCHER, F., 1989. Relationships between fat depots and body condition score or tail fatness in the rasa Aragonesa breed. *Anim Prod*, **49**, 275-280.
- THATCHER, W.W. e HANSEN, P.J., 1993. Environment and reproduction. In: Reproduction in domesticated animal. G.J. KING (Ed), World Animal Science B.9., Elsevier, Nova Iorque, EUA, **16**, 433-441.
- THIÉRY, J.-C. e MARTIN, G.B., 1991. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep: a review. *Reprod Fertil Dev*, **3**, 137-173.
- THIÉRY, J.-C., CHEMINEAU, P., HERNANDEZ, X., MIGAUD, M. e MALPAUX, B., 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Dom Anim Endocrinol*, **23**, 87-100.
- THIÉRY, J.-C., GAYRARD, V., Le CORRE, S., VIGUIE, C., MARTIN, G.B., CHEMINEAU, P. e MALPAUX, B., 1995. Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *J Reprod Fert*, **49** (Suppl), 285-296.

- THIMONIER, J., 1981. Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones. *J Reprod Fert*, **30** (Suppl), 33-45.
- THIMONIER, J., 1996. Photopériode et reproduction. *INRA Prod Anim*, **9** (1), 3-8.
- THOMAS, L., WALLACE, J.M., AITKEN, R.P., MERCER, J.G., TRAYHURN, P. e HOGGARD, N., 2001. Circulating leptin during ovine pregnancy in relation to maternal nutrition, body composition and pregnancy outcome. *J Endocrinol*, **169**, 465-476.
- THOMAS, M.G., GAZAL, O.S., WILLIAMS, G.L., STANKO, R.L. e KEISLER, D.H., 1999. Injection of neuropeptide Y into the third cerebroventricle differentially influences pituitary secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Dom Anim Endocrinol*, **16** (3), 159-169.
- THRUN, L.A. e MOENTER, S.M., 1995. Circannual alterations in the circadian rhythm of melatonin secretion. *J Biol Rhythms*, **10** (1), 42-54.
- THRUN, L.A., DAHL, G.E., EVANS, N.P. e KARSCH, F.J., 1996. Time-course of thyroid hormone involvement in the development of anestrus in the ewe. *Biol Reprod*, **55**, 833-837.
- THRUN, L.A., DAHL, G.E., EVANS, N.P. e KARSCH, F.J., 1997. Effect of thyroidectomy on maintenance of seasonal reproductive suppression in the ewe. *Biol Reprod*, **56**, 1035-1040.
- TILBROOK, A.J. e CAMERON, A.W.N., 1990. The contribution of the sexual behaviour of rams to successful mating of ewes under field conditions. In: Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and Consequences, OLDHAM, C.M., MARTIN, G.B. e PURVIS, I.W. (Eds), Universidade da Austrália Ocidental, Nedlands, Austrália, 143-160.
- TILBROOK, A.J. e CLARKE, I.J., 1995. Negative feedback regulation on the secretion and actions of GnRH in male ruminants. *J Reprod Fert*, **49** (Suppl), 297-306.

- TORTONESE, D.J., 1999. Interaction between hypothalamic dopaminergic and opiodergic systems in the photoperiodic regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology*, **140** (2), 750-757.
- TOSINI, G., 2000. Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals. *Chronobiology International*, **17** (5), 599-612.
- TRICOIRE, H., LOCATELLI, A., CHEMINEAU, P. e MALPAUX, B., 2002. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, **143** (1), 84-90.
- TRICOIRE, H., MØLLER, M., CHEMINEAU, P. e MALPAUX, B., 2003. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reproduction*, **61** (suppl), 311-321.
- TROADEC, J.-D., MARIEN, M., DARIOS, F., HARTMANN, A., RUBERG, M., COLPAERT, F. e MICHEL, P.P., 2001. Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J Neurochemistry*, **79**, 200-210.
- TUREK, F.W. e VAN CAUTER, E. 1994. Rhythms in reproduction. *In: The physiology of reproduction*, E. KNOBIL e J.D. NEILL (Eds), 2ª edição, Raven Press Ltd, Nova Iorque, EUA, 487-531.
- TUREK, F.W., 1988. Pharmacological manipulation of the mammalian circadian clock: implications for the control of season reproductive cycles. *Reprod Nutr Dévelop*, **28** (2B), 499-513.
- VIGUIÉ, C., PICARD, S., THIÉRY, J.-C. e MALPAUX, B., 1998. Blockade of tyrosine hydrolase activity in the median eminence partially reverses the long day-induced inhibition of pulsatile LH secretion in the ewe. *J Neuroendocrinol*, **10**, 551-558.
- VIJIL, E., 1989. Dependencia ambiental de la calidad seminal en el ganado ovino. *In: IV Simposium Internacional de Reprodução Animal*, Volume II, Lisboa, Portugal, 159-197.

- VIJIL, E.M., 1986. Influencia de los factores ambientales sobre la actividad reproductora del Morueco. *Ovino*, **9**, 83-94.
- VIJIL, E.M., GONZÁLEZ, C.A., RUIZ-POVEDA, J.L. e CIUDAD, C.C., 1987. Evaluación estacional del diámetro testicular en el ovino Karakul: repercusión sobre el comportamiento copulatorio y características seminales. *AYMA*, **XXVII**, 39-46.
- VINCENT, J.N., MCQUOWN, E.C. e NOTTER, D.R., 2000. Duration of the seasonal anestrus in sheep selected for fertility in a fall-lambing system, *J Anim Sci*, **78**, 1149-1154.
- VIVIEN-ROELS, B., PEVET, P., ZARAZAGA, L., MALPAUX, B. e CHEMINEAU, P., 1999. Daily and light-at-night induced variations of circulating 5-methoxytryptophol (5-ML) in ewes with respectively high and low nocturnal melatonin secretion. *J Pineal Research*, **27**, 230-236.
- WALKDEN-BROWN, S.W., MARTIN, G.B. e RESTALL, B.J., 1999. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J Reprod Fert*, **52** (Suppl), 243-257.
- WARREN, W.S. e CASSONE, V.M., 1995. The pineal gland: photoreception and coupling of behavioral, metabolic, and cardiovascular circadian outputs. *J Biol Rhythms*, **10** (1), 64-79.
- WEBSTER, J.R., SUTTIE, J.M., VEENVLIET, B.A., MANLEY, T.R. e LITTLEJOHN, R.P., 1991. Effect of melatonin implants on secretion of luteinizing hormone in intact and castrated rams. *J Reprod Fert*, **92**, 21-31.
- WEBSTER, J.R., SUTTIE, J.M., VEENVLIET, T.R., MANLEY, T.R. e LITTLEJOHN, R.P., 1991. Effect of melatonin implants on secretion of luteinizing hormone in intact and castrated rams. *J Reprod Fert*, **92**, 21-31.
- WEHR, T.A., 1997. Melatonin and seasonal rhythms. *J Biol Rhythms*, **12** (6), 518-527.

- WEHR, T.A., 2001. Photoperiodism in humans and other primates: evidence and implications. *J Biol Rhythms*, **16** (4), 348-364.
- WHITLEY, N.C., MSFADIN-BUFF, E.L. e KEISLER, D.H., 2000. Effect of insulin on feed intake and reproductive performance of well-nourished nulliparous ewes. *Theriogenology*, **54**, 1049-1054.
- WIESENBERG, I., MISSBACH, M. e CARLBERG, C., 1998. The potential role of transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restorative Neurology and Neuroscience*, **12**, 143-150.
- WILLIAMS, L.M. e HELLIWELL, R.J.A., 1993. Melatonin and seasonality in the sheep. *Anim Reprod Sci*, **33**, 159-182.
- WILLIAMS, L.M., DREW, J.E., BUNNETT, N.W., GRADY, E., BARRETT, P., ABRAMOVICH, D.R., MORRIS, A. e SLATER, D., 2001. Characterization of an antibody to the human melatonin MT1 receptor. *J Neuroendocrinol*, **13**, 94-101.
- WILLIAMS, L.M., LINCOLN, G.A., MERCER, J.G., BARRETT, P., MORGAN, P.J. e CLARKE, I.J., 1997. Melatonin receptors in the brain and pituitary gland of hypothalamo-pituitary disconnected Soay rams. *J Neuroendocrinol*, **9**, 639-643.
- WON, M.H., 2001. <http://www.hallym.ac.kr/~de1610/nana/chp10n.htm>
- WOOD, R.I. e FOSTER, D.L., 1992. Prenatal androgens and the timing of seasonal reproductive transitions in sheep. *Biol Reprod*, **47**, 389-396.
- WOOD, R.I., EBLING, F.J.P., I'ANSON, H., BUCHOLTZ, D.C., YELLON, S.M. e FOSTER, D.L., 1991. Prenatal androgens time neuroendocrine sexual maturation. *Endocrinology*, **128** (5), 2457-2468.
- WOODFILL, C.J.I., WAYNE, N.L., MOENTER, S.M. e KARSCH, F.J., 1994. Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. *Biol Reprod*, **50**, 965-976.

- WOOD-GUSH, D.G.M., 1983. Elements of ethology. A textbook for agricultural and veterinary students. Chapman and Hall, Londres, Reino Unido, 223 pp..
- XIONG, J.J., KARSCH, F.J. e LEHMAN, M.N., 1997. Evidence for seasonal plasticity in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in synaptic inputs onto GnRH neurons. *Endocrinology*, **138** (3), 1240-1250.
- XU, Z.Z., MCDONALD, M.F., MCCUTCHEON, S.N. e BLAIR, H.T., 1993. Testis size, gonadotrophin secretion and pituitary responsiveness to GnRH in Romney rams during the transition from the non-breeding to the breeding season. *Anim Reprod Sci*, **31**, 99-111.
- YATSUSHIRO, S., HAYASHI, M. e MORITA, M., 2000. Glutamate receptor subunit $\delta 2$ is highly expressed in a novel population of glial-like cells in rat pineal glands in culture. *Journal of Neurochemistry*, **75** (3), 1115-1122.
- YELLON, S.M. e FOSTER, D.L., 1986. Melatonin rhythms time photoperiod-induced puberty in the female lamb. *Endocrinology*, **119** (1), 44-49.
- YELLON, S.M., 1996a. 60-HZ magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm and photoperiod control of reproduction. *Am J Physiol*, 270 (5 Pt 1), E816-E821.
- YELLON, S.M., 1996b. Daily melatonin treatments regulate the circadian melatonin rhythm in the adult Djungarian hamster. *J Biol Rhythms*, **11** (1), 4-13.
- YIHUA, A., ENZHONG, L., XIANGZHEN, L., FUMING Y., FENGPING, H. e QINSHUN, D., 2000. Protective effect of melatonin on neural cells against cytotoxicity of oxyradicals. *Chinese Medical Sciences Journal*, **15** (1), 40-44.
- ZARAZAGA, L.A., MALPAUX, B., BODIN, L. e CHEMINEAU, P., 1998a. The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence. *Am J Physiol*, **274** (Endocrinol Metab 37), E607-E610.

ZARAZAGA, L.A., MALPAUX, B., BODIN, L. e CHEMINEAU, P., 1998b. Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. *Am J Physiol*, **274** (6 Pt 1), E1086-E1090.

ANEXOS

QUADRO I – Valores normalizados (médias dos anos de 1951 a 1980) da temperatura média do ar (T), insolação (I), humidade relativa do ar (HR) e precipitação total (R) na cidade de Bragança (COSTA, 2003; informação pessoal)

Meses	T (°C)	I (%)	HR (%)	R (mm)
Janeiro	4,5	38	85	105,4
Fevereiro	5,6	48	78	99,2
Março	7,9	50	71	81,5
Abril	10,1	58	66	54,5
Maio	13,6	62	64	53,0
Junho	17,5	69	60	41,4
Julho	20,7	83	52	15,6
Agosto	20,4	82	53	14,4
Setembro	17,7	66	60	32,9
Outubro	12,8	57	73	65,6
Novembro	7,8	50	79	87,1
Dezembro	4,7	38	85	90,5
<i>Ano</i>	<i>11,9</i>	<i>58</i>	<i>69</i>	<i>741,1</i>

QUADRO II – Variação mensal dos parâmetros seminais quantitativos estudados, por grupo, durante o período pré-tratamentos ($\bar{x} \pm sd$)

Mês	Volume seminal (ml)	Concentração espermática (espermatozóides/ml)	Concentração ejaculado (espermatozóides)
Grupo Testemunha			
Dezembro	1,3 ^a ± 0,5	4.050,0 x 10 ^{6a} ± 1.013,4 x 10 ⁶	4.737,7 x 10 ^{6a} ± 1.279,6 x 10 ⁶
Janeiro	1,2 ^a ± 0,2	4.167,7 x 10 ^{6a} ± 864,1 x 10 ⁶	4.899,7 x 10 ^{6a} ± 779,0 x 10 ⁶
Fevereiro	1,2 ^a ± 0,4	3.350,0 x 10 ^{6a} ± 649,8 x 10 ⁶	3.900,3 x 10 ^{6a} ± 1.498,6 x 10 ⁶
Março	1,1 ^a ± 0,2	3.182,8 x 10 ^{6a} ± 732,9 x 10 ⁶	3.496,4 x 10 ^{6a} ± 1.239,1 x 10 ⁶
Grupo Luz			
Dezembro	1,7 ^a ± 0,3	3.317,7 x 10 ^{6a} ± 553,9 x 10 ⁶	5.447,7 x 10 ^{6a} ± 750,0 x 10 ⁶
Janeiro	1,1 ^b ± 0,2	3.507,5 x 10 ^{6a} ± 299,4 x 10 ⁶	3.927,7 x 10 ^{6b} ± 834,3 x 10 ⁶
Fevereiro	1,3 ^a ± 0,4	3.617,7 x 10 ^{6a} ± 740,6 x 10 ⁶	4.369,3 x 10 ^{6a} ± 1.056,9 x 10 ⁶
Março	1,0 ^b ± 0,2	3.133,3 x 10 ^{6a} ± 370,1 x 10 ⁶	3.107,5 x 10 ^{6b} ± 968,3 x 10 ⁶
Grupo Melatonina			
Dezembro	1,7 ^a ± 0,4	3.483,3 x 10 ^{6a} ± 1.279,8 x 10 ⁶	5.908,3 x 10 ^{6a} ± 1.134,8 x 10 ⁶
Janeiro	1,4 ^a ± 0,3	3.517,6 x 10 ^{6a} ± 1.279,5 x 10 ⁶	5.005,0 x 10 ^{6a} ± 1.158,0 x 10 ⁶
Fevereiro	1,5 ^a ± 0,3	3.625,0 x 10 ^{6a} ± 1.279,9 x 10 ⁶	5.201,8 x 10 ^{6a} ± 824,4 x 10 ⁶
Março	1,4 ^a ± 0,3	3.233,3 x 10 ^{6a} ± 1.279,8 x 10 ⁶	4.524,2 x 10 ^{6a} ± 1.382,6 x 10 ⁶

a≠b, para P≤0,01 (entre meses, mesmo grupo, mesmo parâmetro).

QUADRO III – Variação mensal de alguns parâmetros seminais qualitativos estudados, por grupo, durante o período pré-tratamentos ($\bar{x} \pm sd$)

Mês	% espermatozóides vivos	% espermatozóides normais
Testemunha		
Dezembro	80,0 ^{a,b} ± 6,1	79,7 ^a ± 4,4
Janeiro	73,2 ^a ± 9,5	87,2 ^{a,b} ± 6,1
Fevereiro	85,1 ^b ± 4,8	89,5 ^{a,b} ± 5,6
Março	82,2 ^{a,b} ± 8,2	91,2 ^b ± 5,2
Luz		
Dezembro	74,1 ^a ± 4,3	79,2 ^a ± 9,3
Janeiro	75,2 ^a ± 5,0	82,1 ^{a,b} ± 6,3
Fevereiro	81,5 ^{a,b} ± 8,5	85,0 ^{a,b} ± 11,8
Março	84,6 ^b ± 5,4	91,8 ^b ± 4,9
Melatonina		
Dezembro	79,3 ^{a,b} ± 2,4	81,7 ^a ± 3,1
Janeiro	76,7 ^a ± 5,3	83,3 ^a ± 6,3
Fevereiro	83,6 ^{a,b} ± 5,8	89,1 ^{a,b} ± 6,4
Março	84,5 ^b ± 5,6	91,6 ^b ± 5,2

a≠b, para $P \leq 0,01$ (entre meses, mesmo grupo, mesmo parâmetro).

QUADRO IV – Variação mensal das motilidades massal e individual, depois de agrupar os ejaculados estudados em duas classes: não utilizáveis (< 4,0) e utilizáveis ($\geq 4,0$), por grupo, durante o período pré-tratamentos

Grupo	Mês	Motilidade massal		Motilidade individual	
		Não utilizáveis	Utilizáveis	Não utilizáveis	Utilizáveis
Testemunha	Dezembro	20,0% ^{a,x}	80,0% ^{a,x}	20,0% ^{a,x}	80,0% ^{a,x}
	Janeiro	0,0% ^{b,x}	100,0% ^{b,x}	0,0% ^{b,x}	100,0% ^{b,x}
	Fevereiro	0,0% ^{b,x}	100,0% ^{b,x}	0,0% ^{b,x}	100,0% ^{b,x}
	Março	8,3% ^{c,x}	91,7% ^{c,x}	8,3% ^{c,x}	91,7% ^{c,x}
	<i>Média</i>	5,6% ^x	94,4% ^x	5,6% ^x	94,4% ^x
Luz	Dezembro	20,0% ^{a,x}	80,0% ^{a,x}	20,0% ^{a,x}	80,0% ^{a,x}
	Janeiro	0,0% ^{b,x}	100,0% ^{b,x}	0,0% ^{b,x}	100,0% ^{b,x}
	Fevereiro	0,0% ^{b,x}	100,0% ^{b,x}	0,0% ^{b,x}	100,0% ^{b,x}
	Março	0,0% ^{b,z}	100,0% ^{b,z}	0,0% ^{b,z}	100,0% ^{b,z}
	<i>Média</i>	2,8% ^{xw}	97,2% ^{xw}	2,8% ^{xw}	97,2% ^{xw}
Melatonina	Dezembro	0,0% ^{a,y}	100,0% ^{a,y}	0,0% ^{a,y}	100,0% ^{a,y}
	Janeiro	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}
	Fevereiro	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}
	Março	0,0% ^{a,z}	100,0% ^{a,z}	0,0% ^{a,z}	100,0% ^{a,z}
	<i>Média</i>	0,0% ^w	100,0% ^w	0,0% ^w	100,0% ^w

a≠b, para $P \leq 0,001$; b≠c, para $P \leq 0,01$; a≠c, para $P \leq 0,05$ (entre meses, mesmo grupo, mesmo tipo motilidade)
x≠y, para $P \leq 0,001$; x≠z, para $P \leq 0,01$; x≠w, para $P \leq 0,05$ (entre grupos, mesma linha, mesmo tipo motilidade).

QUADRO V – Variação mensal dos parâmetros seminais quantitativos estudados, por grupo, durante o período de tratamentos ($\bar{x} \pm sd$)

Mês	Volume seminal (ml)	Concentração espermática (espermatozóides/ml)	Concentração ejaculado (espermatozóides)
Grupo Testemunha			
Março	$0,9^a \pm 0,3$	$3.040,1 \times 10^{6a} \pm 336,2 \times 10^6$	$2.830,0 \times 10^{6a} \pm 694,0 \times 10^6$
Abril	$1,0^a \pm 0,3$	$3.930,9 \times 10^{6a} \pm 955,7 \times 10^6$	$3.655,2 \times 10^{6a} \pm 1.108,5 \times 10^6$
Maio	$1,1^a \pm 0,4$	$2.810,0 \times 10^{6a} \pm 955,0 \times 10^6$	$3.282,1 \times 10^{6a} \pm 1.604,2 \times 10^6$
Junho	$1,0^a \pm 0,5$	$2.800,2 \times 10^{6a} \pm 1.344,7 \times 10^6$	$2.718,5 \times 10^{6a} \pm 1.642,4 \times 10^6$
Grupo Luz			
Março	$1,0^a \pm 0,3$	$3.266,7 \times 10^{6a} \pm 546,5 \times 10^6$	$3.418,3 \times 10^{6a} \pm 1.248,6 \times 10^6$
Abril	$1,0^a \pm 0,3$	$3.433,3 \times 10^{6a} \pm 1.248,5 \times 10^6$	$3.346,7 \times 10^{6a} \pm 1.252,4 \times 10^6$
Maio	$1,1^a \pm 0,3$	$2.941,7 \times 10^{6a} \pm 1.316,0 \times 10^6$	$3.118,3 \times 10^{6a} \pm 1.332,0 \times 10^6$
Junho	$1,1^a \pm 0,4$	$3.100,0 \times 10^{6a} \pm 1.351,1 \times 10^6$	$3.188,4 \times 10^{6a} \pm 1.245,1 \times 10^6$
Grupo Melatonina			
Março	$1,1^a \pm 0,2$	$3.150,0 \times 10^{6a} \pm 612,4 \times 10^6$	$3.643,3 \times 10^{6a} \pm 1.139,8 \times 10^6$
Abril	$1,1^a \pm 0,2$	$3.316,7 \times 10^{6a} \pm 871,6 \times 10^6$	$3.737,5 \times 10^{6a} \pm 1.158,0 \times 10^6$
Maio	$1,3^a \pm 0,5$	$2.966,7 \times 10^{6a} \pm 876,3 \times 10^6$	$3.665,0 \times 10^{6a} \pm 1.123,4 \times 10^6$
Junho	$1,4^a \pm 0,4$	$3.216,6 \times 10^{6a} \pm 823,2 \times 10^6$	$4.160,8 \times 10^{6a} \pm 775,6 \times 10^6$

a=a, para $P>0,05$ (entre meses, mesmo grupo, mesmo parâmetro).

QUADRO VI – Variação mensal de alguns parâmetros seminais qualitativos estudados, por grupo, durante o período de tratamentos ($\bar{x} \pm sd$)

Mês	% espermatozóides vivos	% espermatozóides normais
Testemunha		
Dezembro	79,7 ^a ± 4,4	80,0 ^a ± 6,1
Janeiro	87,2 ^a ± 6,1	73,2 ^a ± 9,5
Fevereiro	89,5 ^a ± 5,6	85,1 ^a ± 4,8
Março	82,2 ^a ± 8,2	91,2 ^a ± 5,2
Luz		
Dezembro	74,1 ^a ± 4,3	79,2 ^a ± 9,3
Janeiro	75,2 ^a ± 5,0	82,1 ^a ± 6,3
Fevereiro	81,5 ^a ± 8,5	85,0 ^a ± 11,8
Março	84,6 ^a ± 5,4	91,8 ^a ± 4,9
Melatonina		
Dezembro	79,3 ^a ± 2,4	81,7 ^a ± 3,1
Janeiro	76,7 ^a ± 5,3	83,3 ^a ± 6,3
Fevereiro	83,6 ^a ± 5,8	89,1 ^a ± 6,4
Março	84,5 ^a ± 5,6	91,6 ^a ± 5,2

a=a, para P>0,05 (entre meses, mesmo grupo, mesmo parâmetro).

QUADRO VII – Variação mensal das motilidades massal e individual, depois de agrupar os ejaculados estudados em duas classes: não utilizáveis (< 4,0) e utilizáveis ($\geq 4,0$), por grupo, durante o período de tratamentos

Grupo	Mês	Motilidade massal		Motilidade individual	
		Não utilizáveis	Utilizáveis	Não utilizáveis	Utilizáveis
Testemunha	Março	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}
	Abril	20,0% ^{b,x}	80,0% ^{b,x}	20,0% ^{b,x}	80,0% ^{b,x}
	Maio	10,0% ^{c,x}	90,0% ^{c,x}	20,0% ^{b,x}	80,0% ^{b,x}
	Junho	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}	20,0% ^{b,x}	80,0% ^{b,x}
	<i>Média</i>	8,6% ^x	91,4% ^x	17,1% ^x	82,9% ^x
Luz	Março	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}
	Abril	8,3% ^{c,y}	91,7% ^{c,y}	8,3% ^{c,y}	91,7% ^{c,y}
	Maio	0,0% ^{a,z}	100,0% ^{a,z}	0,0% ^{a,z}	100,0% ^{a,z}
	Junho	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}
	<i>Média</i>	2,4% ^y	97,6% ^y	2,4% ^w	97,6% ^w
Melatonina	Março	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}
	Abril	8,3% ^{c,y}	91,7% ^{c,y}	8,3% ^{c,y}	91,7% ^{c,y}
	Maio	8,3% ^{c,x}	91,7% ^x	8,3% ^{c,x}	91,7% ^x
	Junho	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}	0,0% ^{a,x}	100,0% ^{a,x}
	<i>Média</i>	4,8% ^{xy}	95,2% ^{xy}	4,8% ^{zw}	95,2% ^{zw}

a≠b, para P≤0,001; a≠c, para P≤0,01; b≠c, para P≤0,05 (entre meses, mesmo grupo, mesmo tipo motilidade)
x≠w, para P≤0,001; x≠z, para P≤0,01; x≠y, para P≤0,05 (entre grupos, mesma linha, mesmo tipo motilidade).

QUADRO VIII – Variação mensal do valor médio dos vários parâmetros comportamentais estudados entre os carneiros do grupo Testemunha, durante o período pré-tratamentos ($\bar{x} \pm sd$; c.v.)

Parâmetros	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março
Número total de cobrições	1,8 ^a ± 1,2 (63,8%)	1,8 ^a ± 1,0 (55,2%)	2,1 ^a ± 0,8 (38,1%)	1,5 ^a ± 0,7 (47,1%)
Número de montas antes da 1 ^a cobrição	6,7 ^a ± 8,4 (126,5%)	2,2 ^a ± 3,5 (154,1%)	0,6 ^b ± 1,0 (170,8%)	0,7 ^b ± 1,1 (167,7%)
Tempo de reacção (segundos)	119,6 ^a ± 182,8 (152,9%)	55,5 ^a ± 46,5 (83,8%)	48,3 ^a ± 36,9 (76,4%)	76,0 ^a ± 135,4 (178,2%)
Número de montas antes da 2 ^a cobrição	6,5 ^a ± 11,7 (180,1%)	0,3 ^a ± 0,8 (264,6%)	1,5 ^a ± 3,1 (206,7%)	1,0 ^a ± 0,8 (81,6%)
Intervalo 1-2 ^a cobrição (segundos)	172,3 ^a ± 7,5 (4,4%)	262,1 ^a ± 102,6 (39,1%)	260,8 ^a ± 125,5 (48,1%)	288,8 ^a ± 87,7 (30,4%)
Número de montas antes da 3 ^a cobrição	0	0	0	-
Intervalo 2-3 ^a cobrição (segundos)	529,5 ^a ± 44,6 (8,4%)	478,0 ^a ± 164,0 (34,3%)	315,5 ^a ± 36,1 (11,4%)	-
Número de montas antes da 4 ^a cobrição	-	-	-	-
Intervalo 3-4 ^a cobrição (segundos)	-	-	-	-
Número de montas antes da 5 ^a cobrição	-	-	-	-
Intervalo 4-5 ^a cobrição (segundos)	-	-	-	-

a≠b, para $P \leq 0,01$ (entre meses, mesmo parâmetro).

QUADRO IX – Variação mensal do valor médio dos vários parâmetros comportamentais estudados entre os carneiros do grupo Luz, durante o período pré-tratamentos ($\bar{x} \pm \text{sd}$; c.v.)

Parâmetros	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março
Número total de cobrições	2,7 ^a ± 1,0 (38,7%)	2,3 ^a ± 1,7 (71,6%)	2,0 ^a ± 1,1 (56,4%)	1,5 ^a ± 0,9 (60,3%)
Número de montas antes da 1 ^a cobrição	5,0 ^a ± 10,8 (216,1%)	6,7 ^a ± 8,7 (130,3%)	0,7 ^a ± 1,5 (204,8%)	2,2 ^a ± 5,3 (243,2%)
Tempo de reacção (segundos)	119,8 ^a ± 203,5 (169,8%)	70,1 ^a ± 62,2 (88,7%)	47,8 ^a ± 66,6 (139,2%)	27,4 ^a ± 14,8 (54,0%)
Número de montas antes da 2 ^a cobrição	2,2 ^a ± 4,4 (199,2%)	1,1 ^a ± 2,4 (214,8%)	0,6 ^a ± 0,9 (146,6%)	3,1 ^a ± 7,3 (232,3%)
Intervalo 1-2 ^a cobrição (segundos)	128,0 ^a ± 48,1 (37,6%)	177,1 ^a ± 123,6 (69,8%)	247,3 ^a ± 190,6 (77,1%)	219,3 ^a ± 104,9 (47,8%)
Número de montas antes da 3 ^a cobrição	4,4 ^a ± 8,7 (198,5%)	1,6 ^a ± 3,6 (223,6%)	0,8 ^a ± 0,5 (66,7%)	4,5 ^a ± 6,4 (141,4%)
Intervalo 2-3 ^a cobrição (segundos)	-	246,3 ^a ± 188,7 (76,6%)	435,0 ^a ± 142,3 (32,7%)	359,0
Número de montas antes da 4 ^a cobrição	-	0	1	-
Intervalo 3-4 ^a cobrição (segundos)	-	334,7 ± 130,8 (39,1%)	584	-
Número de montas antes da 5 ^a cobrição	-	0	-	-
Intervalo 4-5 ^a cobrição (segundos)	-	433,0	-	-

a=a, para P>0,05 (entre meses, mesmo parâmetro).

QUADRO X – Variação mensal do valor médio dos vários parâmetros comportamentais estudados entre os carneiros do grupo Melatonina, durante o período pré-tratamentos ($\bar{x} \pm \text{sd}$; c.v.)

Parâmetros	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março
Número total de cobrições	2,0 ^a ± 0,9 (44,7%)	1,7 ^a ± 0,9 (53,3%)	1,8 ^a ± 0,6 (35,5%)	1,8 ^a ± 0,9 (49,5%)
Número de montas antes da 1 ^a cobrição	1,5 ^a ± 3,7 (244,9%)	3,8 ^a ± 6,6 (176,2%)	2,6 ^a ± 5,3 (206,5%)	2,2 ^a ± 4,5 (206,2%)
Tempo de reacção (segundos)	69,0 ^a ± 78,6 (113,8%)	77,5 ^a ± 54,1 (69,8%)	99,1 ^a ± 146,9 (148,3%)	46,5 ^a ± 25,8 (55,5%)
Número de montas antes da 2 ^a cobrição	3,0 ^a ± 5,7 (188,6%)	2,4 ^a ± 4,5 (183,9%)	0,7 ^a ± 1,9 (269,8%)	0,7 ^a ± 1,3 (178,8%)
Intervalo 1-2 ^a cobrição (segundos)	188,0 ^a ± 120,2 (63,9%)	264,6 ^a ± 124,8 (47,2%)	330,5 ^a ± 103,8 (31,4%)	349,8 ^a ± 143,0 (40,9%)
Número de montas antes da 3 ^a cobrição	0	0,5 ^a ± 0,7 (141,4%)	-	1,3 ^a ± 0,6 (43,3%)
Intervalo 2-3 ^a cobrição (segundos)	277,5 ^a ± 87,6 (31,3%)	393,0 ^a ± 183,8 (46,8%)	-	470,0
Número de montas antes da 4 ^a cobrição	-	-	-	-
Intervalo 3-4 ^a cobrição (segundos)	-	-	-	-
Número de montas antes da 5 ^a cobrição	-	-	-	-
Intervalo 4-5 ^a cobrição (segundos)	-	-	-	-

a=a, para P>0,05 (entre meses, mesmo parâmetro).

QUADRO XI – Variação mensal do valor médio dos vários parâmetros comportamentais estudados entre os carneiros do grupo Testemunha, durante o período de tratamentos ($\bar{x} \pm sd$; c.v.)

Parâmetros	Março	Abril	Maio	Junho
Número total de cobrições	1,8 ^a ± 0,4 (24,8%)	1,7 ^a ± 0,9 (55,8%)	1,8 ^a ± 0,8 (43,8%)	2,0 ^a ± 0,9 (47,1%)
Número de montas antes da 1 ^a cobrição	0	0,4 ^a ± 1,0 (241,5%)	0,7 ^a ± 0,4 (198,4%)	0,7 ^a ± 1,6 (223,9%)
Tempo de reacção (segundos)	27,4 ^a ± 22,0 (80,2%)	28,1 ^a ± 16,9 (60,2%)	31,7 ^a ± 21,0 (66,4%)	60,1 ^a ± 111,3 (195,2%)
Número de montas antes da 2 ^a cobrição	1,0 ^a ± 0,7 (70,7%)	0	0,4 ^a ± 0,5 (138,0%)	0,4 ^a ± 0,7 (198,4%)
Intervalo 1-2 ^a cobrição (segundos)	269,5 ^a ± 79,7 (29,6%)	254,7 ^a ± 180,4 (70,8%)	260,2 ^a ± 96,5 (37,1%)	204,8 ^a ± 142,5 (69,6%)
Número de montas antes da 3 ^a cobrição	-	0	0	0,3 ± 0,5 (200,0%)
Intervalo 2-3 ^a cobrição (segundos)	-	336,0 ^a ± 101,8 (30,3%)	466,0	484,0 ^a ± 48,1 (9,9%)
Número de montas antes da 4 ^a cobrição	-	-	-	-
Intervalo 3-4 ^a cobrição (segundos)	-	-	-	-
Número de montas antes da 5 ^a cobrição	-	-	-	-
Intervalo 4-5 ^a cobrição (segundos)	-	-	-	-

a=a, para P>0,05 (entre meses, mesmo parâmetro).

QUADRO XII – Variação mensal do valor médio dos vários parâmetros comportamentais estudados entre os carneiros do grupo Luz, durante o período de tratamentos ($\bar{x} \pm \text{sd}$; c.v.)

Parâmetros	Março	Abril	Maio	Junho
Número total de cobrições	1,3 ^a ± 1,2 (90,8%)	1,5 ^a ± 1,1 (72,5%)	2,2 ^a ± 1,2 (55,1%)	2,5 ^a ± 0,9 (36,2%)
Número de montas antes da 1 ^a cobrição	4,0 ^a ± 7,9 (196,9%)	1,6 ^a ± 2,2 (135,7%)	3,1 ^a ± 5,2 (167,4%)	0,7 ^a ± 0,8 (116,8%)
Tempo de reacção (segundos)	19,5 ^a ± 13,2 (67,6%)	44,4 ^a ± 56,0 (126,2%)	102,7 ^a ± 165,0 (160,8%)	24,4 ^a ± 15,0 (61,4%)
Número de montas antes da 2 ^a cobrição	0,7 ^a ± 1,2 (173,2%)	0,9 ^a ± 1,2 (141,7%)	1,3 ^a ± 1,6 (124,7%)	0,8 ^a ± 2,0 (239,1%)
Intervalo 1-2 ^a cobrição (segundos)	175,0 ^a ± 77,6 (44,3%)	153,3 ^a ± 56,3 (36,7%)	119,1 ^a ± 68,5 (57,5%)	122,8 ^a ± 92,3 (75,2%)
Número de montas antes da 3 ^a cobrição	0	1	0,6 ± 0,9 (149,1%)	0
Intervalo 2-3 ^a cobrição (segundos)	359,0	192,0	290,0 ^a ± 108,6 (37,5%)	199,6 ^a ± 109,9 (55,1%)
Número de montas antes da 4 ^a cobrição	-	0	0	2,5 ± 3,5 (141,4%)
Intervalo 3-4 ^a cobrição (segundos)	-	552,0	491,0	351,5 ± 123,7 (35,2%)
Número de montas antes da 5 ^a cobrição	-	-	-	-
Intervalo 4-5 ^a cobrição (segundos)	-	-	-	-

a=a, para P>0,05 (entre meses, mesmo parâmetro).

QUADRO XIII – Variação mensal do valor médio dos vários parâmetros comportamentais estudados entre os carneiros do grupo Melatonina, durante o período de tratamentos ($\bar{x} \pm \text{sd}$; c.v.)

Parâmetros	Março	Abril	Maio	Junho
Número total de cobrições	2,2 ^a ± 0,4 (18,8%)	1,8 ^a ± 0,4 (53,3%)	2,1 ^a ± 0,8 (38,1%)	2,3 ^a ± 1,0 (42,9%)
Número de montas antes da 1 ^a cobrição	1,0 ^a ± 0,9 (89,4%)	1,7 ^a ± 1,2 (73,9%)	1,0 ^a ± 1,0 (206,5%)	2,3 ^a ± 3,2 (142,0%)
Tempo de reacção (segundos)	52,7 ^a ± 24,6 (46,8%)	57,2 ^a ± 21,9 (38,2%)	34,3 ^a ± 19,8 (57,7%)	65,1 ^a ± 59,9 (92,0%)
Número de montas antes da 2 ^a cobrição	0,3 ^a ± 0,5 (154,9%)	0,9 ^a ± 1,1 (183,9%)	0,7 ^a ± 0,7 (106,1%)	0,4 ^a ± 0,7 (174,8%)
Intervalo 1-2 ^a cobrição (segundos)	387,7 ^a ± 133,0 (34,3%)	407,4 ^a ± 117,3 (28,8%)	297,0 ^a ± 162,0 (54,6%)	233,7 ^a ± 144,1 (61,7%)
Número de montas antes da 3 ^a cobrição	1,3 ^a ± 0,6 (43,3%)	-	0,3 ^a ± 0,5 (200,0%)	0,8 ^a ± 1,1 (136,9%)
Intervalo 2-3 ^a cobrição (segundos)	470,0	-	418,8 ^a ± 117,1 (28,0%)	395,8 ^a ± 121,4 (30,7%)
Número de montas antes da 4 ^a cobrição	-	-	-	-
Intervalo 3-4 ^a cobrição (segundos)	-	-	-	-
Número de montas antes da 5 ^a cobrição	-	-	-	-
Intervalo 4-5 ^a cobrição (segundos)	-	-	-	-

a=a, para P>0,05 (entre meses, mesmo parâmetro).