

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AYA SASA

Perfis sazonais das concentrações plasmáticas
de progesterona, prolactina e melatonina de
ovelhas criadas em baixas latitudes

Pirassununga

2006

AYA SASA

Perfis sazonais das concentrações plasmáticas
de progesterona, prolactina e melatonina de
ovelhas criadas em baixas latitudes

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Lia de Alencar Coelho

Pirassununga

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

S252p	<p>Sasa, Aya</p> <p>Perfis sazonais das concentrações plasmáticas de progesterona, prolactina e melatonina de ovelhas criadas em baixas latitudes / Aya Sasa – Pirassununga, 2006.</p> <p>50 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.</p> <p>Departamento de Zootecnia.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Lia de Alencar Coelho.</p> <p>Unitermos: 1. Atividade ovulatória 2. Fotoperíodo natural 3. Romney Marsh 4. Santa Inês I. Título.</p>
-------	---

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	08
2.1. Objetivos gerais.....	08
2.2. Objetivos específicos.....	08
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	09
3.1. Local e período de realização do experimento	09
3.2. Animais e Manejo.....	09
3.3. Colheita de sangue para determinação das concentrações plasmáticas hormonais.....	10
3.3.1. Progesterona	10
3.3.2. Prolactina e Melatonina	10
3.4. Dosagens hormonais	11
3.4.1. Progesterona	11
3.4.2. Melatonina	12
3.4.3. Prolactina	13
3.5. Avaliação da atividade ovulatória	13
3.6. Determinação da duração da secreção noturna de melatonina	14
3.7. Delineamento experimental e análise estatística	14
4. RESULTADOS	17
4.1. Progesterona	17
4.1.1. Concentrações plasmáticas	18
4.1.2. Avaliação da atividade ovariana	18
4.2. Melatonina	25
4.2.1. Concentrações plasmáticas	25
4.2.2. Duração da secreção noturna de melatonina	29
4.3. Prolactina	30
4.3.1. Concentrações plasmáticas	30
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos ensaios de radioimunoensaio (RIE) para determinação das concentrações plasmáticas de progesterona	12
Tabela 2	Características dos ensaios de radioimunoensaio (RIE) para determinação das concentrações plasmáticas de melatonina	12
Tabela 3	Resultado da análise estatística referente às concentrações plasmáticas de progesterona de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh criadas em baixas latitudes no hemisfério Sul	17
Tabela 4	Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de progesterona de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh criadas em baixas latitudes no Hemisfério Sul	18
Tabela 5	Duração média (dias) do período de atividade ovariana em ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh observadas no período de setembro de 2002 a agosto de 2003	18
Tabela 6	Resultado das análises estatísticas referentes ao número de ovulações ocorridos por mês (análise I) ou por estação (análise II) de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh durante o período de setembro de 2002 a agosto de 2003	23
Tabela 7	Médias \pm erros padrão do número de ovulações por fêmea por mês de ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) no período de setembro de 2002 a agosto de 2003	24
Tabela 8	Médias \pm erros padrão do número de ovulações por fêmea por estação de ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) no período de setembro de 2002 a agosto de 2003	25
Tabela 9	Resultados da análise estatística referente às concentrações plasmáticas de melatonina de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh	25
Tabela 10	Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de melatonina de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh, nos solstícios de verão e inverno, e equinócios de primavera e outono.....	26

Tabela 11	Resultados da análise estatística referente à duração da secreção noturna de melatonina de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh nas quatro estações do ano	29
Tabela 12	Médias \pm erros padrão da duração da secreção noturna de melatonina de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh criadas em baixas latitudes no Hemisfério Sul	30
Tabela 13	Resultados da análise estatística referente às concentrações plasmáticas de prolactina de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh	31
Tabela 14	Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh criadas em baixas latitudes no Hemisfério Sul, segundo as estações avaliadas.....	32
Tabela 15	Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ovelha das raças Santa Inês e Romney Marsh nas quatro estações do ano, de acordo com os horários de colheita	33
Tabela 16	Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh, nos solstícios de verão e inverno, e equinócios de primavera e outono	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Concentrações plasmáticas de progesterona de ovelhas Santa Inês no período de setembro de 2002 a agosto de 2003	20
Figura 2	Concentrações plasmáticas de progesterona de ovelhas Romney Marsh no período de setembro de 2002 a agosto de 2003	21
Figura 3	Incidência mensal de ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) em atividade ovulatória no período de setembro de 2002 a agosto de 2003.....	22
Figura 4	Incidência mensal de ovulações das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) durante o período de setembro de 2002 a agosto de 2003	22
Figura 5	Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de melatonina de ovelhas (n=20) das raças Santa Inês e Romney Marsh, no equinócio de primavera, solstício de verão, equinócio de outono e solstício de inverno	28
Figura 6	Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina em ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10), nas quatro estações do ano	33
Figura 7	Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina em ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) no equinócio de primavera, solstício de verão, equinócio de outono e solstício de inverno	35

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade ovulatória ao longo do ano, as concentrações plasmáticas de melatonina e prolactina no período de 24 horas nos solstícios e equinócios de ovelhas lanadas Romney Marsh (10) e deslanadas Santa Inês (10) mantidas sob fotoperíodo natural em baixas latitudes no hemisfério Sul. Para o monitoramento da atividade ovulatória foram colhidas semanalmente sangue da veia jugular das fêmeas durante o período de um ano para determinação das concentrações plasmáticas de progesterona. Para a determinação das concentrações plasmáticas de prolactina e melatonina, foram realizadas colheitas de sangue a cada duas horas durante 24 horas nos dois solstícios e dois equinócios. As ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh, apresentaram comportamento da atividade ovariana distintos, ou seja, as fêmeas lanadas foram estacionais, enquanto que as fêmeas deslanadas apresentaram atividade ovulatória o ano todo. O ciclo circadiano das concentrações plasmáticas de melatonina de ovelhas Romney Marsh e deslanadas Santa Inês apresentou um padrão sazonal idêntico, mas não apresentou um ritmo circannual. A duração da secreção noturna de melatonina acompanhou a duração do escotoperíodo de cada estação do ano. O perfil plasmático de prolactina de ovelhas Romney Marsh foi mais elevado que ovelhas Santa Inês em todas as estações, mas o padrão sazonal foi idêntico. As concentrações plasmáticas foram mais elevadas na primavera e no verão que no outono e inverno.

Palavras chave: atividade ovulatória, fotoperíodo natural, Romney Marsh, Santa Inês

ABSTRACT

This study evaluated the ovulatory activity throughout the year, plasma melatonin and prolactin concentrations on 24 hours during solstices and equinoxes on wool (Romney Marsh - 10) and hair (Santa Inês - 10) ewes kept under natural photoperiod and lower latitudes in the southern hemisphere. To monitor the ovulatory activity, blood samples were collected weekly from the jugular vein throughout the year to determine the plasma progesterone concentrations. To determine the plasma melatonin and prolactin concentrations blood samples were collected each two hours during 24 hours on the solstices and equinoxes. Santa Inês and Romney Marsh females showed different ovulatory activity. Wool ewes showed a strong seasonality, and hair ewes were in ovulatory activity all the year. The circadian cycle of plasma melatonin concentrations from Romney Marsh and Santa Inês females showed the same seasonal pattern, and did not showed circannual pattern. The duration of nocturnal secretion plasma melatonin was the same of scotoperiod duration on each season of the year. The plasma prolactin profile from Romney Marsh ewes were higher than Santa Inês ewes in all seasons, but the seasonal pattern was identical. Plasma concentrations were higher in spring and summer than autumn and winter.

Key words: ovulatory activity, natural photoperiod, Romney Marsh, Santa Inês

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos oriundos de climas frios e temperados utilizam o ciclo anual do fotoperíodo (horas luz/dia) para determinar mudanças sazonais na atividade reprodutiva. Estes animais apresentam uma estação reprodutiva bem definida durante o ano, a qual, via de regra, estende-se desde o início do verão até o final do outono, sendo considerados esses animais como poliéstricos estacionais. Em ambos os hemisférios, essa espécie inicia a estação reprodutiva à medida que a luminosidade diária diminui, obedecendo ao fotoperíodo decrescente (GOLDMAN, 1999).

A resposta da atividade reprodutiva ao fotoperíodo é também dependente da latitude. Em latitudes mais elevadas a estacionalidade reprodutiva está intimamente relacionada com o fotoperíodo, enquanto que em baixas latitudes esta relação é menos pronunciada (HAFEZ, 1952). Em regiões tropicais, próximos a linha do Equador, onde não existe variação da luminosidade diária ao longo do ano, existe uma tendência das raças nativas apresentarem-se como poliéstricas não estacionais, ou seja, os ciclos estrais ocorrem o ano todo (FIGUEIREDO et al., 1980; GALINA et al., 1996). Nesse caso, a estacionalidade da atividade reprodutiva está condicionada a outros fatores mais importantes do que o fotoperíodo, tais como a temperatura, a raça e a nutrição (SILVA et al., 1987).

Contudo, o ciclo de reprodução sazonal da ovelha não é controlado diretamente pelo fotoperíodo, ou seja, esse ciclo é controlado por um ritmo circanual endógeno o qual é sincronizado pelo fotoperíodo (MALPAUX et al., 1989) através de mudanças na secreção diária de melatonina (BARRELL et al., 2000). A glândula pineal transforma a mensagem fotoperiódica em mensagem química (ARENDRT et al., 1987; ARENDRT, 1995), na forma de melatonina, sendo a

sua secreção limitada à fase escura do dia (escotoperíodo) e, na ovelha, a duração dessa secreção corresponde ao comprimento da noite (ARENDDT, 1995). A modificação do padrão secretório da melatonina em respostas às mudanças do comprimento do dia transmite a informação fotoperiódica ao eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal e, regiões do hipotálamo parecem ser o local alvo dos efeitos sazonais da melatonina por modificar a secreção pulsátil do hormônio liberador de LH (ARENDDT, 1995; MALPAUX et al., 1997).

No Brasil as características da atividade cíclica reprodutiva das ovelhas variam consideravelmente dependendo da região. Na região Nordeste, onde predomina as raças deslanadas, as fêmeas apresentam comportamento de estro ao longo do ano (FIGUEIREDO et al., 1980; SILVA et al., 1987) enquanto que, na região Sul, predomina as raças lanadas, as quais apresentam um grau mais acentuado de estacionalidade na atividade reprodutiva (RIBEIRO et al., 1996; SILVA e FIGUEIRÓ, 1980). Na Região Sudeste, onde o rebanho ovino é constituído tanto de raças lanadas como de raças deslanadas, já é possível observar uma certa estacionalidade na atividade reprodutiva nas ovelhas lanadas (RODA et al., 1993), mas ainda não se sabe categoricamente quais os fatores determinantes da mesma. Adicionalmente, as particularidades da atividade reprodutiva de ovelhas deslanadas criadas nesta região ainda não são totalmente conhecidas.

Dessa forma, os trabalhos realizados na cidade de Pirassununga-SP (região Sudeste), que estudaram a atividade cíclica reprodutiva, ao longo do ano, de fêmeas das raças Suffolk, Romney Marsh (raças lanadas) e Santa Inês (raça deslanada), demonstraram diferenças consideráveis na incidência de estros entre raças lanadas e deslanadas (SASA et al., 2001a; SASA et al., 2001b; SASA et al., 2002), além de ser extremamente variável entre os meses e as estações do ano

(COELHO, 2001). A incidência mensal e sazonal de estros clínicos (aqueles detectados pelos machos vasectomizados) revelou que a maioria dos estros observados nas fêmeas das raças Romney Marsh e Suffolk se concentraram durante o outono e inverno enquanto que nas fêmeas da raça Santa Inês o percentual de estros foi distribuído eqüitativamente ao longo do ano (SASA et al., 2001a; SASA et al., 2002). Nas fêmeas Romney Marsh e Suffolk, durante a primavera e verão, verificou-se uma redução na ocorrência de estros clínicos por fêmea, até mesmo a inexistência deles (COELHO, 2001; SASA et al., 2001a). Em suma, esses resultados evidenciaram que fêmeas ovinas, lanadas e deslanadas, criadas no Estado de São Paulo (21°59Sul) sob fotoperíodo natural (com variação de 10,5 a 13,5 horas ao longo do ano), apresentaram comportamento reprodutivo distinto. Assim, nesta região existe um indicativo de que as fêmeas lanadas (Romney Marsh e Suffolk) possam ser classificadas como estacionais enquanto que as fêmeas deslanadas (Santa Inês) como não estacionais, o que tornam fêmeas dessas raças ótimos modelos de animais estacionais e não estacionais.

Quanto ao padrão de secreção de melatonina, em estudos também desenvolvidos em Pirassununga-SP (COELHO, 2001), ficou evidente que as concentrações plasmáticas de melatonina (pg/mL) em fêmeas Santa Inês apresentaram valores elevados durante o outono e inverno e baixos durante a primavera e verão. Essa secreção esteve relacionada com a fase escura do dia, mas não com a incidência de estros (RODRIGUES et al., 2001). As fêmeas Romney Marsh e Suffolk também apresentaram variações sazonais na secreção de melatonina da mesma magnitude. Entretanto, essas concentrações estiveram relacionadas com ambos: a duração da fase escura do dia e a incidência de estros (COELHO et al., 2002). Rodrigues et al. (2002), estudando a duração da secreção noturna de melatonina (horas) em fêmeas Santa Inês, Romney Marsh e

Suffolk, observaram que as fêmeas das três raças apresentaram o mesmo padrão de secreção (mesma duração) com variações sazonais, ou seja, durante o outono e inverno (17,18 h e 16,46 h) essas durações foram maiores que na primavera (12,65 h) e verão (12,93 h). Um aspecto intrigante observado nesses estudos (COELHO, 2001; RODRIGUES, 2001 RODRIGUES et al., 2002) foi a evidência de que a duração da secreção de melatonina foi extremamente superior à duração do escotoperíodo da região, resultados que não estão de acordo com aqueles obtidos em outras pesquisas realizadas em regiões temperadas cuja duração da secreção noturna de melatonina acompanhou a duração do escotoperíodo (ARENDETT, 1995; GUERIN et al., 2000). Essa discrepância se deve principalmente ao fato de que nos estudos realizados na região Sudeste do Brasil a duração da secreção de melatonina foi calculada com base somente nas concentrações plasmáticas de melatonina obtidas nos horários de final (17:00, 19:00 e 21:00 h) e de início (4:00, 6:00 e 8:00 h) do dia enquanto que nos outros estudos essa duração é calculada com base em colheitas de amostras de sangue realizadas a cada hora durante vinte quatro horas o que pode fornecer uma informação mais confiável dessa variável.

Vários trabalhos têm demonstrado que, assim como a melatonina, a prolactina, hormônio secretado pela hipófise anterior, apresenta um modelo de secreção endógena e rítmica modulado pelo fotoperíodo, já que mudanças sazonais nas concentrações plasmáticas desse hormônio têm sido associadas a mudanças no comprimento do dia (THIMONIER et al., 1978), com níveis elevados e baixos durante o verão (dias longos) e inverno (dias curtos), respectivamente (PELLETIER, 1973; SANTIAGO-MORENO et al., 2000). A regulação desse ritmo sazonal está sob influência da glândula pineal, através da secreção de melatonina (MISTZAL et al., 1994; LINCOLN e TORTONESE, 1995), a qual exerce um efeito

supressor na secreção de prolactina sendo tal efeito causado por ação direta na hipófise (LINCOLN e CLARKE, 1994).

Outros trabalhos ainda têm sugerido que modificações no perfil plasmático de prolactina em função do fotoperíodo podem ter uma participação no controle fotoperiódico da reprodução sazonal de ovinos (LINCOLN et al., 1978; WALTON et al., 1977). Também existem evidências da influência genética nas concentrações plasmáticas de prolactina durante o período diurno - entre machos selvagens (Mouflon) e várias raças de ovinos domésticos (LINCOLN, 1990) – e o período noturno - ovelhas domésticas com uma reprodução mais contínua (Manchega) e ovelhas selvagens (Mouflon) com uma reprodução mais estacional (SANTIÁGO-MORENO et al., 2000; SANTIÁGO-MORENO et al., 2005). Tais resultados têm mostrando que a seleção de animais, desde a domesticação, tem propiciado um modelo de reprodução menos estacional acompanhado por variações no circanual plasmático da prolactina.

Contudo, pesquisas têm demonstrado que mudanças nos níveis da prolactina parecem não dirigir a reprodução sazonal em animais estacionais com diferentes graus de estacionalidade reprodutiva (WORTHY e HARESIGN, 1983; WORTHY et al., 1985). O início da estação reprodutiva de animais, em anestro sazonal, parece ser independente da diminuição das concentrações plasmáticas de prolactina, uma vez que, com a diminuição das horas luz do dia também há uma diminuição dos níveis plasmáticos de prolactina, pois a estação reprodutiva em ovinos tem iniciado mesmo com elevadas concentrações (WORTHY e HARESIGN, 1983; WORTHY et al., 1985;). Esses estudos têm sugerido que a prolactina não é inibitória a função ovariana e que este hormônio não exerce papel fundamental na regulação da atividade reprodutiva sazonal em ovelhas. De acordo com Sweeney et al. (1999), variações das concentrações plasmáticas de

prolactina parece ser mais um sinal de período de atividade reprodutiva (baixos níveis) ou período de anestro (altos níveis), do que a causa da estacionalidade reprodutiva.

Apesar de existir alguns estudos que descrevem os perfis plasmáticos de prolactina (NOTTER e CHEMINEAU, 2001; SANTIAGO-MORENO et al, 2000; SWEENEY et al., 1999) tentando-os correlacionar com a secreção de melatonina e controle fotoperiódico da reprodução, a maioria deles foram realizados em animais estacionais sob fotoperíodo artificial com dezesseis horas de luz e oito horas de escuro no solstício de verão e vice-versa no solstício de inverno.

No Sudeste do Brasil, a variação entre o dia mais longo (13,5 horas) e o dia mais curto (10,5 horas) do ano é apenas de três horas (COELHO, 2001; RODRIGUES, 2001), e nenhuma pesquisa foi desenvolvida com o intuito de estudar o perfil plasmático de prolactina de ovelhas com diferentes graus de estacionalidade reprodutiva criadas em regiões subtropicais, onde a variação fotoperiódica é pequena e nem estudar o perfil sazonal do ciclo circadiano das concentrações plasmáticas de melatonina. Em suma, os resultados obtidos pelo nosso grupo de trabalho demonstraram que o padrão anual da secreção de melatonina de fêmeas deslanadas (Santa Inês) e lanadas (Romney Marsh e Suffolk) criadas na região Sudeste do Brasil sob fotoperíodo natural é idêntico ao padrão observado em fêmeas ovinas mantidas em fotoperíodo, natural ou artificial, criadas em regiões temperadas com altas latitudes (COELHO et al. 2006). Tais estudos demonstraram ainda que existe uma tendência das borregas da raça Santa Inês não apresentarem estacionalidade reprodutiva enquanto que em borregas lanadas das raças Suffolk e Romney Marsh o ciclo reprodutivo parece obedecer a um padrão estacional. Como essas pesquisas foram desenvolvidas com fêmeas sexualmente imaturas (8 a 9 meses de idade no início

do experimento), se faz necessária a confirmação desse padrão reprodutivo em fêmeas adultas, assim como estudar o padrão circadiano de secreção da melatonina, visto que nos estudos anteriores as colheitas das amostras de sangue envolveram apenas alguns horários no início e no final do período noturno.

O presente trabalho vislumbra verificar as seguintes hipóteses:

- existem diferenças no perfil plasmático da prolactina entre fêmeas de raças com diferentes graus de estacionalidade reprodutiva.

- não existem diferenças no padrão circadiano da secreção de melatonina de fêmeas de raças com diferentes graus de estacionalidade reprodutiva criadas em baixas latitudes. A duração da secreção de melatonina é equivalente à duração do escotoperíodo.

- o modelo de reprodução de ovelhas lanadas (Romney Marsh) e deslanadas (Santa Inês) criadas em baixas latitudes no Sudeste do Brasil confirma o padrão reprodutivo anteriormente observado em borregas das mesmas raças.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Estudar os perfis sazonais das secreções circadianas de melatonina e prolactina e o perfil anual das concentrações plasmáticas de progesterona em ovelhas lanadas e deslanadas mantidas sob fotoperíodo natural na região Sudeste do Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar o ciclo circadiano (24 horas) das concentrações plasmáticas de prolactina e melatonina em ovelhas lanadas e deslanadas em quatro períodos do ano: equinócio de primavera (21/09), solstício de verão (21/12), equinócio de outono (21/03) e solstício de inverno (21/06);
- Estudar o padrão anual da atividade ovariana de ovelhas lanadas e deslanadas através das concentrações plasmáticas de progesterona.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e período de realização do experimento

O experimento foi realizado durante o período de setembro de 2002 a agosto de 2003 e os animais foram mantidos no Laboratório Experimental do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga-SP. O local está situado na latitude 21°59' Sul, na longitude 47°25' Oeste e a 634 metros de altitude. O clima é classificado como subtropical Cwa Koppen (KOPPEN, 1948), e o solo como Latossolo Vermelho Escuro Orto. A precipitação pluviométrica anual é de 1300 mm e a temperatura média de 21°C, sendo a mínima de 13°C e a máxima de 35°C.

3.2. Animais e Manejo

O experimento foi conduzido utilizando 20 fêmeas ovinas adultas, não gestantes e não lactantes, sendo dez da raça lanada Romney Marsh e dez da raça deslanada Santa Inês. Todos animais foram vacinados e desverminados antes do início do experimento. As fêmeas foram mantidas em baias, recebendo concentrado e volumoso, de acordo com os requerimentos nutricionais de fêmeas ovinas em reprodução (NRC, 1985), além de sal mineral e água à vontade.

3.3. Colheita de sangue para determinação das concentrações plasmáticas hormonais

Para determinação das dosagens plasmáticas hormonais, amostras de sangue foram colhidas da veia jugular dos animais, em tubos *vacutainers* heparinizados. Após a colheita, as amostras de sangue foram centrifugadas por quinze minutos a 1600 g e os plasmas estocados a -20° C até o momento da análise.

3.3.1. Progesterona

As colheitas das amostras de sangue para determinação das dosagens plasmáticas de progesterona foram realizadas uma vez por semana durante quarenta e oito semanas. As colheitas foram iniciadas em 01/09/2002 e concluídas em 31/08/2003.

3.3.2. Prolactina e Melatonina

Para determinação das dosagens plasmáticas de prolactina e melatonina, foram realizadas colheitas em quatro períodos do ano: equinócio de primavera (21/09/2002), solstício de verão (21/12/2002), equinócio de outono (21/03/2003) e solstício de inverno (21/06/2003). Em cada período, as colheitas das amostras de sangue foram realizadas, a cada duas horas, durante 24 horas.

Para a manipulação dos animais no período noturno, foi utilizada como fonte de luz uma lanterna adaptada com filtro de luz vermelha (25A) 58M (Tokina

Co, Ltd.) e jamais direcionadas aos olhos dos animais, sendo que a incidência luminosa não ultrapassou a 1 lux.

3.4. Dosagens hormonais

A determinação das dosagens de progesterona, melatonina e prolactina foram executadas no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

3.4.1. Progesterona

A determinação das concentrações de progesterona plasmática foi realizada através da técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, e as amostras foram analisadas em duplicata utilizando conjuntos de reagentes comerciais¹, desenvolvidos para avaliação quantitativa deste hormônio, sem qualquer tipo de extração química e processo de purificação, valendo-se do iodo¹²⁵ como elemento radioativo traçador. As contagens de radioatividade foram obtidas pela utilização de contador da radiação gama, calibrado automaticamente para iodo¹²⁵.

A dosagem de progesterona foi realizada em dois ensaios, e os parâmetros de qualidade do mesmo encontram-se na Tabela 1. O limite de detecção do ensaio foi 0,02 ng/mL, determinado pelo fabricante dos kits e o coeficiente de variação inter ensaios foi de 3,76%.

¹ COAT-A-COUNT Diagnostic Products Company, Los Angeles, CA, USA

Tabela 1. Características dos ensaios de radioimunoensaio (RIE) para determinação das concentrações plasmáticas de progesterona.

Ensaio	Contagem total (cpm)	CV (%) intra-ensaio	Ligações não específicas (%)	Ligação Máxima (%)
1	32.520,00	6,42	0,91	53,09
2	31.649,50	4,55	0,73	52,17

3.4.2. Melatonina

Para a determinação da melatonina plasmática foi realizada a técnica de radioimunoensaio descrita por Fraser et al. (1983) e modificada por English et al. (1986). As dosagens de melatonina foram realizadas em duplicatas em dez ensaios, e os parâmetros de qualidade dos mesmos estão expressos na Tabela 2. O coeficiente de variação inter-ensaios foi de 32,24%.

Tabela 2. Características dos ensaios de radioimunoensaio (RIE) para determinação das concentrações plasmáticas de melatonina.

Ensaio	Contagem total (cpm)	CV (%) intra-ensaio	Ligações não específicas (%)	Ligação Máxima (%)
1	1319,00	3,77	2,05	11,83
2	1620,50	6,53	1,42	30,44
3	1450,50	4,08	2,14	30,45
4	1198,00	17,12	2,13	14,53
5	1245,00	3,58	2,25	25,93
6	1249,50	12,38	3,16	23,86
7	1391,50	3,26	2,48	22,41
8	1395,00	8,79	3,08	23,93
9	1328,50	9,84	3,61	23,95
10	1274,00	4,11	3,73	22,56

3.4.3. Prolactina

As dosagens de prolactina foram realizadas em duplicatas mediante a técnica de RIE descrita por McNeilly e Andrews (1974) utilizando reagentes da NHPP (*National Hormone and Pituitary Program*²).

3.5. Avaliação da Atividade Ovulatória

A atividade ovulatória das fêmeas foi verificada mediante as concentrações plasmáticas de progesterona e obedeceu aos critérios previamente utilizados por Minton et al. (1991). Níveis hormonais menores que 1 ng/mL por duas amostras consecutivas caracterizam a fase sem atividade ovulatória enquanto que valores acima de 1 ng/mL por um período compatível com a fase luteal do ciclo estral caracterizam a fase com atividade ovulatória. Baseadas nesses dados algumas variáveis foram analisadas, como incidência mensal do número de ovelhas que ovularam, incidência mensal do número de ovulações, incidência mensal e sazonal do número de ovulações por fêmea, e duração do período de atividade ovulatória.

A incidência mensal do número de ovelhas que ovularam foi calculada em porcentagem, para cada mês, considerando o número de ovelhas que apresentaram ovulação no referido mês, sobre o total de ovelhas de cada raça.

A incidência mensal do número de ovulações foi calculada em porcentagem, para cada raça por mês, considerando-se o número de ovulações observadas no referido mês, sobre o número total de ovulações observadas no ano.

² NHPP Torrance, CA

As incidências mensal e estacional do número de ovulações por fêmea foi calculada para cada fêmea, de acordo com cada mês e estação.

A duração do período de atividade ovulatória foi calculada para cada fêmea, somando-se o número de dias em que a mesma apresentou níveis de progesterona plasmática acima de 1 ng/mL ou abaixo de 1 ng/mL no período ovulatório.

3.6. Determinação da duração da secreção noturna de melatonina

Para calcular a duração da secreção noturna de melatonina (horas) primeiramente é necessário determinar o horário de início e término da secreção deste hormônio. O início e o final da secreção em cada ovelha, foi definido como sendo o primeiro e o último valor (pg/mL) maior que duas vezes o desvio padrão da média dos valores obtidos nos horários diurnos (concentrações basais), de acordo com English et al (1988).

3.7. Delineamento experimental e análise estatística

Os valores referentes às concentrações plasmáticas médias de progesterona (P_4), prolactina (PRL) e melatonina (MEL) foram analisadas utilizando o Método de Quadrados Mínimos por meio do procedimento PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 8.0 (SAS, 1995), com opção REPEATED.

Para as concentrações plasmáticas de P_4 (ng/mL) e a duração da secreção noturna de melatonina (horas) foram considerados os efeitos principais de raça e estação, bem como a interação entre os efeitos principais raça *versus* estação. Nestas análises adotou-se o seguinte modelo:

$$y_{ijk} = \mu + R_i + E_j + RE_{ij} + e_{ijk}$$

em que: y_{ijk} = concentração de P_4 ou duração da secreção de melatonina;

μ = constante inerente a todas observações;

R_i = efeito da i -ésima raça ($i= 1, 2$);

E_j = efeito da j -ésima estação ($j= 1, 2, 3, 4$);

RE_{ij} = efeito da interação da raça i com a estação j ;

e_{ijk} = efeito aleatório residual associado às concentrações de P_4 ou duração da secreção de melatonina.

Para os dados referentes às concentrações plasmáticas de MEL (pg/mL) e PRL (ng/mL) foram considerados os efeitos principais de raça, estação e o horário de colheita das amostras de sangue, bem como a interação entre os efeitos principais. Nestas análises adotou-se o seguinte modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + R_i + E_j + H_k + RE_{ij} + RH_{ik} + EH_{jk} + REH_{ijk} + e_{ijkl}$$

em que: y_{ijkl} = concentração de PRL ou MEL;

μ = constante inerente a todas observações;

R_i = efeito da i -ésima raça ($i= 1, 2$);

E_j = efeito da j -ésima estação ($j= 1, 2, 3, 4$);

H_k = efeito do k -ésimo horário (1, 2, ...12);

RE_{ij} = efeito da interação da raça i com a estação j ;

RH_{ik} = efeito da interação da raça i com o horário k ;

EH_{jk} = efeito da interação da estação j com o horário k ;

REH_{ijk} = efeito da interação da raça i com a estação j e com o horário k ;

e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado às concentrações de PRL ou MEL.

Os resultados referentes às médias da duração (em dias) do período de atividade ovulatória, incidência mensal e estacional de ovulações por fêmea foram submetidos a uma análise de variância, utilizando o procedimento PROC GLM (*General Linear Model*) do SAS, em um delineamento inteiramente casualizado. Para evidenciar as diferenças entre médias foi utilizado o teste de Tukey (nível de significância de 5%).

Para a duração do período de atividade ovulatória, adotou-se o seguinte modelo:

$$y_{ij} = \mu + R_i + e_{ij}$$

em que: y_{ijkl} = duração do período de atividade ovulatória;

μ = constante inerente a todas as observações;

R_i = efeito da i -ésima raça ($i= 1, 2$);

e_{ij} = efeito aleatório residual associado à duração do período de anestro ou da atividade ovulatória.

Para a incidência mensal e estacional de ovulações por fêmea, adotou-se o seguinte modelo:

$$y_{ijk} = \mu + R_i + M_j \text{ ou } E_j + RM_{ij} \text{ ou } RE_{ij} + e_{ijk}$$

em que: y_{ijk} = número de ovulações mensal ou estacional por fêmea;

μ = constante inerente a todas as observações;

R_i = efeito da i -ésima raça ($i= 1, 2$);

M_j = efeito do j -ésimo mês (1, 2, ... 12);

E_j = efeito da j -ésima estação ($j= 1, 2, 3, 4$);

RM_{ij} = efeito da interação da raça i com o mês j ;

RE_{ij} = efeito da interação da raça i com a estação j ;

e_{ijk} = efeito aleatório residual associado ao número de ovulações mensal ou estacional por fêmea.

4. RESULTADOS

4.1. PROGESTERONA

4.1.1. Concentrações plasmáticas

Os resultados referentes à análise estatística aplicada aos dados sobre as concentrações plasmáticas de progesterona estão expressos na Tabela 3. Houve efeito ($P < 0,01$) tanto da raça como das estações do ano sobre os níveis plasmáticos de progesterona assim como a interação entre ambos os efeitos foi significativa.

Tabela 3. Resultado da análise estatística referente às concentrações plasmáticas de progesterona de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh durante o período de setembro de 2002 a agosto de 2003.

Causas de variação	Graus de liberdade	Valor de P
Raça (R)	1	0,0001
Estação (E)	3	0,0001
R x E	3	0,0001

A Tabela 4 mostra que, em todas as estações as médias das concentrações plasmáticas de progesterona de ovelhas Santa Inês foram superiores aos valores observados nas ovelhas Romney Marsh. Para as fêmeas Santa Inês, as maiores concentrações de progesterona plasmática ocorreram no outono e inverno, seguido do verão, e as menores concentrações ocorreram na primavera. Já para as fêmeas Romney Marsh as maiores concentrações de

progesterona plasmática ocorreram no outono, seguido do verão, e as menores concentrações ocorreram na primavera e inverno.

Tabela 4. Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de progesterona de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh criadas em baixas latitudes no hemisfério Sul.

Raça	Concentrações Plasmáticas de Progesterona (ng/mL)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Santa Inês	1,90 \pm 0,16 ^{aC}	2,64 \pm 0,22 ^{aB}	3,35 \pm 0,21 ^{aA}	3,09 \pm 0,23 ^{aA}
Romney Marsh	0,28 \pm 0,01 ^{bC}	0,93 \pm 0,13 ^{bB}	2,52 \pm 0,20 ^{bA}	0,23 \pm 0,11 ^{bC}

Valores com diferentes letras dentro da mesma coluna (a,b) ou da mesma linha (A,B,C) são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste t-student.

4.1.2. Avaliação da atividade ovariana

Dados referentes à duração média do período de atividade ovulatória estão expressos na Tabela 5. As ovelhas Santa Inês apresentaram um período de atividade ovariana (358,7 dias) mais ($P < 0,01$) prolongado que as fêmeas da raça Romney Marsh (129,4 dias). Estas apresentaram atividade ovulatória durante o período de 13/02/2003 a 23/06/2003.

Tabela 5. Duração média (dias) do período de atividade ovariana em ovelhas das raças Santa Inês (SI) e Romney Marsh (RM) observadas no período de setembro de 2002 a agosto de 2003.

Raça	Duração do período de atividade ovariana (dias) ***
Santa Inês	358,7 \pm 6,3
Romney Marsh	129,4 \pm 8,75

*** $P < 0,001$ pelo teste F.

Estudando individualmente o comportamento ovulatório das fêmeas ao longo do ano, percebe-se que praticamente todas as fêmeas Santa Inês apresentavam atividade ovulatória durante todo o ano (Figura 1), diferentemente do que ocorreu com as fêmeas Romney Marsh, cuja atividade se restringiu a um curto período (Figura 2). No mês de janeiro, o percentual de ovelhas Romney Marsh que estavam em atividade ovulatória foi baixo (20%), sendo que no mês de março todas as fêmeas estavam em atividade ovulatória (Figura 3). Da mesma forma, estas fêmeas começaram a interromper essa atividade a partir do mês de junho, sendo que no mês de agosto, todas as fêmeas já a haviam interrompido. Este fato refletiu na incidência mensal de ovulações (Figura 4). A frequência de ovulações das fêmeas Santa Inês foi distribuída eqüitativamente ao longo do ano, enquanto que as das fêmeas Romney Marsh as ovulações se concentraram nos meses de fevereiro a julho, sendo que somente o mês de abril concentrou quase $\frac{1}{4}$ das ovulações (23,8%) observadas durante o período experimental.

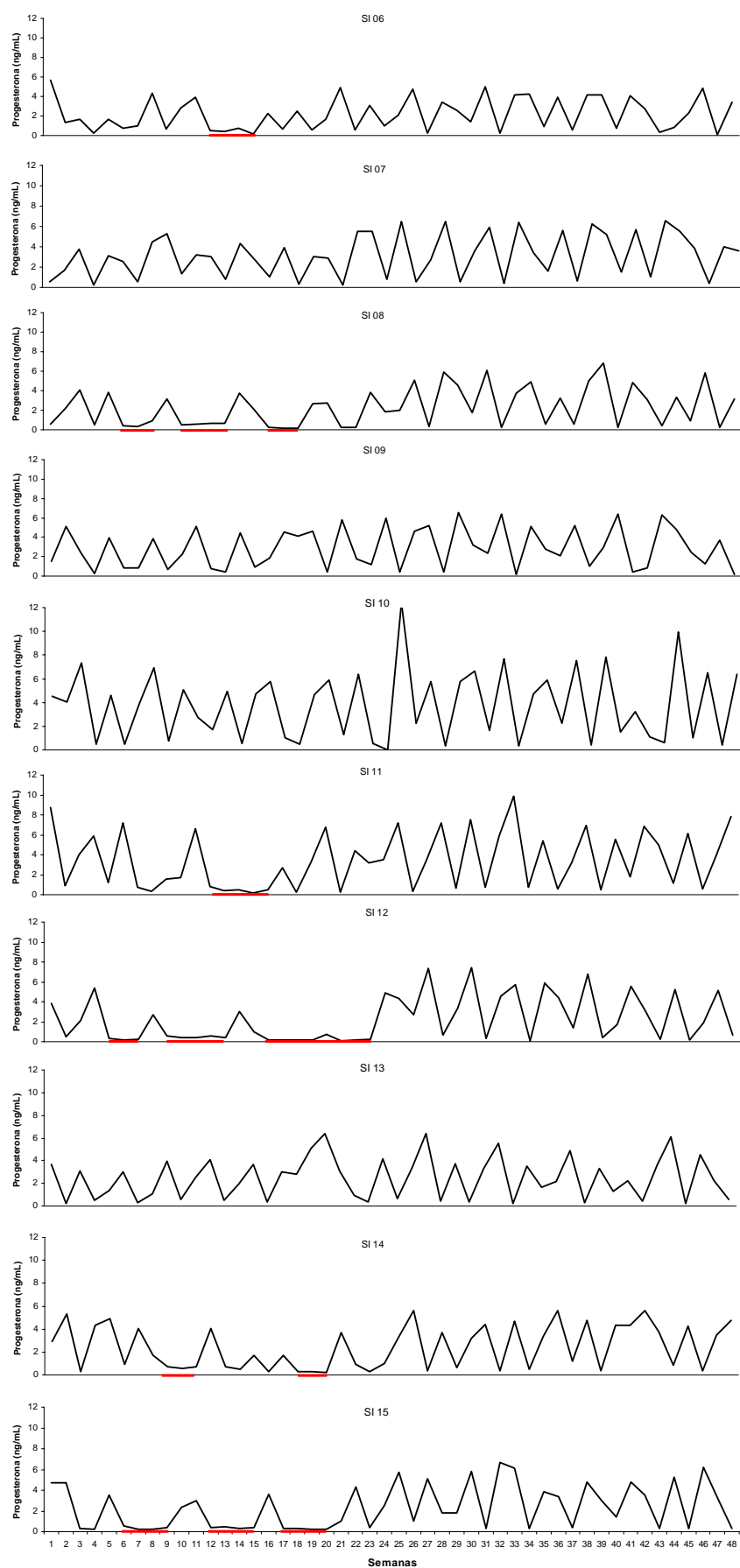


Figura 1. Concentrações plasmáticas de progesterona de ovelhas Santa Inês no período de setembro de 2002 a agosto de 2003. Barra vermelha no eixo X representa o período de anestro (concentração plasmática de progesterona < 1 ng/mL por período superior a 10 dias).

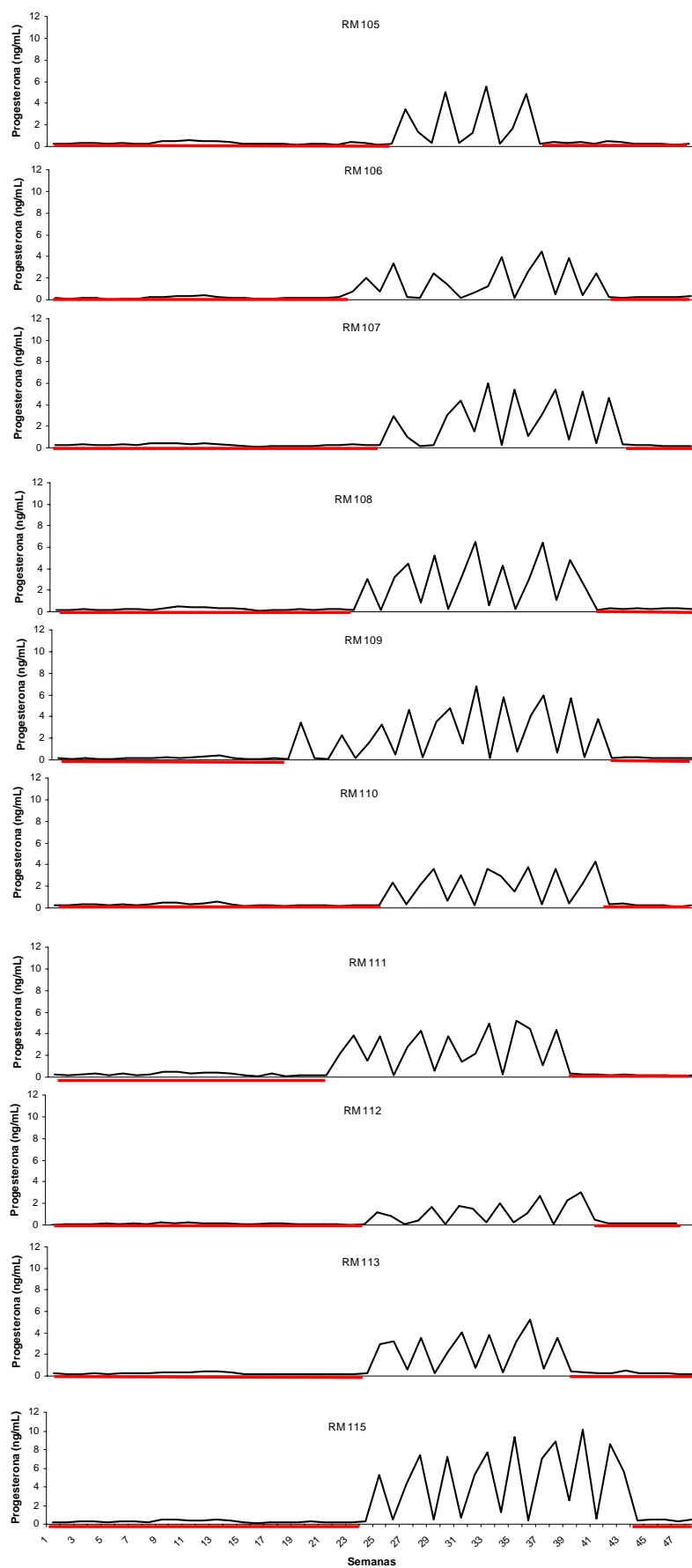


Figura 2. Concentrações plasmáticas de progesterona de ovelhas Romney Marsh no período de setembro de 2002 a agosto de 2003. Barra vermelha no eixo X representa o período de anestro (concentração plasmática de progesterona < 1 ng/mL por período superior a 10 dias).

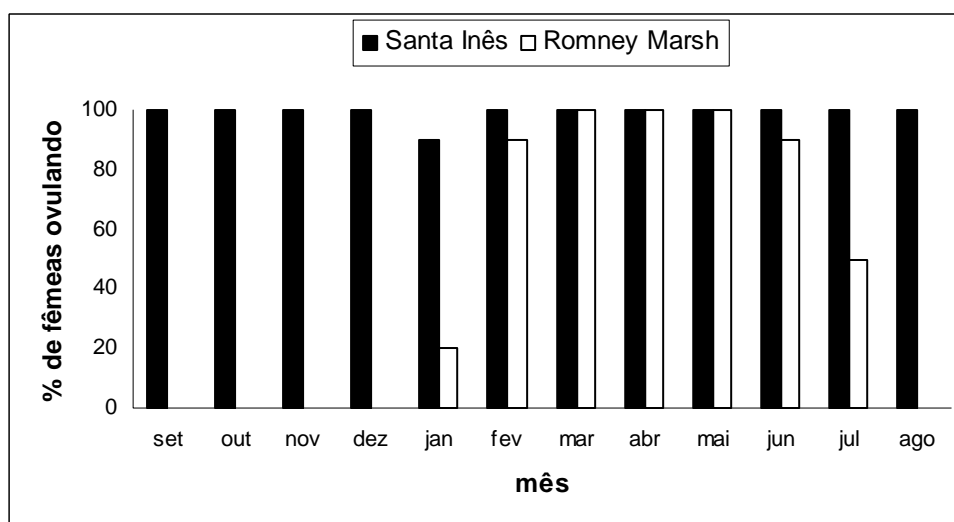


Figura 3. Incidência mensal de ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) em atividade ovulatória no período de setembro de 2002 a agosto de 2003.

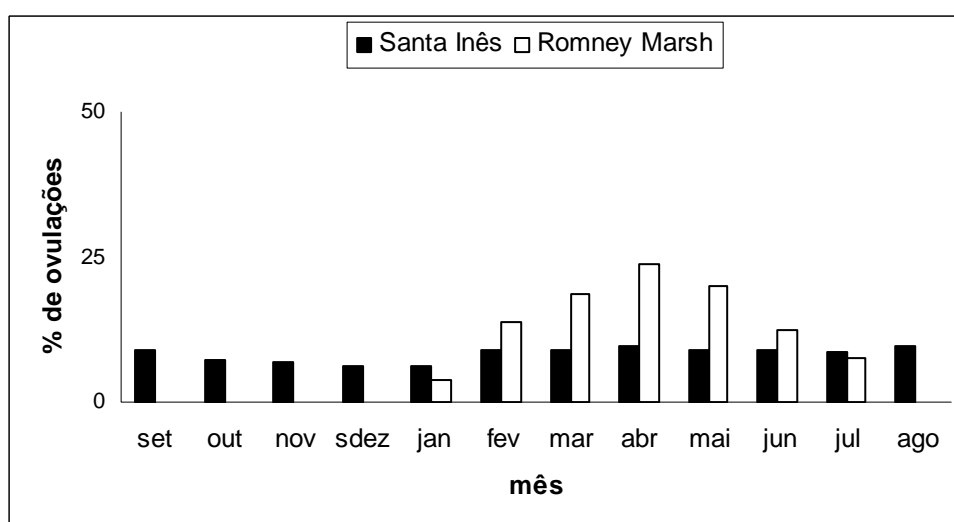


Figura 4. Incidência mensal de ovulações das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) durante o período de setembro de 2002 a agosto de 2003.

Os resultados da análise estatística referente às incidências mensal e estacional de ovulações ocorridas por fêmea estão expressos na Tabela 6. Houve efeito significativo das interações entre raça *versus* mês e entre raça *versus* estação sobre o número de ovulações ocorridos por fêmea/mês e por fêmea/estação, respectivamente.

Tabela 6. Resultado das análises estatísticas referentes ao número de ovulações ocorridos por mês (análise I) ou por estação (análise II) de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh durante o período de setembro de 2002 a agosto de 2003.

Análise I			Análise II		
Causas de variação	Graus de liberdade	Valor de P	Causas de variação	Graus de liberdade	Valor de P
Raça (R)	1	0,0001	Raça (R)	1	0,0001
Mês (M)	11	0,0001	Estação (E)	3	0,0001
R x M	11	0,0001	R x E	3	0,0001

Analisando as diferenças raciais, de junho a janeiro o número médio de ovulações por fêmea observado nas fêmeas Santa Inês foi superior ao observado nas fêmeas Romney Marsh (Tabela 7). Nos meses de fevereiro a maio as ovelhas das raças Romney Marsh e Santa Inês apresentaram em média número de ovulações semelhantes. Não houve variação mensal dessa característica para as fêmeas Santa Inês, que foram distribuídas equitativamente nos meses do ano, não havendo diferença significativa entre os meses ($P > 0,05$). As fêmeas Romney Marsh apresentaram um maior número de ovulações ($P < 0,01$) no mês de abril quando comparado aos meses de julho a fevereiro.

Tabela 7. Médias \pm erros padrão do número de ovulações por fêmea por mês de ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) no período de setembro de 2002 a agosto de 2003.

Meses	Raças	
	Santa Inês	Romney Marsh
Setembro	1,6 \pm 0,16 ^{aA}	0,0 \pm 0,0 ^{dB}
Outubro	1,3 \pm 0,15 ^{aA}	0,0 \pm 0,0 ^{dB}
Novembro	1,2 \pm 0,20 ^{aA}	0,0 \pm 0,0 ^{dB}
Dezembro	1,1 \pm 0,18 ^{aA}	0,0 \pm 0,0 ^{dB}
Janeiro	1,1 \pm 0,23 ^{aA}	0,3 \pm 0,21 ^{dB}
Fevereiro	1,6 \pm 0,16 ^{aA}	1,1 \pm 0,18 ^{bcA}
Março	1,6 \pm 0,16 ^{aA}	1,5 \pm 0,17 ^{abA}
Abril	1,7 \pm 0,15 ^{aA}	1,9 \pm 0,10 ^{aA}
Mai	1,6 \pm 0,16 ^{aA}	1,6 \pm 0,16 ^{abA}
Junho	1,6 \pm 0,16 ^{aA}	1,0 \pm 0,15 ^{bcB}
Julho	1,5 \pm 0,17 ^{aA}	0,6 \pm 0,22 ^{cdB}
Agosto	1,7 \pm 0,15 ^{aA}	0,0 \pm 0,0 ^{dB}

Valores com diferentes letras dentro da mesma coluna (a,b,c,d) ou da mesma linha (A,B) são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Já na análise por estação do ano (Tabela 8), houve diferença no número de ovulações apresentados por fêmea na primavera, verão e inverno, sendo que no outono ambas as raças apresentaram a mesma média de ovulações por fêmea.

As fêmeas Santa Inês apresentaram ($P < 0,05$) um maior número de ovulações/fêmea no outono (4,9 ovulações/fêmea) quando comparado à primavera (3,9 ovulações/fêmea). As fêmeas Romney Marsh apresentaram maior número de ovulações no outono (5,0 ovulações/fêmea), seguido do verão (2,4 ovulações/fêmea), e por último a primavera (0 ovulação/fêmea) e inverno (0,6 ovulações/fêmea).

Tabela 8. Médias \pm erros padrão do número de ovulações por fêmea por estação de ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) no período de setembro de 2002 a agosto de 2003.

Estações	Raças	
	Santa Inês	Romney Marsh
Primavera	3,9 \pm 0,28 ^{bA}	0,0 \pm 0,0 ^{dB}
Verão	4,2 \pm 0,33 ^{abA}	2,4 \pm 0,37 ^{bB}
Outono	4,9 \pm 0,10 ^{aA}	5,0 \pm 0,21 ^{aA}
Inverno	4,6 \pm 0,22 ^{abA}	0,6 \pm 0,22 ^{cB}

Valores com diferentes letras dentro da mesma coluna (a,b) ou da mesma linha (A,B) são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

4.2. MELATONINA

4.2.1. Concentrações plasmáticas

Os resultados da análise estatística referente às concentrações plasmáticas de melatonina (pg/mL) nos quatro períodos: equinócio de primavera, solstício de verão, equinócio de outono e solstício de inverno estão expressos na Tabela 9. Houve efeito ($P < 0,01$) do horário de colheita assim como da interação estação *versus* horário sobre os níveis plasmáticos de melatonina.

Tabela 9. Resultados da análise estatística referente às concentrações plasmáticas de melatonina de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh.

Causas de Variação	Graus de liberdade	Valores de P
Raça (R)	1	0,0806
Estação (E)	3	0,5909
Horário (H)	11	0,0001
R x E	3	0,6932
R x H	11	0,0656
E x H	33	0,0001
R x E x H	33	0,9027

Considerando o efeito da interação entre estação do ano e horário das colheitas das amostras de sangue (Tabela 10), não houve diferenças estacionais nos horários diurnos. Tais diferenças ($P < 0,01$) ficaram evidentes nos horários de transição, dia/noite (20:00h na primavera, verão e outono e 18:00h no inverno) e noite/dia (6:00h em todas as estações) e ao longo do período noturno. Analisando o efeito do horário, diferenças nas concentrações de melatonina foram mais uma vez observadas somente nos horários noturnos.

Tabela 10. Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de melatonina (pg/mL) de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh, nos solstícios de verão e inverno, e equinócios de primavera e outono.

Hora	Estações			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
8	24,64 \pm 1,95 ^{bA}	16,87 \pm 1,74 ^{dA}	29,09 \pm 3,91 ^{cA}	37,29 \pm 5,65 ^{bA}
10	24,38 \pm 1,50 ^{bA}	15,94 \pm 1,49 ^{dA}	27,42 \pm 3,80 ^{cA}	29,23 \pm 4,96 ^{bA}
12	23,37 \pm 2,83 ^{bA}	13,82 \pm 1,54 ^{dA}	26,81 \pm 3,84 ^{cA}	28,79 \pm 4,82 ^{bA}
14	23,36 \pm 2,56 ^{bA}	15,47 \pm 1,64 ^{dA}	27,87 \pm 5,12 ^{cA}	27,75 \pm 5,24 ^{bA}
16	21,66 \pm 2,00 ^{bA}	12,30 \pm 1,84 ^{dA}	28,11 \pm 5,18 ^{cA}	25,25 \pm 3,47 ^{bA}
18	19,89 \pm 2,03 ^{bB}	13,23 \pm 1,58 ^{dB}	29,76 \pm 4,12 ^{cB}	139,09 \pm 21,05 ^{aA}
20	185,50 \pm 30,87 ^{aA}	128,74 \pm 20,12 ^{cB}	153,49 \pm 15,26 ^{aAB}	164,44 \pm 26,95 ^{aAB}
22	218,96 \pm 33,36 ^{aA}	198,23 \pm 22,67 ^{abA}	185,58 \pm 22,61 ^{aA}	173,08 \pm 18,21 ^{aA}
0	187,81 \pm 24,44 ^{aAB}	220,62 \pm 27,82 ^{aA}	177,83 \pm 21,97 ^{aAB}	141,74 \pm 17,51 ^{aB}
2	200,81 \pm 24,80 ^{aA}	178,63 \pm 23,88 ^{bAB}	176,11 \pm 16,80 ^{aAB}	149,32 \pm 19,82 ^{aB}
4	201,67 \pm 29,77 ^{aA}	219,60 \pm 29,72 ^{aA}	183,48 \pm 25,55 ^{aAB}	154,04 \pm 18,09 ^{aB}
6	49,56 \pm 4,68 ^{bBC}	35,87 \pm 4,31 ^{dC}	95,43 \pm 17,12 ^{bB}	150,32 \pm 24,30 ^{aA}

Valores com diferentes letras dentro da mesma coluna (a,b,c,d) ou da mesma linha (A,B,C) são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A figura 5 mostra o ciclo circadiano das concentrações plasmáticas de melatonina em ovelhas Santa Inês e Romney Marsh durante as quatro estações. As concentrações plasmáticas de melatonina atingiram valores médios elevados (picos) das 20:00 às 4:00 h na primavera, das 22:00 às 4:00 h no verão, das 20:00 às 4:00 h no outono e das 18:00 às 6:00 h no inverno, praticamente coincidindo com a duração do escotoperíodo (período escuro do dia). Níveis basais foram observados nos horários diurnos.

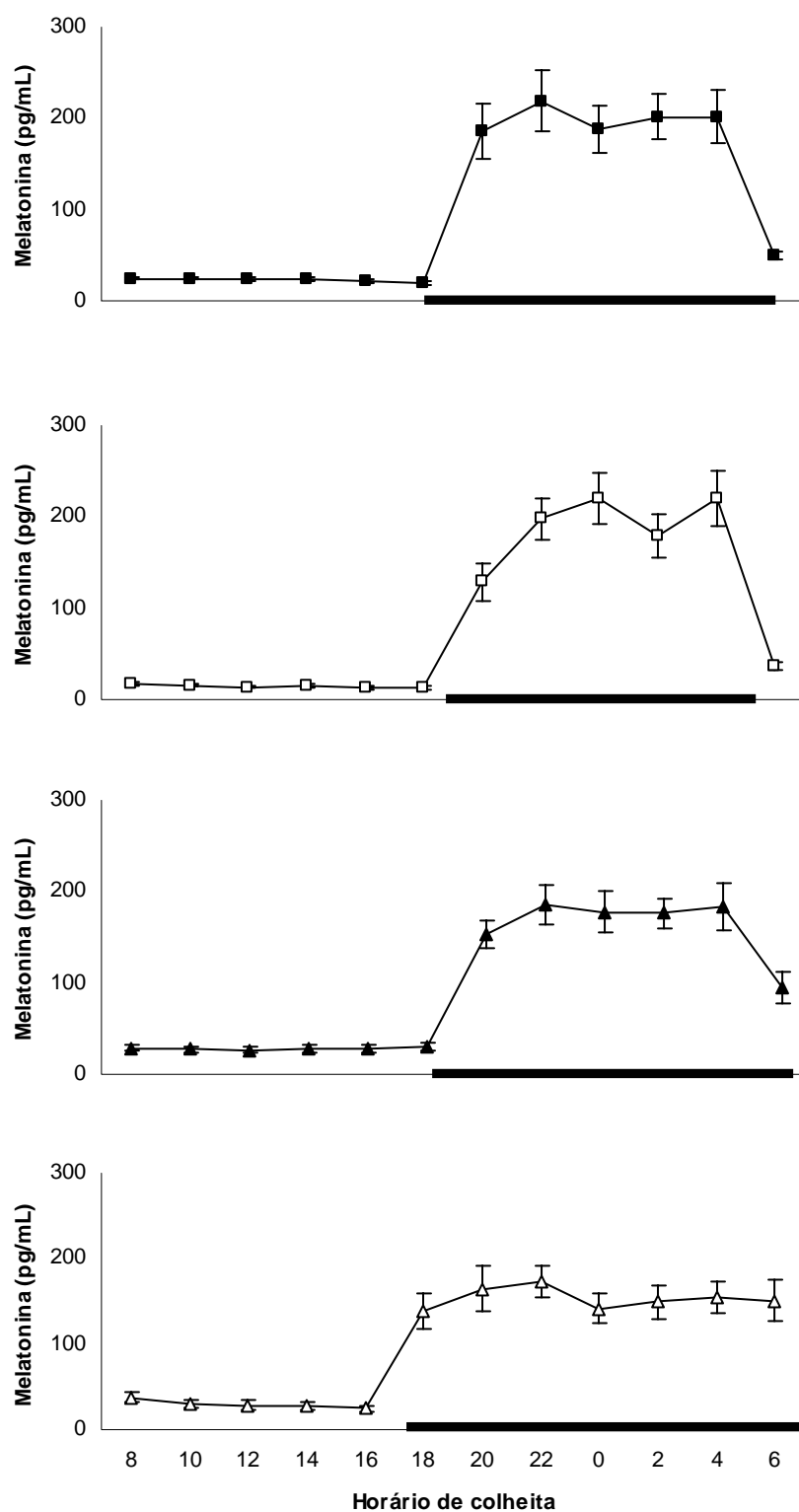


Figura 5. Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de melatonina em ovelhas ($n=20$) das raças Santa Inês e Romney Marsh no equinócio de primavera (□), solstício de verão (□), equinócio de outono (Δ) e solstício de inverno (Δ). Barra preta sob o eixo X representa a duração do escotoperíodo (período escuro).

4.2.2. Duração da secreção noturna de melatonina

Os resultados da análise estatística referente à duração da secreção noturna de melatonina (horas) nos quatro períodos: equinócio de primavera, solstício de verão, equinócio de outono e solstício de inverno estão expressos na Tabela 11. Houve efeito ($P < 0,01$) da estação e da interação raça *versus* estação do ano sobre a duração da secreção noturna de melatonina.

Tabela 11. Resultados da análise estatística referente à duração da secreção de melatonina de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh nas quatro estações do ano.

Causas de Variação	Graus de liberdade	Valores de P
Raça (R)	1	0,4521
Estação (E)	3	0,0001
R x E	3	0,0039

A Tabela 12 mostra resultados referentes à interação entre raça *versus* estação do ano na duração média da secreção noturna de melatonina em ovelhas Santa Inês e Romney Marsh. A duração da secreção de melatonina entre as raças diferenciou ($P < 0,05$) apenas no equinócio da primavera, que foi de 12,30 h e 11,24 h para as ovelhas Santa Inês e Romney Marsh, respectivamente. Nas demais estações, não houve diferenças raciais ($P > 0,05$). Quanto às diferenças estacionais, nas ovelhas de ambas as raças a duração média da secreção noturna de melatonina foi significativamente superior no inverno quando comparada com as demais estações.

Tabela 12. Médias \pm erros padrão da duração da secreção de melatonina (horas) de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh criadas em baixas latitudes no Hemisfério Sul.

Raça	Estações			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Santa Inês	12,3 \pm 0,23 ^{ab}	11,4 \pm 0,22 ^{aC}	11,7 \pm 0,32 ^{aBC}	13,8 \pm 0,57 ^{aA}
Romney Marsh	11,2 \pm 0,40 ^{bC}	11,9 \pm 0,17 ^{aB}	12,5 \pm 0,25 ^{aB}	14,6 \pm 0,16 ^{aA}

Valores com diferentes letras dentro da mesma coluna (a,b) ou da mesma linha (A,B,C) são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste t-student.

4.3. PROLACTINA

4.3.1. Concentrações plasmáticas

Os resultados da análise estatística referente às concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) nos quatro períodos: equinócio de primavera, solstício de verão, equinócio de outono e solstício de inverno estão expressos na Tabela 13.

Para as concentrações plasmáticas de prolactina, quase todos os fatores estudados exerceram influência: raça, estação do ano, horário de colheita e as interações duplas.

Tabela 13. Resultados da análise estatística referente às concentrações plasmáticas de prolactina de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh .

Causas de Variação	Graus de liberdade	Valores de P
Raça (R)	1	0,0001
Estação (E)	3	0,0001
Horário (H)	11	0,0001
R x E	3	0,0026
R x H	11	0,0001
E x H	33	0,0001
R x E x H	33	0,1619

A Tabela 14 mostra o efeito da interação entre raça *versus* estação sobre as concentrações plasmáticas de prolactina. Em todas as estações do ano, as ovelhas da raça Romney Marsh apresentaram uma concentração média superior ($P < 0,01$) às ovelhas Santa Inês. As diferenças estacionais dentro de cada raça foram mais evidentes nas fêmeas Romney Marsh cujas concentrações de prolactina foram diferentes entre si. Valores mais elevados foram observados na primavera havendo uma significativa e gradativa diminuição dos níveis plasmáticos no verão, outono e inverno. Embora variações estacionais nos níveis plasmáticos de prolactina nas ovelhas Santa Inês tenham sido significativas, tais diferenças foram menos evidenciadas. Maiores concentrações foram observadas na primavera e verão e menores concentrações no inverno, mas os valores encontrados no outono não diferiram daqueles observados na primavera, verão e inverno.

Tabela 14. Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh criadas em baixas latitudes no Hemisfério Sul, segundo as estações avaliadas.

Raça	Estações			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Santa Inês	22,62 \pm 2,57 ^{aA}	22,53 \pm 2,48 ^{aA}	13,39 \pm 1,10 ^{aAB}	9,90 \pm 0,77 ^{aB}
Romney Marsh	65,79 \pm 4,86 ^{bB}	80,26 \pm 4,57 ^{bA}	53,04 \pm 2,91 ^{bC}	39,20 \pm 2,96 ^{bD}

Valores com diferentes letras dentro da mesma coluna (a,b) ou da mesma linha (A,B,C) são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste t-student.

A tabela 15 mostra o efeito da interação entre raça *versus* horário sobre as concentrações plasmáticas de prolactina. Diferenças raciais foram observadas em todos os horários, sendo que as fêmeas Romney Marsh apresentaram níveis plasmáticos de prolactina mais elevados ($P < 0,01$) quando comparados àqueles observados nas fêmeas Santa Inês. Nas fêmeas de ambas as raças, as diferenças significativas entre horários foram mais evidentes em horários diurnos, quando o perfil de secreção plasmática foi mais elevado (Figura 6). Apesar de haver diferenças significativas em horários noturnos, essa variação foi menos pronunciada envolvendo apenas os horários das 18:00 às 22:00 h (Tabela 15).

Tabela 15. Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh nas quatro estações do ano, de acordo com os horários de colheita.

Horário	Raças	
	Romney Marsh	Santa Inês
8	73,98 \pm 6,31 ^{cA}	21,56 \pm 3,46 ^{bcB}
10	93,68 \pm 6,67 ^{bA}	35,10 \pm 5,03 ^{aB}
12	109,43 \pm 9,05 ^{aA}	35,35 \pm 5,28 ^{aB}
14	93,74 \pm 8,31 ^{bA}	30,98 \pm 4,78 ^{abB}
16	67,69 \pm 6,13 ^{cA}	19,46 \pm 1,99 ^{cdB}
18	63,33 \pm 6,86 ^{cA}	15,31 \pm 3,22 ^{cdeB}
20	45,53 \pm 6,51 ^{dA}	9,67 \pm 1,22 ^{deB}
22	32,97 \pm 2,94 ^{efA}	6,67 \pm 0,55 ^{eB}
0	27,55 \pm 2,26 ^{fA}	6,55 \pm 0,67 ^{eB}
2	32,54 \pm 2,92 ^{fA}	6,61 \pm 0,58 ^{eB}
4	32,67 \pm 2,89 ^{fA}	7,15 \pm 0,72 ^{eB}
6	41,79 \pm 4,26 ^{deA}	10,90 \pm 1,28 ^{deB}

Valores com diferentes letras dentro da mesma coluna (a,b,c,d,e,f) ou da mesma linha (A,B) são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste t-student.

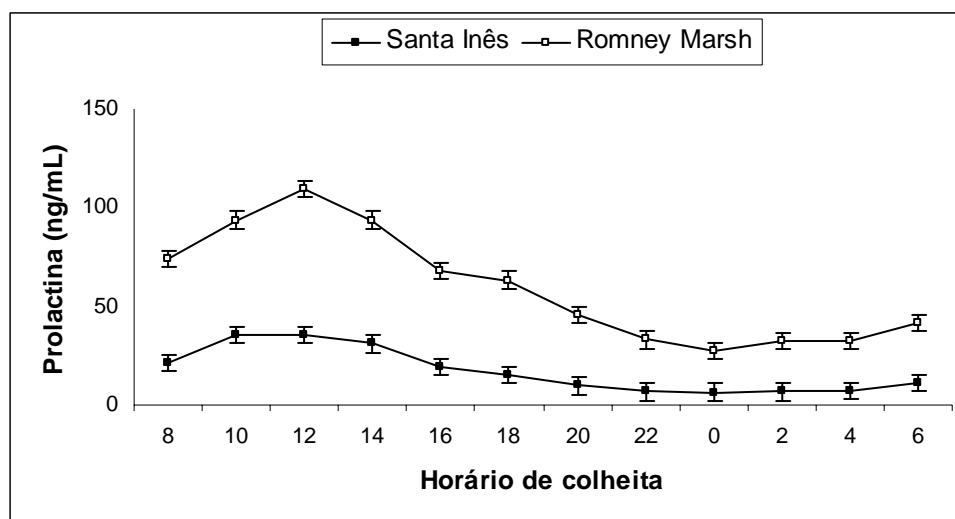


Figura 6. Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina em ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) nas quatro estações do ano.

A interação estação *versus* horário foi significativa ($P < 0,01$) para as concentrações plasmáticas de prolactina (Tabela 16). Nas quatro épocas do ano as maiores concentrações de prolactina ocorreram no período diurno. Diferenças entre horários foram menos pronunciadas das 0:00 às 6:00 h. Considerando as diferenças estacionais, das 8:00 às 22:00 h os níveis plasmáticos de prolactina foram mais elevados durante a primavera e o verão que durante o outono e inverno, ou seja, as diferenças ocorreram principalmente nos horários diurnos (Figura 7). Não houve variação estacional significativa entre os valores observados nos horários de 0:00 às 6:00 h.

Tabela 16. Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) de ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh, nos solstícios de verão e inverno, e equinócios de primavera e outono.

Horário	Estações			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
8	57,19 \pm 11,22 ^{cA}	64,01 \pm 10,45 ^{cA}	36,85 \pm 5,61 ^{bcB}	33,02 \pm 7,36 ^{abB}
10	80,11 \pm 10,54 ^{bA}	79,73 \pm 12,57 ^{bA}	54,02 \pm 9,49 ^{aB}	43,70 \pm 7,37 ^{aB}
12	99,34 \pm 16,81 ^{aA}	93,46 \pm 14,06 ^{aA}	53,58 \pm 8,80 ^{aB}	43,19 \pm 7,53 ^{aB}
14	79,96 \pm 12,51 ^{bA}	80,09 \pm 15,65 ^{bA}	49,65 \pm 7,20 ^{abB}	39,76 \pm 7,97 ^{abB}
16	36,65 \pm 7,84 ^{deB}	63,73 \pm 10,71 ^{cA}	42,20 \pm 6,47 ^{abcB}	31,74 \pm 6,62 ^{abcB}
18	51,85 \pm 8,76 ^{cdA}	58,90 \pm 11,91 ^{cA}	30,69 \pm 7,80 ^{cdB}	15,85 \pm 4,05 ^{cdeB}
20	20,29 \pm 3,37 ^{fB}	48,29 \pm 11,44 ^{cA}	28,29 \pm 7,68 ^{cdB}	13,52 \pm 3,27 ^{deB}
22	17,97 \pm 3,92 ^{fAB}	28,82 \pm 4,91 ^{dA}	21,73 \pm 4,54 ^{dAB}	10,78 \pm 2,05 ^{deB}
0	17,84 \pm 3,36 ^{fA}	23,91 \pm 3,49 ^{dA}	17,02 \pm 3,60 ^{dA}	9,44 \pm 2,00 ^{eA}
2	19,24 \pm 4,41 ^{fA}	25,04 \pm 3,84 ^{dA}	20,23 \pm 4,54 ^{dA}	13,79 \pm 3,68 ^{deA}
4	20,47 \pm 4,77 ^{efA}	24,09 \pm 3,52 ^{dA}	20,35 \pm 4,15 ^{dA}	14,74 \pm 3,99 ^{deA}
6	29,58 \pm 7,12 ^{efA}	26,70 \pm 3,26 ^{dA}	24,03 \pm 4,34 ^{dA}	25,08 \pm 7,09 ^{bcdA}

Valores com diferentes letras dentro da mesma coluna (a,b,c,d,e,f) ou da mesma linha (A,B) são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

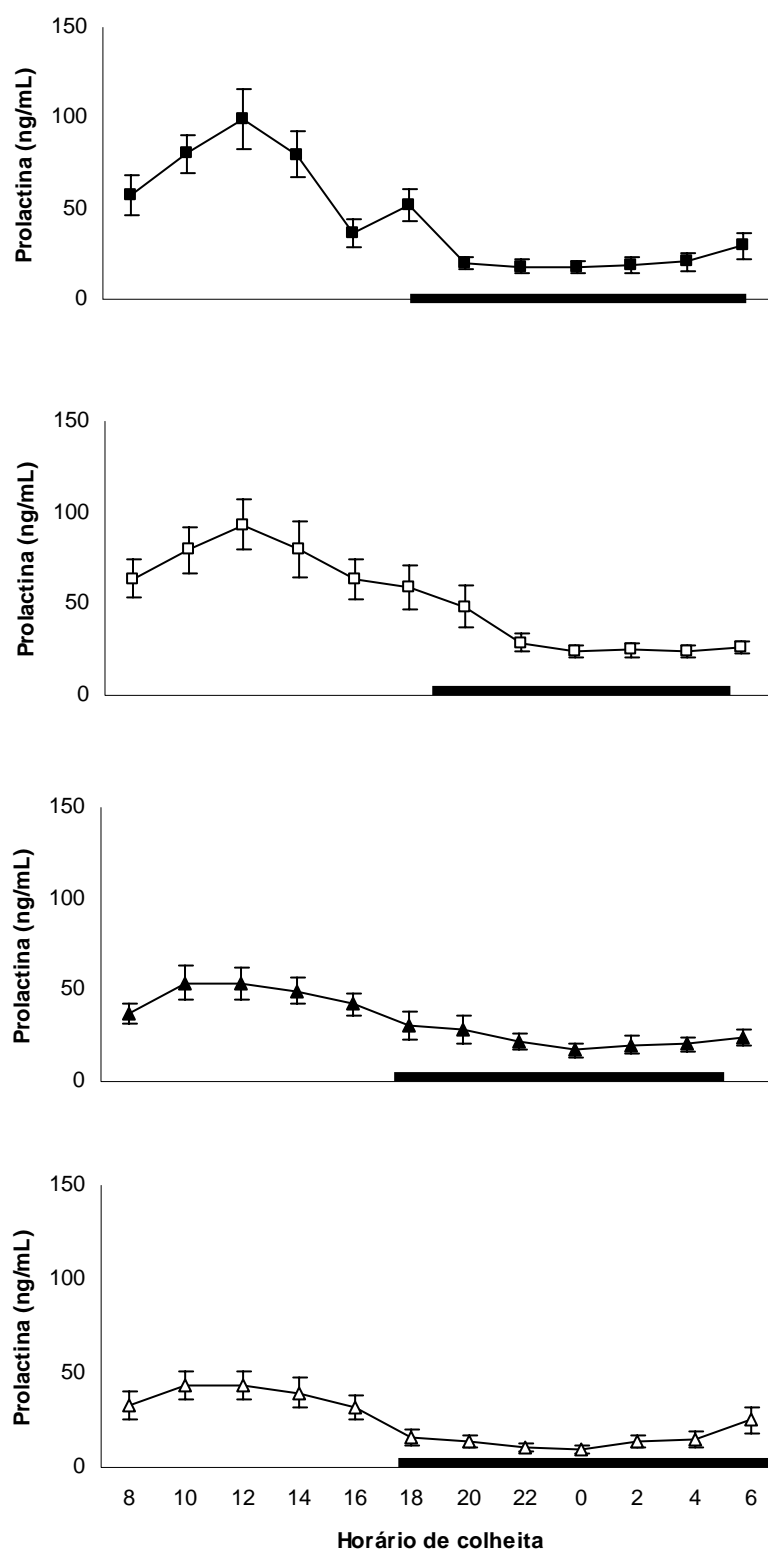


Figura 7. Médias \pm erros padrão das concentrações plasmáticas de prolactina em ovelhas das raças Santa Inês (n=10) e Romney Marsh (n=10) no equinócio de primavera (□), solstício de verão (□), equinócio de outono (Δ) e solstício de inverno (Δ). Barra preta sob o eixo X representa a duração do escotoperíodo (período escuro).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou o comportamento anual da atividade ovariana mediante as concentrações plasmáticas de progesterona e as mudanças sazonais no ciclo circadiano das concentrações plasmáticas de melatonina e prolactina em ovelhas das raças Santa Inês e Romney Marsh mantidas sob fotoperíodo natural na região sudeste do Brasil (21°59' S).

Os resultados referentes às concentrações plasmáticas de progesterona mostraram que ovelhas Santa Inês e Romney Marsh apresentaram diferentes modelos de ciclo reprodutivo. Para as fêmeas Santa Inês não houve variação sazonal nas concentrações plasmáticas de progesterona, mostrando um padrão de secreção constante ao longo do ano. Já para as fêmeas Romney Marsh, observou-se um modelo de secreção sazonal, com médias de concentrações abaixo de 1 ng/mL na primavera, verão e inverno e acima de 1 ng/mL no outono. Esses resultados sugerem um forte indicativo de que as ovelhas Santa Inês possam ser caracterizadas como animais de baixo grau de estacionalidade reprodutiva e as fêmeas Romney Marsh com um acentuado grau de estacionalidade reprodutiva. Analisando individualmente, quatro fêmeas Santa Inês apresentaram atividade ovulatória o ano todo, e seis apresentaram curtíssimos períodos sem atividade ovulatória. Em contra partida, todas as fêmeas Romney Marsh apresentaram um longo período sem atividade ovulatória, que perdurou por meses. Essa informação confirma os estudos realizados com borregas da mesma raça sob condições de fotoperíodo natural no Brasil (COELHO, 2001; COELHO et al., 2001; RODRIGUES, 2001; SASA et al., 2001a).

As concentrações plasmáticas de progesterona têm sido utilizadas para monitorar a atividade cíclica reprodutiva de ovelhas (ABECIA et al., 1996;

AMIRIDIS et al., 2002). Embora esse método seja extremamente confiável e os perfis plasmáticos de progesterona tenham sugerido diferenças raciais no comportamento reprodutivo as quais interagiram com os meses e/ou as estações do ano, não se pode afirmar categoricamente que esses resultados sejam representativos de ambas as raças como um todo, já que o presente estudo foi realizado somente com dez animais de cada raça. Além disso, outros fatores podem influenciar na estacionalidade reprodutiva, como nutrição e idade (DYRMUNDSSON, 1973; SASA, 2003; SILVA et al., 1987).

Contudo, os resultados obtidos no presente estudo implicam em um manejo reprodutivo diferenciado entre as fêmeas de ambas as raças. Para as fêmeas Santa Inês seria possível a implantação de duas estações de monta a cada oito meses. Para as fêmeas Romney Marsh, além da estação de monta durante o outono, período de atividade ovariana, se faz necessária a utilização de alguma técnica de indução do estro e da ovulação, caso se deseje realizar mais do que uma estação de monta no ano, e assim aumentar a produtividade do rebanho.

Tanto entre as fêmeas Santa Inês, mas principalmente entre as fêmeas Romney Marsh, foi detectada uma grande variação entre os indivíduos na duração do período sem atividade ovulatória. Entre as fêmeas lanadas, a duração do período sem atividade reprodutiva variou praticamente de cinco a nove meses no ano. Um fato questionável seria a possibilidade de se fazer seleção de indivíduos menos estacionais dentro de um determinado grupo. NOTTER e CHEMINEAU (2001) observaram que a seleção de ovelhas com menor estacionalidade reprodutiva tem causado uma diminuição e aumento nas concentrações plasmáticas de melatonina e prolactina noturnas, respectivamente.

Os resultados referentes às concentrações plasmáticas de melatonina confirmam a presença de um ritmo circadiano de secreção endógena dirigido pelo fotoperíodo, que foi largamente postulado em estudos anteriores (ARENDRT, 1995; MALPAUX et al., 1997; NOTTER e CHEMINEAU, 2001). Tais estudos mostraram que a secreção deste hormônio ocorre intensamente no período escuro, e permanece em níveis basais no período claro. O presente estudo também mostrou esse padrão de secreção nas quatro estações do ano (Figura 5).

A duração da secreção noturna de melatonina variou de acordo com a estação dentro de cada raça sendo que essa duração pareceu não estar relacionada com a atividade ovulatória das fêmeas Santa Inês e Romney Marsh, mas sim com a duração do escotoperíodo. Um ponto interessante é que nas fêmeas Santa Inês, a duração da secreção de melatonina entre os equinócios da primavera e do outono não diferiu muito entre si, sendo de 12,3 e 11,7 horas respectivamente. Já a duração da secreção noturna de melatonina nas fêmeas Romney Marsh foi significativamente diferente entre os dois equinócios (11,2 horas na primavera e 12,5 horas no outono), apesar do escotoperíodo ter praticamente a mesma duração (em torno de 12 horas). Embora esses resultados possam sugerir uma influência genética sobre essa característica, tais diferenças são conseqüências da significativa interação entre raça *versus* estação do que propriamente do efeito isolado da raça, o qual não foi significativo, segundo o modelo estatístico (Tabela 11). Além disso, a interação mostrou efeito da raça somente durante a primavera quando a duração da secreção foi maior nas fêmeas Santa Inês (Tabela 12) sendo essa informação pouco conclusiva. Em ambas as raças, a maior duração da secreção de melatonina foi observada no solstício de inverno, dia de maior duração do escotoperíodo (13,3 horas), que no solstício de verão, dia de menor duração do escotoperíodo (10,7 horas). Assim,

nas fêmeas de ambas as raças a duração da secreção de melatonina parece estar relacionada com a duração do escotoperíodo em todas as estações do ano, resultados conflitantes com aqueles obtidos com animais das mesmas raças na região sudeste do Brasil (COELHO, 2001; RODRIGUES, 2001; RODRIGUES et al., 2002) e concordantes com a literatura prévia (ARENDRT, 1995; GUERIN et al., 2000; MALPAUX et al., 1997).

A hipótese da duração da secreção de melatonina (BITTMAN e KARSH, 1984; YELLON et al., 1985) parece ser um dos mais importantes mecanismos pelo qual o animal regula a atividade reprodutiva de acordo com o ambiente.

Outra hipótese pela qual a melatonina controlaria a atividade reprodutiva em fêmeas ovinas seria a da coincidência (GUERIN et al., 2000), em que pressupõe que um determinado período do ritmo endógeno circadiano é sensível ao fotoperíodo e melatonina. Uma correta seqüência de eventos durante esta fase sensível seria o gatilho que levaria ao início da atividade reprodutiva. Este modelo independe da existência de um ritmo circanual endógeno. Ainda não se sabe exatamente em que momento do dia ocorreria esta fase sensível, o que dificulta a verificação desta hipótese.

A terceira e última hipótese, de acordo com a revisão feita por REITER (1991) seria a da amplitude. Esta hipótese é a menos aceita e, defende que as concentrações de melatonina exerceriam um efeito biológico somente quando atingisse um determinado valor, que varia de um indivíduo para outro, e assim desempenharia um papel no mecanismo regulador da atividade reprodutiva.

Muitos estudos têm mostrado diferenças genéticas nos valores de melatonina plasmática noturna entre animais (CHEMINEAU et al., 1996; ZARAZAGA et al., 1998a). De fato, as concentrações plasmáticas de melatonina parecem ser extremamente variáveis entre indivíduos, mas são muito estáveis no

mesmo indivíduo (CHEMINEAU et al., 1996; ZARAZAGA et al., 1998a). E mais, essa variabilidade apresenta alto coeficiente de herdabilidade (ZARAZAGA et al., 1998a). Chemineau et al. (1996) ainda reportam que a duração da secreção de melatonina também apresenta alta repetibilidade em ovelhas da raça Ile de France. O mecanismo responsável pela variação genética pode ter origem no tamanho da glândula pineal (COON et al., 1999) ou nas vias metabólicas de síntese da melatonina pela glândula pineal (ZARAZAGA et al., 1998b). O presente estudo não nos permite confirmar conclusivamente a existência de diferenças entre as raças estudadas ou até mesmo de indivíduos, apesar de ter sido observada uma forte tendência. Animais que apresentaram baixas concentrações plasmáticas ao longo do dia apresentaram o mesmo comportamento em todas as estações. O inverso também é válido. Existem evidências de que uma seleção para um maior período de atividade reprodutiva tem levado a uma diminuição nos valores de melatonina plasmática noturna (NOTTER e CHEMINEAU, 2001). Diante disto, surge a possibilidade de se fazer seleção de animais com maior período de atividade ovariana baseado nas concentrações plasmáticas de melatonina.

Não há dúvida que a melatonina desempenhe um papel importante na regulação da atividade reprodutiva sazonal de ovelhas, pois alguns trabalhos mostram que a administração de melatonina é capaz de induzir a atividade reprodutiva em ovelhas pinealectomizadas (BARRELL et al., 2000), em ovelhas em período de anestro (FORCADA et al., 1994), e em borregas em início de atividade reprodutiva (NOWAK et al., 1990) ou até aumentar a taxa de ovulação em ovelhas (FORCADA et al., 1994; NOËL et al., 1999). Porém, o mecanismo como isso ocorre, ainda não está totalmente elucidado. O que se sabe é que existem vários componentes essenciais como, tempo de exposição aos sinais

fotoperiódicos e histórico fotoperiódico do animal, ou seja, não é simplesmente um fator isolado como a duração da secreção de melatonina que controla a atividade reprodutiva das ovelhas, e sim, um conjunto de fatores que devem estar em total sincronia. E mais, a secreção de melatonina é controlada principalmente pelo fotoperíodo, mas também existem alguns outros fatores que podem modificar tal secreção, como o estado nutricional do animal (MARTIN et al., 2002).

A existência de um ritmo circadiano na secreção de prolactina também foi confirmada no presente estudo, sendo mais evidente nas ovelhas Romney Marsh em função dos valores médios da prolactina plasmática nestas fêmeas serem significativamente superiores aos das fêmeas Santa Inês, em todos os horários e em todas as estações (Tabelas 14 e 15). Este fato confirma a existência de diferenças genéticas em relação à secreção deste hormônio. De fato, concentração plasmática de prolactina sofre influência genética (SANTIÁGO-MORENO et al., 2000), e uma seleção de animais visando uma reprodução menos estacional é acompanhada por variação no perfil anual de prolactina (LINCOLN, 1990). Segundo Santiago-Moreno et al. (2005) diferenças entre raças nas concentrações plasmáticas de prolactina parecem ser mais um indicativo da sensibilidade do animal ao fotoperíodo do que uma causa da regulação da reprodução sazonal.

No presente estudo, apesar das diferenças genéticas nas concentrações de prolactina, fêmeas das duas raças apresentaram comportamentos sazonais semelhantes: as concentrações plasmáticas de prolactina diminuíram do verão até o inverno, aumentando novamente na primavera, corroborando com outros estudos (GOMEZ-BRUNET e LOPEZ-SEBASTIAN, 1991; SANTIAGO-MORENO et al., 2000) realizados com ovelhas da raça Manchega, caracterizada por apresentar uma reprodução mais contínua ao longo do ano. De acordo com

Santiágo-Moreno et al. (2005), em espécies ovinas selvagens o papel da prolactina na regulação sazonal da atividade reprodutiva não está totalmente descartado. Porém, diferenças observadas entre espécies, doméstica (Merino) e selvagem (Mouflon), na atividade reprodutiva e no tamanho testicular não podem ser atribuídas à prolactina porque ambas as espécies apresentaram semelhantes perfis sazonais deste hormônio. Ainda, no mesmo trabalho, não foi encontrada nenhuma correlação entre secreção sazonal de prolactina e amplitude de melatonina em carneiros selvagens e domésticos. Alguns trabalhos (MARTIN et al., 1999; MARTIN et al., 2002) indicam que o fotoperíodo e todo o eixo hormonal desempenham um papel maior no controle da atividade reprodutiva em machos ovinos de raça de região temperada (Suffolk) do que em raça de origem mediterrânea (Merino). Tudo isto indica um papel maior da melatonina e prolactina no eixo reprodutivo de animais que não sofreram elevado grau de domesticação.

Inicialmente, a maioria das espécies selvagens apresentava um período de inatividade sexual ao longo do ano, com o intuito de concentrar os nascimentos das crias na época de ambiente favorável, ou seja, na primavera. Este mecanismo fisiológico era essencial para a perpetuação da espécie. Com a domesticação, a pressão ambiental diminuiu, fazendo com que algumas espécies perdessem este comportamento sazonal reprodutivo. Vários componentes fisiológicos que regulam tal sazonalidade reprodutiva podem não ter sido extintos, apesar da mudança do comportamento reprodutivo ao longo dos anos. Assim, as flutuações sazonais observadas nas concentrações plasmáticas de melatonina e prolactina podem ter papel na função reprodutiva apenas nos animais de reprodução estacional, como as fêmeas Romney Marsh. As fêmeas Santa Inês, mesmo apresentando um comportamento reprodutivo quase não estacional,

provavelmente ainda não perderam os componentes fisiológicos reguladores da estacionalidade.

Santiágo-Moreno et al. (2005) observaram que carneiros selvagens originários e criados em latitudes semelhantes a carneiros domésticos mostraram uma maior estacionalidade reprodutiva, mesmo apresentando concentrações plasmáticas e duração de secreção de melatonina e prolactina semelhantes. Este fato confirma que espécies domésticas que sofreram modificações no comportamento reprodutivo ainda carregam em si características fisiológicas semelhantes aos seus antepassados.

Diferentes comportamentos na atividade ovulatória observados no presente trabalho, parecem não estar correlacionados diretamente com a secreção de melatonina nem de prolactina. Nas fêmeas Santa Inês o eixo endócrino melatonina-prolactina parece não exercer papel fundamental no controle da atividade reprodutiva. Já nas fêmeas Romney Marsh este eixo parece desempenhar algum papel, porém, exatamente qual e como, ainda não está esclarecido.

5. CONCLUSÕES

O presente experimento demonstrou que ovelhas lanadas Romney Marsh e deslanadas Santa Inês, criadas no Estado de São Paulo sob fotoperíodo natural, apresentaram comportamento da atividade ovariana distintos, ou seja, as fêmeas lanadas foram estacionais, enquanto que as fêmeas deslanadas apresentaram atividade ovulatória o ano todo.

O ciclo circadiano das concentrações plasmáticas de melatonina de ovelhas lanadas Romney Marsh e deslanadas Santa Inês apresentou um padrão sazonal idêntico, mas não apresentou um ritmo circanual. A duração da secreção noturna de melatonina acompanhou a duração do escotoperíodo de cada estação do ano.

O perfil plasmático de prolactina de ovelhas Romney Marsh foi mais elevado que ovelhas Santa Inês em todas as estações, mas o padrão sazonal foi idêntico. As concentrações plasmáticas foram mais elevadas na primavera e no verão que no outono e inverno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J.A.; FORCADA, F.; ZARAZAGA, L.; LOZANO, J.M. The incidence of luteal activity, as determined by peripheral plasma progesterone concentration, before the onset of the breeding season in the Rasa Aragonesa breed of sheep. **British Veterinary Journal**, v.152, p.353, 1996.

AMIRIDIS, G.S.; REKKAS, C.A.; FTHENAKIS, G.C.; VAINAS, E.; LYMBEROPOULOS, A.; CHRISTODOULOU, V.; BELIBASAKI, S. Progesterone concentration as na indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. **Theriogenology**, v.57, p.1143-1150, 2002.

ARENDRT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. London: Chapman Hall, 1995. 331p.

ARENDRT, J.; SYMONS, A.M.; ENGLISH, J.; POULTON, A.L. Melatonin and the seasonal breeding cycle in sheep. **Advances in Pineal Research**, v.2, p.135-139, 1987.

BARRELL, G.K.; THRUN, L.A.; BROWN, M.E.; VIGUIÉ, C.; KARSCH, F.J. Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. **Biology of Reproduction**, v.63, p.769-774, 2000.

BITTMAN, E.L.; KARSH, F.J. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. **Biology of reproduction**, v.30, p.585-593, 1984.

CHEMINEAU, P.; HEREDIA, I.B.; DAVEAU, A.; BODIN, L. High repeatability of the amplitude and duration of the nycthemeral rhythm of the plasma melatonin concentration in the Ile-de-France ewe. **Journal of Pineal Research**, v.21, p.1-6, 1996.

COELHO, L.A.; RODRIGUES, P.A.; NONAKA, K.O.; SASA, A.; BALIEIRO, J.C.C.; VICENTE, W.R.R.; CIPOLLA-NETO, J. Annual pattern of plasma melatonin and progesterone concentrations in hair and wool ewe lambs kept under natural photoperiod at lower latitudes in the southern hemisphere. **Journal of Pineal Research**, 2006. [Prelo].

COELHO, L.A.; RODRIGUES, P.A.; NONAKA, K.O.; SASA, A.; CIPOLLA-NETO, J. Annual pattern of plasma concentrations of melatonin in wool and hairless ewe lambs under natural photoperiod in southeast Brazil and their relationship with estrous incidence. In: EUROPEAN PINEAL AND BIOLOGICAL RHYTHMS SOCIETY SYMPOSIUM, 9., 2002, Aberdeen. **Anais...**, Aberdeen, 2002, p.96.

COELHO, L.A. **Estudo sobre a atividade cíclica reprodutiva e o perfil plasmático de melatonina em fêmeas ovinas, sob fotoperíodo natural, no**

Estado de São Paulo. Pirassununga, 2001. 127p. Tese de Livre Docência – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

COELHO, L.A.; RODRIGUES, P.A.; SASA, A.; CRIVELLENTI, T.L.; SILVA, E.C.F.; MALHEIROS, E.B. Breeding season length of wool and hair ewe lambs under subtropical conditions in Brazil. In: REUNIÓN DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 17., Havana, 2001. **Anais...**, Havana, 2001. CD ROM.

COON, S.L.; ZARAZAGA, L.A.; MALPAUX, B.; RAVALT, J.P.; BODIN, L. VOISIN, P.; WELLER, J.L.; KLEIN, D.C.; CHEMINEAU, P. Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzyme activities. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v.277, n.5, p.E792-797, 1999.

DYRMUNDSSON, Ó.R. Puberty and early reproductive performance in sheep. I. Ewe lambs. **Animal Breeding Abstracts**, v.41, n.6, p.273-284, 1973.

ENGLISH, J.; ARENDT, J.; SYMONS, A.M.; POULTON, A.L.; TOBLER, I. Pineal and ovarian response to 22 and 24 days in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.39, p.9-18, 1988.

ENGLISH, J.; POULTRON, A.L.; ARENDT, J.; SYMONS, A.M. A comparison of the efficiency of melatonin treatments in advancing oestrus in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.77, p.321-327, 1986.

FIGUEIREDO, E.A.D.; OLIVEIRA, E.R.; BELLAVER, C. **Performance dos ovinos deslanados no Brasil.** EMBRAPA - CNPC, 1980. 32 p. (Circular Técnica, 01).

FORCADA, F.; ZARAZAGA, L.; ABECIA, J.A. Effect of exogenous melatonin and plane of nutrition after weaning on estrous activity, endocrine status and ovulation rate in Salz ewes lambing in the seasonal anestrus. **Theriogenology**, p.1179-1193, 1994.

FRASER, S.; COWEN, P.; FRANKLIN, M.; FRANEY, C.; ARENDT, J. Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. **Clinical Chemistry**, v.29, p.396-397, 1983.

GALINA, M. A.; MORALES, R.; SILVA, E.; LÓPEZ, B. Reproductive performance of Pelibuey and Blackbelly sheep under tropical management systems in Mexico. **Small Ruminant Research**, v.22, p.31-37, 1996.

GOLDMAN, B.D. The circadian timing system and reproduction in mammals. **Steroids**, p.679-685, 1999.

GOMEZ-BRUNET, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Effect of season on plasma concentrations of prolactina and cortisol in pregnant, non-pregnant and lactating ewes. **Animal Reproduction Science**, v.26, p.251-268, 1991.

GUERIN, M.V.; DEED, J.R.; MATTHEWS, C.D. 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. **Journal of Biological Rhythms**, v.15, n.6, p.514-523, 2000.

HAFEZ, E.S.E. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. Part I: the breeding season in different environments. Part II: the breeding season in one locality. Part III: the breeding season and artificial light. Part IV: studies on the reproduction of the ewe. Part V: mating behavior and pregnancy diagnosis. **Journal of Agricultural Science**, v.42, p.189-265, 1952.

KÖPPEN, W. **Climatologia**. Buenos Aires: Panamericana, 1948. 478 p.

LINCOLN, G.A.; TORTONESE, D.J. Does melatonin act on dopaminergic pathways in the mediobasal hypothalamus to mediate effects of photoperiod on prolactin secretion in the ram? **Neuroendocrinology**, v.62, p.425-433, 1995.

LINCOLN, G.A.; CLARKE, I.J. Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. **Journal of Neuroendocrinology**, v.6, p.251-260, 1994.

LINCOLN, G.A. Correlation with changes in horns and pelage, but not reproduction, of seasonal cycles in the secretion of prolactin in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.285-296, 1990.

LINCOLN, G.A.; McNEILLY, A.S.; CAMERON, C.L. The effect of a sudden decrease or increase in day-length on prolactin secretion in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52, p.305-311, 1978.

MALPAUX, B.; VIGUIÉ, C.; SKINNER, D.C.; THEÉRY, J.C.; CHEMINEAU, P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. **Brain Research Bulletin**, v.44, p.431-438, 1997.

MALPAUX, B.; ROBINSON, J.E.; WAYNE, F.J.; KARSCH, F.J. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: Importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. **Journal of Endocrinology**, v.122, p.269-278, 1989.

MARTIN, G.B.; HÖTZEL, M.J.; BLACHE, D.; WALKDEN-BROWN, S.W.; BLACKBERRY, M.A.; BOUKHLIQ, R.; FISHER, J.S.; MILLER, D.W. 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. **Reproduction and Fertility Development**, v.14, p.165-175, 2002.

MARTIN, G.B.; TJONDRONEGORO, S.; BOUKHLIQ, R.; BLACKBERRY, M.A.; BRIEGEL, J.R.; BLACHE, D.; FISHER, J.A.; ADAMS, N.R. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep:

modification of endogenous rhythms by photoperiod. **Reproduction and Fertility Development**, v.11, p.355-366, 1999.

McNEILLY, A.S.; ANDREWS, P. Purification and characterization of caprine prolactin. **Journal of Endocrinology**, v.60, p.359-367, 1974.

MINTON, J.E.; COPPINGER, T.R.; SPAETH, C.W.; MARTIN, L.C. Poor reproductive response of anestrus Suffolk ewes to ram exposure is not due to failure to secrete luteinizing hormone acutely. **Journal of Animal Science**, v.69, p.3314-3320, 1991.

MISZTAL, T.; ROMANOWICZ, K.; BARCIKOWSKI, B. Seasonal changes of rhythms of melatonin and prolactin secretion in sheep have an opposite character. **European Journal of Endocrinology**, v.130, (Suppl. 2), p.116, 1994.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of domestic animals: nutrient requirements of sheep**. 6.ed. Washington: D.C., 1985. 99p.

NÖEL, B.; MANDIKI, S.M.N.; PERRAD, B.; BISTER, J.L.; PAQUAY, R. Terminal follicular growth, ovulation rate and hormonal secretion after melatonin pretreatment prior to FGA-PMSG synchronization in Suffolk ewes at the onset of the breeding season. **Small Ruminant Research**, v.32, p.269-277, 1999.

NOTTER, D.R.; CHEMINEAU, P. Nocturnal melatonin and prolactin plasma concentrations in sheep selected for fertility in autumn lambing. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2895-2901, 2001.

NOWAK, R.; RAJKUMAR, R.R.; WEBLEY, G.E.; RODWAY, R.G. Effect of prolonged exposure to exogenous melatonin on the onset and end of the breeding season and on the growth rate of ewe lambs. **British Veterinary Journal**, v.146, p.17-23, 1990.

PELLETIER, J. Evidence for photoperiodic control of prolactin release in rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, p.143-147, 1973.

REITER, R.J. Pineal gland interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. **Trends Endocrin. Met.**, v.2, p.13-29, 1991.

RIBEIRO, E.L A.; ROCHA, M. A.; SILVA, L.F. Aspectos reprodutivos em ovelhas Hampshire Down submetidas à monta contínua na região Norte do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.25, n.4, p.637-646, 1996.

RODA, D.S.; SANTOS, L.E.; CUNHA, E.A.; BIANCHINE, D.; FEITOZA, A.S.L. Desempenho de ovinos em sistema de acasalamento a cada oito meses. **Boletim da Indústria Animal**, v.50, n.1, p.49-54, 1993.

RODRIGUES, P.A.; COELHO, L.A.; NONAKA, K.O.; SASA, A.; CIPOLLA-NETO, J. Duration of melatonin night-time secretion in wool and hairless ewe lambs under natural photoperiod in southeast Brazil and its relationship with estrous incidence.

In: EUROPEAN PINEAL AND BIOLOGICAL RHYTHMS SOCIETY SYMPOSIUM, 9., 2002, Aberdeen. **Anais...**, Aberdeen, 2002, p.97.

RODRIGUES, P.A. **Avaliação da sazonalidade reprodutiva e perfil secretório de melatonina em ovelhas (*Ovis aries*) das raças Romney Marsh, Suffolk e Santa Inês**. Botucatu, 2001. 82p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

RODRIGUES, P.A.; COELHO, L.A.; NONAKA, K.O.; CIPOLLA-NETO, J.; VICENTE, W.R.R.; SASA, A.; SILVA, E.C.F.; TESTON, D.C.; CRIVELLENTI, T. Padrão sazonal das concentrações plasmáticas de melatonina em borregas da raça Santa Inês, sob fotoperíodo natural, no sudeste do Brasil. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2001, Ribeirão Preto. **Anais...**, Ribeirão Preto, 2001, p.83.

SANTIAGO-MORENO, J.; GÓMEZ-BRUNET, A.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; MALPAUX, B.; LÓPEZ-SEBÁSTINA, A. Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.416-429, 2005.

SANTIAGO-MORENO, J.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; GOMEZ BRUNET, A.; DEL CAMPO, A.; PICAZO, R.; LOPEZ SEBASTIAN, A. Nocturnal variation of prolactina secretion in the Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and domestic sheep (*Ovis aries*): seasonal changes. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.211-219, 2000.

SASA, A. **Efeitos da nutrição na atividade cíclica reprodutiva e nas concentrações plasmáticas de melatonina em ovelhas mantidas em pastagem e submetidas ao efeito macho durante o anestro sazonal**. Pirassununga, 2003. 86p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

SASA, A.; TESTON, D.C.; CRIVELLENTI, T.L.; RODRIGUES, P.A.; SILVA, E.C.F.; COELHO, L.A.; SCHALCH, E. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas durante o período de abril a novembro no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1150-1156, 2002.

SASA, A.; RODRIGUES, P.A.; TESTON, D.C.; COELHO, L.A.; CRIVELLENTI, T.L.; SILVA, E.C.F. Incidência sazonal de estros em borregas lanadas e deslanadas criadas no Estado de São Paulo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba, 2001a, p.383-384.

SASA, A.; TESTON, D.C.; SILVA, E.C.F.; CRIVELLENTI, T.L.; PÔRTO, M.S.C.S.; RODRIGUES, P.A.; COELHO, L.A. Perfil plasmático de progesterona e incidência mensal de ovulações silenciosas em borregas lanadas e deslanadas criadas no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 21., Goiânia, 2001. **Anais...** Goiânia, 2001b, p.16.

SILVA, A.E.D.F.; FOOTE, W.C.; RIERA, G.S.; UNANIAN, M.M. Efeito do manejo nutricional sobre a taxa de ovulação e folículos, no decorrer do ano, em ovinos deslançados no nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n.6, p.635-645, 1987.

SILVA, O.L.; FIGUEIRÓ, P.R.P. Efeito da época de cobertura sobre a fertilidade de ovelhas e mortalidade de cordeiros na raça Corriedale. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 17., 1980, Fortaleza. **Anais...** Viçosa, 1980. p.127.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS , version 8.0, 1995.

SWEENEY, T.; KELLY, G.; O'CALLAGHAN, D. Seasonal variation in long-day stimulation of prolactin secretion in ewes. **Biology of Reproduction**, v.60, p.128-133, 1999.

THIMONIER, J.; RAVAUULT, J.P.; ORTAVANT, R. Plasma prolactin variations and cyclic ovarian activity in ewes submitted to different light regimens. **Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.**, v.18, p.1229-1235, 1978.

WALTON, J.S.; McNEILLY, J.R.; McNEILLY, A.S.; CUNNINGHAM, F.J. Changes in concentrations of FSH, LH, prolactin and progesterone in plasma of ewes during the transition from anoestrus to breeding activity. **Journal of Endocrinology**, v.75, p.127-136, 1977.

WORTHY, K.; HARESIGN, W.; DODSON, S.; McLEOD, B.J.; FOXCROFT, G.R.; HAYNES, N.B. Evidence that the onset of the breeding season in the ewe may be independent of decreasing plasma prolactin concentrations. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.75, p.237-246, 1985.

WORTHY, K.; HARESIGN, W. Evidence that the onset of seasonal anoestrus in the ewe may be independent of increasing prolactin concentrations and daylength. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.69, p.41-48, 1983.

YELLON, S.M.; BITTMAN, E.L.; LEHMAN, M.N.; OLSTER, D.H.; ROBINSON, J.E.; KARSCH, F.J. Importance of duration of nocturnal melatonin secretion in determining the reproductive response to inductive photoperiod in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.32, p.523-529, 1985.

ZARAZAGA, L.A.; MALPAUX, B.; BODIN, L.; CHEMINEAU, P. The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 274, p.607-610, 1998a.

ZARAZAGA, L.A.; MALPAUX, B.; GUILLAUME, D.; BODIN, L.; CHEMINEAU, P. Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 274, n.6, E1086-1090, 1998b.