



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade Técnica de Lisboa



Estudo da Puberdade no Cavalo Puro-Sangue Lusitano em condições de manejo tradicional

Rita Sofia Costa Fernandes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientador: Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Co-orientador: Mestre Maria João de Sousa Ferreira Martelo Fradinho

Júri

Presidente: Doutor Rui Manuel Vasconcelos Horta Caldeira

Doutora Teresa de Jesus Silva Matos

Vogais - Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias, Professora Associada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa;
- Doutora Teresa de Jesus da Silva Matos, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
- Mestre Maria João de Sousa Ferreira Martelo Fradinho, na qualidade de especialista.

Lisboa 2009

Agradecimentos

Estas duas folhas foram provavelmente as mais delicadas de redigir. Não é de todo difícil fazer pesquisa para uma revisão bibliográfica, mas os sentimentos são algo exclusivo de cada pessoa: não têm autores que possamos citar, fórmulas ou métodos pré-definidos, nem carecem de tratamento estatístico. No entanto, os resultados obtidos não necessitam de discussão e levam inevitavelmente à conclusão de que um trabalho desta natureza é fruto de um esforço colectivo.

Esta tese, para além de um trabalho de natureza científica, foi um processo de descoberta que em muito contribuiu para o enriquecimento do meu percurso académico e pessoal. A essência de um trabalho de investigação é uma dicotomia. Por um lado, é um trabalho solitário – quantas vezes damos connosco a encarar o computador como a única companhia durante dias a fio, à medida que se desenrola o longo processo de pesquisa, escrita, inserção e tratamento de dados? No entanto, cada linha presente nesta tese reflecte um verdadeiro trabalho de equipa de quem me transmitiu muito da sua sabedoria, tanto académica como pessoal. Em muito tenho a agradecer a professores, profissionais, amigos e família, que me estenderam o seu apoio nas longas, e por vezes arriscadas, horas de trabalho de campo ou quando desvanecia a determinação durante o processo de escrita.

- Os meus agradecimentos à Doutora Graça Ferreira Dias pela oportunidade oferecida, pelo seu amor pela investigação e fé nos seus alunos. Pela orientação e, principalmente, pela oportunidade de enriquecer o meu conhecimento, com as suas argumentações científicas, sugestões nos capítulos da tese e incentivo para apresentação deste trabalho à comunidade científica.
- Um agradecimento especial deve ser feito à Mestre Maria João Fradinho, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela co-orientação e principalmente pela amizade e pelo bom convívio durante estes quase três anos de trabalho. Com ela aprendi como um trabalho desta natureza pode ter tanto de científico como de apaixonante. Obrigada pela lição de perseverança e de coragem que me fez, e ainda faz, querer continuar a trabalhar com o cavalo Lusitano.
- Da Fundação Alter Real, à Dr.^a Maria José Correia e toda a equipa responsável pela égua de Alter Real, pelas horas que disponibilizaram dos seus muito preenchidos dias, pelas horas ao sol e à chuva, pela boa disposição que sempre partilharam nas muitas visitas à coudelaria, um grande bem haja!

- Também da Fundação Alter Real, um obrigada ao Dr. Vítor Grácio pelo auxílio na recolha de amostras dos poldros da Coudelaria Nacional e ao Sr. Lucílio pelas longas caminhadas necessárias para trazer os poldros à manga.
- Da Faculdade de Medicina Veterinária, um muito obrigada à Doutora Luísa Mateus, pelo precioso auxílio durante os ensaios RIA e ao Professor Robalo da Silva pelo apoio nas determinações de testosterona.
- A todos os professores do Instituto Superior de Agronomia e da Faculdade de Medicina Veterinária que contribuíram para a minha formação académica. Em especial ao Professor Fernando Santos Ortega, por sempre fomentar o espírito crítico dos seus alunos; ao Professor João Pedro Bengala Freire pelo rigor que nos exigiu a todos os níveis e à Professora Luísa Falcão por ter inspirado o gosto pela investigação, e por me ter sugerido como auxiliar para o projecto do qual este estudo fez parte.

E, last but not least:

- Ao meu irmão Vasco, pelas intermináveis conversas ao telefone sobre “how to write a thesis” e por todo o apoio e motivação que me transmitiu para que enveredasse pelo mundo académico. Por acreditares em mim mano, um grande abraço!
- Aos meus pais, Eduardo e Fernanda, pela sólida formação dada até minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até à chegada a este mestrado, os meus eternos agradecimentos.
- À minha avó Maria, obrigada pelos bons almoços e jantares que alimentaram corpo e espírito ao longo dos anos deste trabalho.
- E não podia deixar de lado a família que fui construindo durante a minha passagem pelo I.S.A. Aos amigos, Catarina, Célia e Lídia, pelo seu companheirismo e carinho ao longo do curso. Em especial, um grande obrigada à Inês por ter desempenhado um papel fundamental durante a recta final de redacção deste trabalho, por sempre me incentivar e pela amizade incondicional.
- Por fim fica o agradecimento a quem utilizar esta tese de qualquer forma, pois é isso que faz com que todo este trabalho valha a pena. A riqueza do conhecimento é engrandecida pela sua partilha.

Resumo

Neste trabalho estudou-se a puberdade na raça Puro-Sangue Lusitano e avaliou-se o papel da leptina nesta fase. Poldras (n=14) e poldros (n=19) de um ano, e poldras (n=5) de dois anos de idade foram mantidos em regime extensivo. Nas fêmeas recolheu-se sangue da jugular a cada 11 dias para determinação da progesterona e leptina. Nos machos, recolheu-se sangue mensalmente para análise da leptina e testosterona. Entre Abril e Junho, 57,1% das fêmeas, entre 12,7 e 16,0 meses de idade ($13,9 \pm 0,37$) apresentaram ciclicidade ovária. Destas, 75% ovularam duas vezes e 25% uma vez. Nas poldras púberes a leptina plasmática tendeu a decrescer entre a fase pré-púbere e a ciclicidade ovária, e diminuiu no anestro ($p < 0,01$). A leptina diminuiu em todas as fêmeas entre Abril e Setembro. O peso vivo aumentou ao longo do estudo mas a condição corporal diminuiu, o que pode explicar a queda dos níveis de leptina. Apenas um poldro (5,3%) apresentou níveis de leptina compatíveis com a fase púbere (0,5ng/mL). A leptina plasmática foi mais elevada nos machos que nas fêmeas ($p < 0,01$). Este estudo sugere que a fase púbere pode ser influenciada pela leptina. Os resultados devem ser encarados como preliminares, sugerindo a necessidade de efectuar mais trabalhos nesta área.

Palavras chave: Cavalos; Puberdade; Progesterona; Testosterona; Leptina, Puro-Sangue Lusitano

Abstract

Study of the onset of puberty in the Lusitano horse in extensive systems

The objective of this work was to study puberty in Lusitano foals and to evaluate the role of leptin. One-year-old fillies (n=14) and colts (n=19), and two-year-old fillies (n=5) were kept under extensive management. Blood was collected from the jugular every 11 days from females for progesterone and leptin analyses. Monthly blood samples were obtained from males for testosterone and leptin determinations. Between April and June, 57.1% of the fillies, aged from 12.7 to 16.0 months (13.6 ± 0.7), displayed ovarian activity. Among these, 75% ovulated twice, and 25% ovulated only once. In pubertal fillies, plasma leptin concentration tended to decrease between pre-puberty and cyclicity, and further decreased during anestrus ($p<0.01$). Plasma leptin levels decreased in all fillies between April and September. Fillies' body weight increased from the pre-puberal period to cyclicity ($p<0.05$) and to anestrus ($p<0.01$). However, their body condition decreased throughout the experiment, which might explain leptin fall. Only one colt (5.3%) had testosterone concentrations above the puberty threshold (0.5ng/ml). Plasma leptin was higher in males than in females ($p<0.01$). This study suggests that puberty might be influenced by leptin. These results should be seen as preliminary, suggesting the need for further research in this area.

Keywords: Lusitano Horse; Puberty; Progesterone; Testosterone; Leptin.

Extended Abstract

Puberty is the time when mature gametes are first produced and reproductive competence begins. The age of the onset of puberty in horses varies with season of birth, photoperiod, immune status, breed and nutrition. In fillies, it is defined as the time of the first ovulation and it can be determined by measuring plasma progesterone levels. Spring born fillies can reach puberty during the following spring. In colts, estimate age of puberty can range from 8 to 22 months and it can be assessed by plasma testosterone concentration.

Leptin is a hormone synthesized by adipocytes and its plasma concentration reflects the amount of fat tissue in the body. It is thought to convey metabolic information to the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and has a permissive role in the onset of puberty. The objective of this study was to evaluate the onset of puberty in Lusitano colts and fillies and its relationship with leptin.

Fillies (n=14) and colts (n=19) were kept under extensive management. Blood was collected by venopuncture every 11 days from females for progesterone and leptin analyses. Monthly blood samples were obtained from males for testosterone and leptin determinations. Additionally, weight was also assessed to determine the percentage of mature weight of the animals at the onset of puberty. This data was complemented with body condition assessment. Moreover, between June and July, other fillies (n=5) of 2 years of age were included in this study for plasma progesterone analysis. The same colts were also studied the following year, when they were two years old.

Between April and June, 57.1% fillies, aged from 12.7 to 16.0 months (13.9 ± 0.37), displayed ovarian activity. Among these, 75% ovulated twice, while the remaining 25% ovulated only once in May. One of the fillies that ovulated twice displayed a spontaneous prolonged corpus luteum before entering anestrus. The average concentration of progesterone in one-year-old fillies was 7.4 ± 2.3 ng/mL. All except one exhibited a concentration of plasma progesterone above 5ng/mL, which is in accordance with the mid luteal phase.

The duration of the first period of ovarian cyclicity was inferior to two months, which is lower than the values observed for some other light breeds. All fillies entered anestrus by June, which was the month of highest photoperiod. This result might be due to nutritional factors instead of photoperiodic cues.

There was a significant difference between the weights registered between the pre-pubertal period and the onset of puberty ($p<0.05$) and between the pre-pubertal period and anestrus ($p<0.01$). However, although the fillies gained weight between the pubertal period and anestrus, that weight difference was not significant ($p>0.05$). The average weight at the

time of pubertal ovarian cyclicity was 308 ± 6.3 kg, which corresponded to 61.6% of mature body weight for the Lusitano horse. In this study there was no correlation between bodyweight and the entrance in puberty in fillies ($p > 0.05$).

There seems to be no relationship between weight and the entrance in puberty ($p > 0.05$).

During the sample period, all the two year old fillies ovulated twice and displayed an average progesterone concentration of 9.2 ± 1.2 ng/mL. This value was not significantly different from the levels of progesterone registered for one-year-old fillies.

Only one colt (5.3%) had testosterone concentrations above the puberty threshold (0.5ng/mL), between April and June. This colt exhibited the highest weight of all 19 animals (349kg) and it corresponded to 69.8% of mature body weight of the Lusitano.

In fillies, average plasma leptin concentration was 1.61 ± 0.06 ng/mL, with a maximum of 2.98 ng/mL. Although the fillies' weight increased, plasma leptin concentration tended to decrease between pre-puberty and cyclicity, and further decreased during anestrus ($p < 0.01$). There was no difference in plasma leptin levels between estrous cycle phases. In non-cyclic fillies leptin also decreased throughout the time of the experiment.

Although bodyweight increased, fillies' body condition decreased throughout the experiment, which might explain leptin fall. This study suggests that leptin might have to reach a threshold for fillies to enter puberty and to maintain ovarian cyclicity.

In one-year old colts, plasma leptin levels did not change significantly during the time of the experiment ($p > 0.05$). The average concentration of leptin in males was 2.0 ± 0.2 ng/mL. Plasma leptin levels were higher in males than in females ($p < 0.01$). Despite this fact, colts seemed to be less precocious on the onset of puberty. The results obtained during the second year of the experiment pertaining the two-year old colts, were not conclusive.

In this study, the results obtained for the Lusitano were similar to those of previous studies done on other light breeds and should be looked upon as preliminary, suggesting the need for further research in this area.

Índice Geral

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJECTIVO ZOOTÉCNICO DA PRODUÇÃO DE CAVALOS	2
1.2. MANEIO PRODUTIVO TRADICIONAL DO PSL EM PORTUGAL	2
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. ENDOCRINOLOGIA GERAL DA REPRODUÇÃO	4
2.2. ESPECIFICIDADES REPRODUTIVAS DA ÉGUA	6
2.2.1. Anatomia reprodutiva da égua	6
2.2.2. Controlo endócrino da reprodução da égua	7
2.2.2.1. Sazonalidade reprodutiva	8
2.2.2.2. O ciclo éstrico	10
2.2.2.3. Comportamento de receptividade sexual	12
2.2.3. Puberdade na égua	13
2.2.3.1. Idade de entrada na puberdade em poldras	14
2.2.3.2. Desenvolvimento dos órgãos reprodutores.....	18
2.2.3.3. Controlo endócrino da puberdade na égua	19
2.3. ESPECIFICIDADES REPRODUTIVAS DO GARANHÃO	26
2.3.1. Anatomia reprodutiva do garanhão	26
2.3.2. Controlo endócrino da reprodução no garanhão	27
2.3.2.1. Sazonalidade reprodutiva	27
2.3.2.2. Controlo endócrino da espermatogénese	29
2.3.3. A puberdade no garanhão	33
2.2.3.1. Idade de entrada na puberdade em poldros	33
2.2.3.2. Desenvolvimento do aparelho reprodutivo	35
2.2.3.3. Controlo endócrino da puberdade no garanhão.....	37
2.4. EFEITO DA NUTRIÇÃO SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS	44
2.4.1. A leptina	45
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1. ANIMAIS	49
3.1.1. Maneio Geral	50
3.2. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	52
3.3. HORMONAS	52
3.3.1. Progesterona	52

3.3.2. Testosterona.....	53
3.3.3. Leptina.....	53
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA E TRATAMENTO DE DADOS	54
4 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	55
4.1. POLDRAS	55
4.1.1. Idade de entrada na puberdade em poldras PSL.....	55
4.1.1.1 <i>Efeito da idade sobre a entrada na puberdade</i>	<i>56</i>
4.1.2. Efeito da sazonalidade sobre o momento de entrada na puberdade	57
4.1.3. Duração da ciclicidade ovárica e número de ovulações	58
4.1.4. Efeito da nutrição sobre o primeiro período de estro sazonal	60
4.2. IDADE DE ENTRADA NA PUBERDADE DE POLDRAS PSL	62
4.2.1. Resultados de 2007.....	62
4.2.1.1. <i>Leptina</i>	<i>65</i>
5 – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

Índice de Quadros

Quadro 2.1. Idade média de entrada na puberdade determinada por diferentes autores e para diferentes raças em fêmeas da espécie <i>Equus caballus</i>	15
Quadro 2.2. Percentagem do peso vivo adulto médio (maturidade) no momento de entrada na puberdade, determinada em estudos anteriores realizados em fêmeas do <i>Equus caballus</i>	17
Quadro 2.3. Valores de testosterona em garanhões adultos durante a época reprodutiva e a época correspondente ao anestro sazonal das éguas.....	32
Quadro 2.4. Idade média de entrada na puberdade determinada por diferentes autores e para diferentes raças em machos da espécie <i>Equus caballus</i>	34
Quadro 3.1. Composição química do alimento composto complementar fornecido a todos os animais (informação fornecida na rotulagem).	50

Índice de Figuras

Figura 2.1. O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal na égua. GnRH, hormona libertadora gonadotrofinas; LH, hormona luteotrófica; FSH: hormona foliculo-estimulante; PGF2 α , prostaglandina F2 α (adaptado de Morel, 2003)	7
Figura 2.2. Controlo hormonal da ciclicidade ovárica sazonal da égua. Interregulação da glândula pineal, hipotálamo, hipófise e ovários (adaptado de Blanchard <i>et al.</i> , 2003).	8
Figura 2.3. Fases do ciclo reprodutivo da égua.	10
Figura 2.4. O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, evidenciando as principais hormonas e mecanismos de <i>feedback</i> do controlo endócrino da reprodução no garanhão. GnRH, hormona libertadora gonadotrofinas; FSH, hormona foliculo-estimulante; LH, hormona luteotrófica (adaptado de Morel, 2003).	27
Figura 2.5. Mecanismo da espermatogénese	30
Figura 2.6. Modelo teórico proposto por Barb e Kraeling para a acção da leptina na regulação da reprodução em animais domésticos (NPY, neuropeptido Y; PMCO, proopiomelanocortina; GnRH, hormona libertadora de gonadotrofinas; LH, hormona luteotrófica; ϵ , estrogéneos (adaptado de Barb e Kraeling, 2004).	46
Figura 4.1. Número médio de horas de luz por mês, à latitude de 39° N (Doorembos e Pruit, 1977).....	55
Figura 4.2. Curvas individuais da concentração plasmática de progesterona de poldras F1 nos meses em que os níveis de progesterona foram compatíveis com a actividade ovárica cíclica.	55
Figura 4.3. Poldras F1 (%) que ovularam pela primeira vez, por cada grupo etário (n=8).....	56
Figura 4.4. Poldras PSL de um ano de idade (%) que exibiram ciclicidade ovárica (CO) ou anestro (ANE) entre Abril e Setembro (n=14)	57

Figura 4.5. Curvas individuais de concentração de progesterona em éguas PSL de dois anos de idade (F2).	59
Figura 4.6. Evolução do peso e da concentração plasmática de leptina na fase pré-pubere (PP), na fase de ciclicidade ovárica (CO) e na fase de anestro (ANE) das poldras púberes (n=8).	60
Figura 4.7. Curvas individuais de concentração plasmática de testosterona em poldros PSL, por mês e por poldro.	62
Figura 4.8. Número de poldros PSL que evidenciaram concentrações plasmáticas de testosterona (T) nos meses em que houve detecção de T plasmática.	63
Figura 4.9. Concentração plasmática média de leptina em poldros e poldras PSL, por escalão etário.	65

Lista de Abreviaturas

ACTH (hormona adrenocorticotrófica)
ANE (anestro)
AR (Alter Real)
CC (condição corporal)
CL (corpo lúteo)
CN (Coudelaria Nacional)
CO (ciclicidade ovárica)
ε (Estrogénios)
EIA (métodos enzimáticos)
FSH (hormona folículo-estimulante)
GABA (Ácido gama-aminobutírico)
GH (hormona do crescimento)
GnRH (hormona libertadora de gonadotrofinas)
LH (hormona luteotrófica)
n.d. (não definido)
NE (nível elevado)
NM (nível moderado)
NPY (Neuropéptido Y)
P4 (progesterona)
PGF_{2α} (Prostaglandina F_{2α})
PMCO (Propiomelanocortina)
PRL (prolactina)
PSI (Puro-Sangue Inglês)
PSL (Puro-Sangue Lusitano)
PTA (proteína transportadora de androgéneos)
PTE (produção total de espermatozóides)
PV (peso vivo)
PVA (peso vivo adulto)
RIA (Rádio-imunoensaios)
RL (receptores da leptina)
SNC (sistema nervoso central)
T (testosterona)
TH (hormona da tiróide)
TSH (hormona estimulante da tiróide)
VT (volume testicular)

1. Introdução

Desde o tempo pré-histórico que o homem estabeleceu uma relação de simbiose com o cavalo. O cavalo foi sem dúvida o grande veículo da conquista da terra pelo homem (Vicente, 2001), tendo sido utilizado até há menos de um século como uma importante força motriz nos transportes, na agricultura e na indústria. A substituição dos veículos de tracção animal por veículos motorizados veio a alterar a importância do cavalo no mundo ocidental, convertendo-o sobretudo num animal de lazer e desporto, cuja raça reflecte o fim para o qual se seleccionou o animal. A sua importância para a economia foi desde então drasticamente reduzida, apesar da indústria das corridas de cavalos representarem em alguns países uma importante fonte de receitas.

As várias raças do *Equus caballus* (cavalo doméstico) são membros da família Equidae e pertencem à ordem Perissodactyla. Existem evidências da existência de cavalos na Península Ibérica desde o período Pleistoceno (Gonzaga, 2004 citado em Luís *et al.*, 2006). O cavalo peninsular contribuiu para a formação de muitas das raças modernas, entre as quais a raça Puro-Sangue Lusitano (PSL), descendente directa do ginete ibérico, tão valorizado pela sua agilidade, força e “nobreza”. A raça PSL é a principal e mais importante raça de cavalos autóctones em Portugal, sendo produzida principalmente no Alentejo e Ribatejo (Luís *et al.*, 2006). Apesar da designação “Lusitano” ter nascido em 1942, o primeiro *Stud Book* do Lusitano só foi criado em 1967 e nasceu da necessidade de demarcar as características morfo-funcionais (Anexo I) que o distinguem do cavalo de Pura Raça Espanhola (Monteiro, 1983). Actualmente, existem cerca de 2000 éguas reprodutoras em Portugal, e outras 2000 a nível mundial, concentradas em França, no Brasil e no México (Luís *et al.*, 2006).

O cavalo PSL foi seleccionado como animal de caça e de combate e tem-se mantido praticamente inalterado ao longo dos séculos (Cordeiro, 1997). A sua principal vocação é a tauromaquia mas, actualmente, as preferências funcionais das diferentes coudelarias têm vindo a proporcionar produtos com aptidão para ensino, obstáculos, atrelagem e equitação de trabalho. Os PSL também são utilizados no campo da equitação clássica, outra das bases da sua selecção, da qual é boa representante a Escola Portuguesa de Arte Equestre. Nela são utilizados cavalos da coudelaria de Alter Real situada em Alter do Chão e fundada em 1748. Foi predominantemente sobre estes animais que incidiu o presente trabalho.

1.1. OBJECTIVO ZOOTÉCNICO DA PRODUÇÃO DE CAVALOS

O principal objectivo da produção de cavalos é a obtenção de um poldro por égua e por ano. Apesar de em alguns países europeus se produzirem animais exclusivamente para a obtenção de carne para consumo humano, a grande maioria dos animais destina-se ao lazer ou ao desporto. Neste contexto de mercado, o cavalo em si é o produto final e ao objectivo principal de produção supramencionado, acrescenta-se a necessidade de obtenção de um produto de qualidade, ou seja, a criação de um animal com as características físicas e psíquicas ideais para desempenhar a função desejada pelo comprador.

A selecção de reprodutores nos cavalos reveste-se de uma grande complexidade. Ao contrário do que sucede com as principais espécies de interesse zootécnico cujos objectivos e aptidões zootécnicas estão muito bem definidos, o cavalo não foi seleccionado directamente pela eficiência reprodutiva ou pelas características produtivas quantificáveis, mas sim pela sua performance desportiva (Hafez e Hafez, 2000a). Na produção de cavalos, a aprovação de um reprodutor inclui a avaliação de características comportamentais, morfológicas e de funcionalidade, que são sujeitas a apreciação subjectiva e não são directamente mensuráveis. Este tipo de selecção leva a que por vezes sejam aprovados animais que, apesar do seu mérito desportivo, apresentam problemas reprodutivos (Morel, 2003).

Outra das complexidades da produção de cavalos prende-se com os custos de produção. Optar por produzir um cavalo ao menor custo de produção pode comprometer o futuro desportivo do animal, sendo essencial o acesso ao exercício e um bom acompanhamento em termos nutricionais.

1.2. MANEIO PRODUTIVO TRADICIONAL DO PSL EM PORTUGAL

Em termos reprodutivos, os cavalos são animais de dias-longos, uma vez que a sua actividade reprodutiva se concentra geralmente durante a Primavera e o Verão (Daels e Hughes, 1993). Várias associações de criadores no hemisfério Norte definiram como data oficial de nascimento o dia 1 de Janeiro e a época de cobrição oficial de Fevereiro a Junho. Independentemente da data real de nascimento do animal, todos os poldros nascidos em determinado ano têm a mesma idade (Cebulj-Kadunc *et al.*, 2006).

Em Portugal o período reprodutivo oficial estende-se de 15 de Fevereiro a 15 de Junho (Vicente, 2001). O objectivo quantitativo da produção de cavalos é conseguir um poldro por égua e por ano. Pretende-se que o poldro nasça nos primeiros meses do ano, para que a época de maiores necessidades da égua (lactação) coincida com o pico da erva primaveril. Por outro lado, assume-se que quanto mais cedo nascer o poldro, maior

vantagem terá sobre poldros de outras coudelarias nos concursos de modelo e andamentos para animais jovens.

Na generalidade dos casos, a produção equina em Portugal assenta no modelo extensivo ou semi-extensivo. Apesar de se explorarem em pleno as capacidades reprodutivas da égua o manejo alimentar assenta sobretudo sobre as pastagens, espontâneas ou melhoradas, existindo casos em que não são disponibilizados feno e/ou alimentos concentrados complementares. As condições climáticas das regiões mediterrânicas levam a que o pico da erva ocorra na Primavera e é também nesta altura em que se concentram os partos e as cobrições. As fêmeas, denominadas éguas reprodutoras ou de ventre, são geralmente postas à cobrição ao terceiro ano de vida. A sua principal utilização é a reprodução e são raros os animais que desenvolvem uma carreira desportiva, apesar de o desbaste das éguas ser uma prática cada vez mais corrente. O desbaste corresponde à fase inicial de treino do cavalo, que inclui operações de manipulação no estábulo, trabalho de guia e treino montado.

De forma semelhante ao que sucede com os garanhões, as éguas PSL são avaliadas e pontuadas de acordo com as exigências do padrão da raça (modelo e andamentos) antes de serem aceites como reprodutoras.

Em Portugal os garanhões são utilizados para lazer, desporto e/ou reprodução. O início da actividade reprodutiva acontece comparativamente mais tarde que nas outras espécies pecuárias. Apesar de se considerar que uma vez atingida a puberdade o animal está pronto a desempenhar a função reprodutiva, nos cavalos é necessário que este preste provas da sua aptidão para se tornar um reprodutor, o que atrasa o progresso genético. Os machos Lusitanos adultos podem entrar à reprodução a partir dos 3 anos, mas o mais vulgar é que o início da actividade reprodutiva se dê aos 6.9 ± 3.6 anos (Vicente, 2001), em virtude de ter de ser pontuado e aprovado como garanhão através de uma prova morfo-funcional, e/ou conquistar uma carreira desportiva considerável.

Face ao interesse em conhecer melhor a principal raça autóctone portuguesa de equinos, neste trabalho propõe-se estudar a entrada na puberdade do cavalo PSL, nas condições de temperatura e de fotoperíodo do território de Portugal continental e tendo em consideração o manejo típico dos núcleos de Alter Real (machos e fêmeas) e Coudelaria Nacional (machos). Para tal, determinaram-se as concentrações plasmáticas de progesterona e testosterona em poldras e poldros, respectivamente, e procurou determinar-se a influência da concentração plasmática de leptina na puberdade. A determinação da entrada na puberdade do cavalo PSL foi uma das componentes contempladas no projecto POCI 2010 nº GG/GGP/ME611-0166/05.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ENDOCRINOLOGIA GERAL DA REPRODUÇÃO

A actividade das gónadas é controlada pelo hipotálamo e hipófise anterior. O hipotálamo é o centro da integração de dois grandes determinantes da sobrevivência das espécies: o metabolismo energético e a função reprodutiva. Este processo assenta sobre subpopulações de neurónios especializados que recebem sinais metabólicos periféricos, e através deles, operam um controlo sobre o balanço energético e a capacidade reprodutiva (Gamba e Pralong, 2006).

O hipotálamo localiza-se na base do cérebro e é responsável pela regulação da temperatura, do apetite e da reprodução (Davidson e Stabelfeldt, 1999). Esta estrutura ocupa uma posição central e possui agrupamentos neuronais designados núcleos. O núcleo supra-óptico e núcleo paraventricular são responsáveis pela segregação de hormonas de natureza peptídica que se deslocam para a hipófise por intermédio dos axónios neuronais ou pelo sistema vascular porta (Davidson e Stabelfeldt, 1999). É o caso da hormona estimulante das gonadotrofinas (GnRH), uma hormona hipofisiotrófica que é segregada na área pré-óptica do hipotálamo. Cerca de 80% da GnRH segregada é transportada para a eminência média, libertada no seu interior, transitando pelo sistema porta para a hipófise anterior, onde vai estimular a secreção de gonadotrofinas. Os restantes 20% afectam o comportamento passando para o sistema nervoso central (Morel, 2003). A GnRH apresenta um padrão de secreção pulsátil, fazendo com que principal padrão de secreção das gonadotrofinas pela hipófise também o seja (Ginther, 1992). A saturação dos receptores de GnRH dos gonadotrofos interrompe o sinal intracelular para a síntese e libertação da hormona luteotrófica (LH) e da hormona folículo-estimulante (FSH). No caso das gonadotrofinas femininas, o estado endócrino do ovário influencia a frequência e amplitude dos pulsos de GnRH. A preponderância da progesterona faz com que diminua a frequência mas aumente a amplitude dos pulsos, ao passo que os estrogénios surtem o efeito contrário (Davidson e Stabelfeldt, 1999).

A hipófise é composta de três partes distintas: um lobo anterior designado adeno-hipófise (*pars distalis*), um lobo intermediário (*pars intermedia*) e um lobo posterior, a neuro-hipófise (*pars nervosa*), que constitui um prolongamento do hipotálamo para dentro da hipófise. É na adeno-hipófise que são produzidas as hormonas tróficas: a hormona folículo-estimulante (FSH), a hormona luteotrófica (LH), a hormona do crescimento (GH), a hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e a hormona estimulante da tiróide (TSH), cujos efeitos são o estímulo da produção hormonal por órgãos endócrinos específicos localizados perifericamente à hipófise (Davidson e Stabelfeldt, 1999). A prolactina (PRL) também é

produzida na adeno-hipófise, desempenha um papel importante na lactogénese e está envolvida nos mecanismos de sazonalidade (Ginther, 1992). As hormonas sintetizadas pela neuro-hipófise, por outro lado, podem provocar directamente a resposta tecidual desejada (Davidson e Stabelfeldt, 1999).

A regulação da secreção de hormonas proteicas pela *pars distalis* é feita através de mecanismos de *feedback*, negativo ou positivo, que pode depender do local de acção e da concentração da hormona responsável por esse mecanismo. O *feedback negativo* sobre o eixo hipotálamo-hipofisário corresponde à inibição da secreção de uma hormona a nível do hipotálamo e/ou da hipófise por acção de um sinal hormonal. Esse sinal pode ter origem dentro do próprio eixo hipotálamo-hipofisário ou em tecidos periféricos.

O *feedback positivo* corresponde à situação inversa, em que o sinal hormonal com origem dentro ou fora do eixo hipotálamo-hipofisário potencia a secreção de hormonas pela *pars distalis*. É o que sucede com, por exemplo, os estrogénios, cujo aumento súbito no final do desenvolvimento folicular antral promove um aumento da secreção de GnRH a nível do hipotálamo, desencadeando uma “onda” pré-ovulatória de LH que provoca a ovulação (Ginther, 1992). Este mecanismo ocorre por acção dos estrogénios sobre a região hipotalâmica pré-óptica anterior em vez de sobre o núcleo arqueado, como no caso do *feedback negativo* dos estrogénios (Davidson e Stabelfeldt, 1999).

2.2. ESPECIFICIDADES REPRODUTIVAS DA ÉGUA

2.2.1. Anatomia reprodutiva da égua

O aparelho reprodutor da égua é um sistema de elevada complexidade, concebido para maximizar as hipóteses de fertilização e manutenção do embrião até ao termo final da gestação. Tem o formato de um Y e é composto por uma região externa de protecção, e uma região interna, responsável pela fertilização e pelo desenvolvimento embrionário (Ginther, 1992; Morel, 2003).

Região externa

- Vulva – área externa do sistema reprodutivo da égua, tem a função de protecção da entrada da vagina.
- Périneo – região entre a vulva e o ânus. Tem essencialmente uma função de protecção do tracto genital. Junto com a vulva, compõe um dos três selos de protecção do tracto genital, o selo vulvar, que impede a entrada de ar e bactérias.
- Vagina – estrutura tubular de 18 a 23 cm de comprimento e 10-15 cm de diâmetro que tem como função a protecção e limpeza do sistema reprodutivo, pois secreta agentes bactericidas. A composição das secreções vaginais depende das alterações hormonais cíclicas. As paredes da vagina compõem o selo vestibular.
- Cérvix – composto de um esfíncter muscular que se encontra à entrada do útero. Forma o selo cervical e actua na protecção do tracto genital. A sua dimensão depende do perfil hormonal da égua: nas éguas não receptivas, encontra-se fortemente contraído; nas éguas sexualmente receptivas, o *tonus* muscular sofre uma redução (Morel, 2003).

Região interna

- Útero – a metade cranial do útero da égua consiste em dois cornos uterinos, e a parte caudal é composta por um único corpo uterino. Nas éguas, a relação de tamanho entre as duas áreas é diferente da de outros animais domésticos, uma vez que os cornos são proporcionalmente mais pequenos. É um órgão muscular cujo tamanho é afectado pela idade e número de partos, sendo maior em animais mais velhos e múltiparos. As suas paredes são compostas por três camadas: o perimétrio (camada serosa externa), miométrio (camada muscular central) e endométrio (membrana do tipo mucosa que reveste o útero internamente). É no endométrio que se situam as glândulas endometriais responsáveis pela libertação de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e o seu funcionamento é regulado por mudanças hormonais cíclicas.

- Oviductos – trata-se da continuidade dos cornos uterinos. A zona mais perto dos cornos uterinos designa-se istmo. A zona junto aos ovários denomina-se ampula e é nesta que ocorre a fertilização. A ampula termina no infundíbulo, que está associado à fossa ovulatória, estrutura exclusiva da égua e local único da ovulação.
- Ovários – são em número par, e têm a forma de feijão. A sua função é citogénica (produção de gâmetas) e endócrina (secreção de hormonas). A sua dimensão depende do estado reprodutivo da égua, sendo maior em éguas durante a ciclicidade ovárica sazonal. É rodeado pela túnica albugínea, com excepção da fossa ovulatória (Morel, 2003).

2.2.2. Controlo endócrino da reprodução na égua

A actividade reprodutiva na égua é determinada por alterações hormonais que por sua vez desencadeiam outras alterações fisiológicas e comportamentais (figura 2.1). Geralmente as hormonas reprodutivas apresentam uma secreção tónica que corresponde aos designados níveis basais. No entanto, para produzir uma resposta fisiológica, é muitas vezes necessário que ocorra aumento da secreção da hormona, seja de uma forma progressiva mais ou menos brusca, ou através do aumento da intensidade e frequência dos pulsos (Morel, 2003). A égua apresenta, ao longo da sua vida, várias fases de actividade ou inactividade reprodutiva, cada uma apresentando o seu próprio conjunto de interacções hormonais e respectivas respostas fisiológicas, dependendo do grau de maturação (pré-pubere e adulto) e da sensibilidade (estro e anestro) do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal.

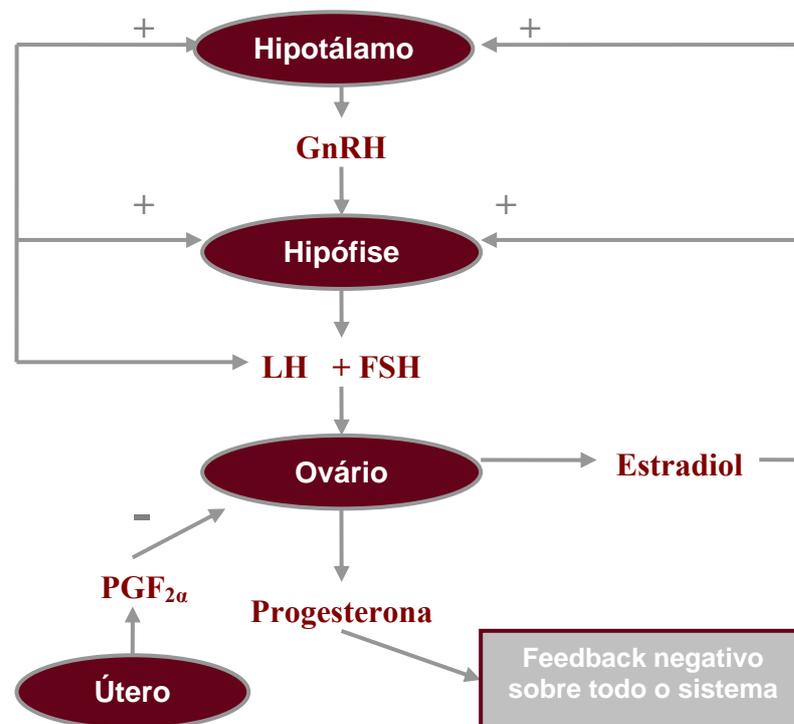


Figura 2.1. O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal na égua. GnRH, hormona libertadora gonadotrofinas; LH, hormona luteotrófica; FSH: hormona foliculo-estimulante; PGF_{2α}, prostaglandina F_{2α} (adaptado de Morel, 2003).

2.2.2.1. Sazonalidade reprodutiva

As éguas são animais poliéstricos estacionais de dias longos, exibindo uma série de ciclos éstricos em intervalos regulares durante a Primavera e Verão (Daels e Hughes, 1993), os quais podem estender-se até ao Outono (Ginther, 1992). De um modo geral, o período de ciclicidade ovárica está compreendido entre Abril e Novembro no hemisfério Norte e entre Outubro e Maio no hemisfério Sul, correspondendo em média a 8-12 ciclos por égua (Morel, 2003). No hemisfério Norte, as associações de criadores estabeleceram o dia um de Janeiro como o dia oficial de nascimento dos poldros e a época oficial de cobertura de Fevereiro até Junho (Ginther, 1992). A duração do período de estro sofre uma variação individual e está dependente da genética, apresentando os cavalos ditos de sangue quente (a generalidade dos cavalos de desporto) períodos de estro mais longos que os pôneis ou cavalos de tipo pesado (Morel, 2003). O período de anestro sazonal do *Equus caballus* ocorre geralmente durante os meses de Inverno (Sharp e Davies, 1993; Ginther, 1992).

Este padrão reprodutivo sazonal encontra-se sob o controlo do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e é resultado de uma cinética hormonal específica que está sujeita à influência do fotoperíodo (Kooistra e Ginther, 1975; Wesson e Ginther, 1982; Ginther, 1992; Brown-Douglas *et al.*, 2004; Donadeu e Watson, 2007), da temperatura ambiental (Nogueira *et al.*, 1997; Morel, 2003), da nutrição, da condição corporal (Ferreira-Dias *et al.*, 2005; Waller *et al.*, 2006) e da presença ou ausência do garanhão (Nagy *et al.*, 2000).

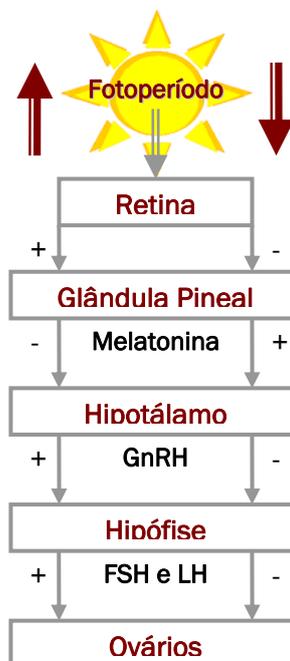


Figura 2.2. Controlo hormonal da ciclicidade ovárica sazonal da égua. Interregulação da glândula pineal, hipotálamo, hipófise e ovários (adaptado de Blanchard *et al.*, 2003).

O fotoperíodo é provavelmente o factor ambiental mais importante para a reprodução sazonal em regiões temperadas (Ginther, 1992). A glândula pineal é o órgão responsável pela tradução dos sinais do fotoperíodo recebidos pela retina em sinais endócrinos, através da secreção de melatonina (Morel, 2003). Os receptores para esta hormona encontram-se no hipotálamo, mas a sua acção não é directa, implicando um grande número de neurotransmissores (Malpaux *et al.*, 1999). A secreção de melatonina apresenta um ritmo circadiano. Durante o período de escuridão, a secreção de melatonina é estimulada pela norepinefrina, sendo a sua concentração plasmática média diária superior no Outono e Inverno que na Primavera e no Verão (Wesson *et al.*, 1979). À medida que o número de horas de luz decresce, a secreção de melatonina aumenta, inibindo a actividade do eixo hipotálamo-hipofisário. Por outro lado, quando ocorre um aumento gradual das horas de luz, a inibição da melatonina sobre o centro gerador de pulsos do hipotálamo vai-se esbatendo, levando ao aumento da secreção de GnRH e, conseqüentemente, da libertação de FSH e LH (Fitzgerald *et al.*, 1985) (figura 2.2). Num estudo conduzido em 1982 por Palmer e Driancourt, verificou-se que as éguas possuem uma fase fotossensível durante o período de escuridão. Para estes autores, o número de horas de luz foi menos importante que a duração do período de escuridão uma vez que, desde que este não ultrapassasse 9,5 horas, a resposta era idêntica, independentemente da combinação entre horas de luz e de escuridão.

Para além da melatonina, outros sinais poderão estar implicados no início e/ ou término do período de ciclicidade. É o caso dos neurotransmissores da família dos opióides (Aurich *et al.*, 1994), das catecolaminas (Fitzgerald e Mellbye, 1988), dos aminoácidos neuro-estimuladores (Fitzgerald, 1996) e das hormonas da tiróide (Fitzgerald e Davison, 1998). No grupo das catecolaminas há que mencionar a dopamina, que possui receptores no ovário equino e que influencia a secreção de prolactina. A prolactina sofre um aumento da concentração plasmática durante a Primavera e está relacionada com alterações fisiológicas como a muda de pêlo (Donadeu e Thompson, 2002). Uma vez que esta hormona parece aumentar a sensibilidade dos receptores de gonadotrofinas durante a recrudescência primaveril em roedores (Bex *et al.*, 1978), os seus efeitos sobre a aparência do animal podem ser uma indicação do seu estado de capacidade reprodutiva. Para além disso, aumenta a eficiência de conversão alimentar durante o período de Inverno, que é tipicamente uma época de carência alimentar (Morel, 2003).

Algumas éguas não interrompem a actividade reprodutiva, continuando a ciclar durante o período típico de anestro. Em latitudes mais moderadas, o comportamento de estro durante o Inverno pode ser influenciado pela nutrição e pela condição corporal, factores associados à leptina, hormona segregada pelos adipócitos e que influencia a secreção de GnRH (Ferreira-Dias *et al.*, 2005; Cebulj-Kadunc e Cestnik, 2005). Num estudo

realizado à latitude 39° 12'N, com éguas Lusitanas em boa condição corporal, verificou-se que existia uma tendência para os animais com maiores níveis plasmáticos de leptina não cessarem a ciclicidade ovárica (Ferreira-Dias *et al.*, 2005).

2.2.2.2. O ciclo éstrico

A égua inicia a ciclicidade ovárica na puberdade e, exceptuando durante a fase de anestro sazonal, manifesta-a durante toda a vida, mesmo quando em lactação (Morel, 2003). Cada ciclo éstrico dura em média 21 dias (20-22 dias), e subdivide-se em dois períodos: o diestro e o estro. O diestro corresponde normalmente a 16 dias e durante este período a égua rejeita o garanhão. O estro estende-se por 4-5 dias, e corresponde ao tempo durante o qual a égua está sexualmente receptiva (Morel, 2003). A ovulação ocorre 24-36 horas antes do final do estro e é designada pelo dia 0. Os dias 1-21 denotam o restante ciclo até ocorrência de nova ovulação (Ginther, 1992), como se ilustra na figura 2.3.

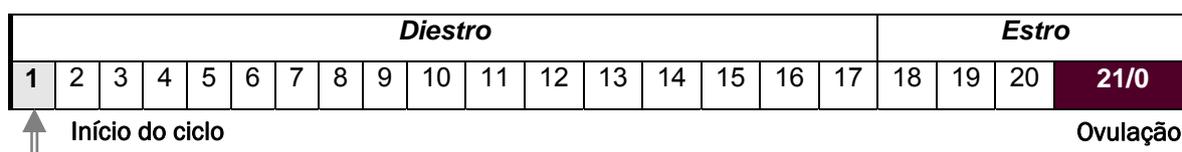


Figura 2.3. Fases do ciclo reprodutivo da égua.

Na produção de cavalos, ao contrário do que sucede com as restantes espécies pecuárias, as éguas de muitas das raças ligeiras são seleccionadas em função da sua aptidão atlética, por vezes em detrimento da sua aptidão reprodutiva. Como tal, surgem variações não só da duração do ciclo éstrico como da duração do período de ciclicidade ovárica sazonal (Morel, 2003). A nutrição é um dos principais factores envolvidos. Quando limitada, pode levar a um período de estro mais longo e menos marcado. O diestro também pode ser prolongado, entre 10 dias a vários meses, devido ao aparecimento de corpos lúteos prolongados, a ovulações silenciosas ou à inactividade ovárica associada com a transição para o período de anestro sazonal (Ginther, 1992; Morel, 2003).

Em contraste com o período de anestro sazonal, a cinética hormonal do período em que a égua apresenta ciclicidade ovárica inclui uma baixa concentração de melatonina e uma elevada concentração de GnRH (figura 2.2). As principais hormonas gonadotróficas intervenientes nos mecanismos reprodutivos da égua são a FSH e a LH e são reguladas pela GnRH. Os estrogénios (estradiol-17 β) e a progesterona são segregados a nível dos folículos e do corpo lúteo (CL) respectivamente, e a predominância da acção de uma ou de outra destas hormonas marca as duas fases do ciclo éstrico: a fase lútea e a fase folicular.

A FSH é responsável pelo desenvolvimento folicular. É transportada através do sistema circulatório da égua e a sua concentração é dependente da fase do ciclo éstrico. A sua curva de concentração apresenta dois picos: um por volta do dia 9 a 12 (cerca de 4ng/mL) e outro pouco antes da ovulação (cerca de 9ng/mL), mantendo-se nos níveis basais durante o resto do ciclo éstrico (Morel, 2003). Este comportamento indicia que o desenvolvimento folicular ocorre ao longo dos 21 dias, ao contrário do que sucede com outras espécies pecuárias, uma vez que na égua existem vários folículos em desenvolvimento (Ginther, 1992; Morel, 2003). A maioria desses folículos sofre atresia, e geralmente, apenas um dos folículos atinge o desenvolvimento necessário para ocorrer a ovulação (Davies-Morel e O'Sullivan, 2001). O pico anterior à ovulação serve o propósito de completar o desenvolvimento folicular do folículo dominante e iniciar o desenvolvimento de um novo grupo de folículos (Ginther, 1992). A redução da concentração de FSH é parcialmente provocada pela secreção de inibina pelos folículos dominantes, uma vez que esta hormona reduz a secreção de GnRH pela hipófise (Morel, 2003).

A LH mantém-se em níveis basais durante o diestro (cerca de 1 ng/mL). Durante o período de estro, a secreção de LH aumenta por aumento da amplitude e frequência dos pulsos, levando a um pico de concentração pré-ovulatório (10-16 ng/mL). Os receptores da hormona, localizados na teca folicular, aumentam o seu número, levando a uma maior conversão de progesterona em estrogénios (estradiol-17 β), que por sua vez induzem o aparecimento do comportamento de estro. Logo após a ovulação, os níveis de LH descem em poucos dias até aos níveis basais (Morel, 2003). Para além do seu papel na ovulação, a LH também está envolvida nos mecanismos de formação do corpo lúteo, o que pode explicar a razão pela qual a sua concentração só decresce no dia seguinte a ocorrer a ovulação (Morel, 2003). Para além dos mecanismos clássicos de *feedback*, a secreção de LH também pode ser influenciada por sinais metabólicos periféricos como a leptina, a grelina, a insulina e o factor de crescimento tipo Insulina 1 (IGF-1) (Inui *et al.*, 2004).

A elevada concentração de estrogénios marca a fase folicular do ciclo éstrico (Adams e Bosu, 1988; Ginther, 1992; Morel, 2003). Durante o desenvolvimento folicular ocorre a secreção de estrogénios pelos folículos. O precursor das hormonas esteróides é o colesterol que é incorporado em moléculas de progesterona pelas células da teca, que por sua vez é convertida em estradiol-17 β a nível das células da granulosa. Esta conversão final necessita da acção enzimática da aromatase, cuja acção depende da presença de FSH. A concentração máxima de estradiol-17 β ocorre na fase final do desenvolvimento folicular (10-15 ng/mL). Nesta fase, ocorre um pico de FSH, seguido de um pico de LH. A subida da intensidade e frequência dos pulsos de LH leva a um aumento da produção dos precursores da progesterona e, uma vez que os níveis de FSH se encontram elevados, ocorre maior conversão de progesterona em estradiol-17 β . Este mecanismo permite sincronizar a

ovulação, cujo sinal é o pico de LH, com o comportamento de estro, iniciado pelas concentrações elevadas de estradiol-17 β (Morel, 2003). Uma vez ocorrida a ovulação, os níveis de estrogénios decrescem devido à impossibilidade de conversão da progesterona em estradiol-17 β pelas células da granulosa (Tucker *et al.*, 1991; Morel, 2003).

A elevada secreção de progesterona marca a fase lútea do ciclo éstrico (Adams e Bosu, 1988; Ginther, 1992; Morel, 2003). Após a ovulação ocorre a formação do corpo lúteo a partir dos tecidos celulares da teca. Estes tecidos são os responsáveis pela secreção de progesterona, cuja concentração começa a aumentar 24-48 horas após a ovulação. Os níveis de P4 apresentam picos de concentração plasmática após a ovulação, sendo o valor máximo (cerca de 10 ng/mL) atingido em média ao 11º dia (Ginther, 1992). Esta concentração pode manter-se até ao 15º-16º dia, decrescendo até aos níveis basais (inferiores a 1ng/mL) 4-5 dias antes da ovulação (Morel, 2003). O decréscimo acentuado de progesterona deve-se à destruição do corpo lúteo que é da responsabilidade da PGF_{2 α} , hormona segregada pelo endométrio uterino para a corrente sanguínea e que apresenta um pico de concentração ao 15º dia do ciclo.

A progesterona tem um efeito inibidor sobre a secreção de GnRH e, conseqüentemente, sobre a secreção de gonadotrofinas. O efeito inibidor é mais marcante para a LH, ou seja, se os níveis de progesterona não regressarem aos valores basais não ocorre pico de LH pré-ovulatório. Por outro lado, existe um pico de FSH entre os dias 9 e 12 do ciclo, período durante o qual as concentrações de progesterona são máximas (Ginther, 1992; Morel, 2003).

Tendo em consideração o comportamento da curva de concentração de progesterona, o doseamento de progesterona sérica ou plasmática é um método eficaz e largamente utilizado em investigação para determinar se as fêmeas se encontram no período de ciclicidade ovárica ou no período de anestro sazonal (Thimonier, 2000). Dentro da época reprodutiva, é ainda possível determinar a fase do ciclo éstrico em que a fêmea se encontra se forem efectuadas medições repetidas (Cebulj-Kadunc *et al.*, 2006). Quando se procura estudar a fase do ciclo éstrico em éguas que não foram inseminadas, o intervalo entre duas colheitas consecutivas deve ser de 8-11 dias (Cebulj-Kadunc *et al.*, 2006). Dois valores elevados consecutivos (>2 ng/mL), ou um valor baixo e outro elevado de progesterona plasmática podem ser considerados como indicadores de estro. Dois valores consecutivamente baixos, por outro lado, são sinal de anestro (Cebulj-Kadunc *et al.*, 2006).

2.2.2.3. Comportamento de receptividade sexual

A égua manifesta alterações de comportamento ao longo do ciclo éstrico. Estas alterações dependem essencialmente da concentração de estrogénios e progesterona, que

estimulam o centro nevrálgico do controlo comportamental. Durante o diestro, a égua rejeita o garanhão. O estro, caracterizado por elevadas concentrações de estrogénios, apresenta um conjunto de comportamentos associados à receptividade sexual da égua: docilidade, posição e frequência com que a égua urina, exposição do clítoris, levantamento da cauda e cor e cheiro da urina (Ginther, 1992; Hafez e Hafez, 2000a; Morel, 2003).

2.2.3. Puberdade na égua

A puberdade corresponde, genericamente, ao momento em que o indivíduo abandona o estado de imaturidade reprodutiva e adquire ou dá início à sua competência reprodutiva (Cameron, 1990). Assim, considera-se que um animal transita do estado de imaturidade para a puberdade quando se torna capaz de libertar gâmetas e manifestar comportamento sexual (Hafez e Hafez, 2000a). Os eventos fisiológicos que acompanham o desenvolvimento puberal são diferentes nos dois sexos, em termos do desenvolvimento das gónadas, do controlo endócrino da puberdade e da forma como se processa a gametogénese (Hafez e Hafez, 2000a).

No caso das fêmeas, a entrada na puberdade é definida como o momento da primeira ovulação (Wesson e Ginther, 1981b; Brown-Douglas *et al.*, 2004). No entanto, apesar de se definir puberdade como a obtenção de capacidade reprodutiva, parece existir uma diferença entre a puberdade e a capacidade do animal se reproduzir, uma vez que a idade da primeira concepção é maior do que a idade do primeiro estro observado ou da primeira cópula para a maioria dos animais (Asa, 2002).

As primeiras tentativas para estimar a idade de entrada na puberdade em animais do género *Equus* baseavam-se na observação do comportamento de estro, que normalmente ocorre mais cedo do que a primeira cópula. Quando comparados com estudos semelhantes mas que utilizaram a idade da primeira concepção como indicador, verificou-se que, apesar dos primeiros períodos de estro serem acompanhados por cópula, não havia formação de um embrião viável (Asa, 2002). Em póneis no estado feral não se encontram éguas afillhadas com idade inferior a três anos e, num estudo conduzido por Keiper e Houpt em 1984, apenas 23% das éguas pariram com essa idade. Num estudo semelhante desenvolvido por Seal e Plotka (1983) a taxa de concepção foi de 36% para éguas de dois anos e 85% em éguas entre os seis e os 15 anos. No entanto, em condições experimentais, Naden *et al.* (1990b) obteve uma taxa de 100% de poldras gestantes 50 dias após inseminação artificial, no segundo ano de vida.

2.2.3.1. Idade de entrada na puberdade em poldras

A idade de entrada na puberdade em poldras pode ser determinada por intermédio da análise da concentração plasmática ou sérica de hormonas ou de observações directas, como a observação do comportamento sexual, e como a ultrasonografia rectal e/ou a verificação da presença de corpos *albicans* que indiquem a formação do corpo lúteo pós-ovulatório (Wesson e Ginther, 1982; Nogueira *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2002; Cebulj-Kadunc *et al.*, 2006; Guillaume *et al.*, 2006). Com base na idade do primeiro estro, primeira cópula ou primeira concepção, nos animais do género *Equus*, a puberdade pode surgir entre os 4 meses (*E. ferus przewalski*) e os 48 meses (*E. grevyi*) (Asa, 2002). Nesta fase do desenvolvimento reprodutivo dos animais devem contabilizar-se factores internos e externos ao próprio animal. No cavalo doméstico (*Equus caballus*), existe uma variabilidade intra-espécie na idade de ocorrência da puberdade uma vez que esta depende de factores como a época de nascimento (Wesson e Ginther, 1981b; Ginther, 1992; Brown-Douglas *et al.*, 2004), o fotoperíodo, o estado imunitário e/ou sanitário (Ginther, 1992), a raça (Dordari *et al.*, 2005) e a nutrição (Ellis e Lawrence, 1978; Adams e Bosu, 1988; Foster e Nagatani, 1999; Gomes *et al.*, 2002; Guillaume *et al.*, 2006).

A forma mais expedita e mais amplamente utilizada para determinar o momento de entrada na puberdade é a determinação da concentração plasmática de progesterona (Brown-Douglas *et al.*, 2004). Para as éguas, assim como para as fêmeas de outras espécies pecuárias, uma concentração plasmática de progesterona superior a 2 ng/mL é indicativa da ocorrência da fase lútea que se segue à ovulação (Roberson *et al.*, 1991; Suttie *et al.*, 1991; Nachreiner e Hyland, 1993, Brown-Douglas *et al.*, 2004). Segundo Wesson e Ginther (1981b), essa concentração de progesterona deve ser três vezes superior à anteriormente determinada.

De acordo com Rossdale e Ricketts (1980), a idade média da puberdade em poldras é de 18 meses. No entanto, devido não só ao elevado número de factores envolvidos, como também ao elevado número de critérios de avaliação, existe uma grande variabilidade nas estimativas da idade de entrada na puberdade em fêmeas do cavalo doméstico (Asa, 2002; Brown-Douglas *et al.*, 2004; Guillaume *et al.*, 2006) (quadro 2.1).

Quadro 2.1. Idade média de entrada na puberdade determinada por diferentes autores e para diferentes raças em fêmeas da espécie *Equus caballus*.

Idade média (meses)	Raça	Autores
12 – 15	Póneis (n.d.)	Wesson e Ginther, 1981a
10 – 15 (n=12)	Póneis (n.d.)	Wesson e Ginther, 1981b
14 – 15 (n=11)	Póneis Welsh	Palmer e Driancourt, 1983
12	Puro-sangue Inglês	Adams e Bosu, 1988
21 a 24 (n=15)	Quarter Horse	Naden <i>et al.</i> , 1990b
13,1 (n=4)	Cavalo Australiano	Skelton <i>et al.</i> , 1990
9,65 ± 0,2 (n=7) e 22,03 (n=1)	Póneis Welsh	Guillaume, 1995 *
15 (n=8) e 25 (n=12)	Cavalo desporto Brasileiro	Souza <i>et al.</i> , 1997
12 (n=8)	Haflinger	Camillo <i>et al.</i> , 2002
12	Warmblood	Lemazurier <i>et al.</i> , 2002
14 (n=10)	Puro-sangue Inglês	Nogueira <i>et al.</i> , 2004
7 – 13,4 (n=35)	Puro-sangue Inglês	Brown-Douglas <i>et al.</i> , 2004
12 – 13,6 (n=10) e 23 (n=1)	Sela-Francês	Guillaume <i>et al.</i> , 2006
15 (n=23) e 25 (n=23)	Lipizzan	Cebulj-Kadunc <i>et al.</i> , 2006

* (citado por Guillaume *et al.*, 2006)

Época de Nascimento

Os estudos da entrada na puberdade têm recaído sobretudo sobre os seres humanos e os mamíferos de interesse zootécnico. Os mecanismos que regem esta fase de desenvolvimento do indivíduo são semelhantes em muitos aspectos, mas existem particularidades únicas a cada espécie, principalmente no que toca à existência ou não de sazonalidade reprodutiva. Dado o comportamento sazonal da ciclicidade ovárica em éguas adultas (vide ponto 2.2.2.1 da presente revisão), a época de nascimento tem sido estudada como um factor importante na idade de entrada na puberdade em poldras.

Em estudos realizados anteriormente concluiu-se que, estando garantidas as boas condições sanitárias e nutricionais, se a poldra nascer na primeira metade do ano pode atingir a puberdade no final da Primavera ou Verão seguintes, entre os 12 e os 18 meses (Wesson e Ginther, 1981a; Wesson e Ginther, 1981b; Palmer e Driancourt, 1983; Ginther, 1992; Nogueira *et al.*, 1997; Brown-Douglas *et al.*, 2004; Guillaume *et al.*, 2006). Se os animais nascerem no Outono (fotoperíodo decrescente), geralmente só atingem a puberdade mais tarde, na segunda Primavera que se segue ao seu nascimento, (Wesson e Ginther, 1981b; Palmer e Driancourt, 1983). No entanto, em cavalos PSI, Brown-Douglas *et al.* (2004) verificaram que a maioria dos animais nascidos no Outono entrava na puberdade na Primavera seguinte. Observa-se também uma situação intermédia entre animais nascidos na Primavera ou nascidos no Outono, que é válida para os animais que nascem

durante os meses de Verão (Wesson e Ginther, 1981b). Por exemplo, animais nascidos no final da Primavera ou no Verão podem entrar na puberdade na Primavera do ano seguinte, mas geralmente fazem-no significativamente mais tarde do que os animais nascidos na época reprodutiva normal (Wesson e Ginther, 1981b; Brown-Douglas *et al.*, 2004). Para além disso, estes animais entram na puberdade mais cedo e evidenciam uma menor actividade reprodutiva, ou seja, existe uma tendência para apresentarem um menor número de ovulações e uma época reprodutiva mais curta, pois cessam a ciclicidade ovárica mais cedo (Wesson e Ginther, 1981b). O mesmo padrão verifica-se quando se comparam poldras com éguas mais velhas. As poldras iniciam a ciclicidade ovárica sensivelmente na mesma altura que éguas mais velhas (Ginther, 1974), mas têm menor número de ovulações e entram em anestro mais cedo (Wesson e Ginther, 1981b). Este conjunto de resultados sugere que a idade de entrada na puberdade é diferente mediante a época de nascimento (Wesson e Ginther, 1981b; Brown-Douglas *et al.*, 2004). Uma vez que animais nascidos no primeiro semestre do ano atingem a puberdade no final da Primavera do ano seguinte, com idades diferentes, a idade em si não parece ser um factor prevalente na entrada na puberdade, mas sim uma circunstância da época de nascimento do animal.

Existem evidências que noutras espécies de dias longos ocorre um atraso na puberdade se os animais forem sujeitos a fotoperíodos decrescentes (Lincoln e MacKinnon, 1976; Hoffman, 1978). Poldras nascidas no início da Primavera são expostas ao fotoperíodo crescente pouco depois do nascimento e apresentam perfis de gonadotrofinas diferentes das que nascem mais tarde, durante o fotoperíodo decrescente (Wesson e Ginther, 1981b). O mesmo se verifica para outros animais sazonais que nascem depois da época normal de reprodução, como verificou Foster (1981) em ovelhas. Este resultado aponta para a importância da sujeição da fêmea à sequência fotoperiódica certa para que seja possível a maturação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e a transição do período infantil para a puberdade. No caso das poldras, a sujeição à sequência dias-longos/dias-curtos/dias-longos parece ser importante para a data de iniciação e para a duração do período de ciclicidade ovárica em pôneis e éguas Quarter Horse (Wesson e Ginther, 1981b; Naden *et al.*, 1990b). No entanto, Brown-Douglas *et al.* (2004) verificaram que em poldras PSI nascidas no Outono, bastou uma sequência dias-curtos/dias-longos, e a obtenção de 49% do peso vivo adulto (PVA) para que os animais entrassem na puberdade após o solstício de Inverno. Um resultado interessante que colmata a importância do fotoperíodo foi o de Nogueira *et al.* (1997), em que o mês com maior insolação (número de horas de sol descoberto) e maiores valores de radiação solar (calorias/cm²) coincidiu com o mês em que um maior número de poldras PSI se tornou púbere.

Apesar de não ser possível estimar o momento da entrada na puberdade através da idade, dado que animais mais velhos evidenciam um período de actividade reprodutiva mais

longo, a idade parece ter sim uma importância decisiva na data de entrada em anestro (Ginther, 1974; Wesson e Ginther, 1981b).

Peso Vivo (Maturidade)

Durante o primeiro ano de vida o crescimento e desenvolvimento dos poldros são muito elevados, principalmente nos primeiros meses. Em éguas PSI, Nogueira *et al.* (1997), constataram que nos primeiros três meses de vida, os animais apresentaram a maior taxa de crescimento e ganho de peso (135% relativamente aos valores ao nascimento), o que correspondeu a 46% de todo o crescimento no primeiro ano de vida. No mesmo estudo, as menores taxas de crescimento e ganho de peso (2,68%) verificaram-se ao 14º mês, que coincidiu com a entrada na puberdade, e precedeu o mês de fotoperíodo mais longo. Após a obtenção de ciclicidade ovárica, o ritmo de crescimento acelerou novamente (6,54%), sugerindo que a puberdade tem influência sobre o crescimento do cavalo. Num estudo conduzido em cavalos PSL, constatou-se que aos 7 meses, os poldros apresentavam 42,2 a 50,8% do peso vivo adulto (PVA=500kg), e aos 12 meses, entre 55,2 e 65,5% (Fradinho *et al.*, 2008a e 2008b). Até ao desmame (7 meses de idade), adquiriram entre 71,5 e 74,7% do peso até aos 12 meses de idade (Fradinho *et al.*, 2008b).

Em animais que possuem actividade reprodutiva com padrões sazonais, existem evidências da importância de sinais não só do fotoperíodo, como da maturidade (enquanto percentagem do peso vivo (PV) face ao PVA esperado, no desencadear da puberdade (Foster *et al.*, 1981; Brown-Douglas *et al.*, 2004). Um atraso marcado no crescimento leva a que o peso crítico seja atingindo mais tarde e pode resultar num atraso da data do primeiro estro em poldras (Ellis e Lawrence, 1978). Mas, tal como não existe um consenso quanto à idade de entrada na puberdade, também existem discrepâncias na % PVA crítico na bibliografia disponível (quadro 2.2).

Quadro 2.2. Percentagem do PVA médio (maturidade) no momento de entrada na puberdade, determinada em estudos anteriores realizados em fêmeas do *Equus caballus*.

Peso Vivo Adulto (%)	Raça	Autores
56 (n=12)	Pôneis (n.d.)	Wesson e Ginther, 1981b
59 (n=8) e 71 (n=12)	Cavalo desporto Brasileiro	Souza <i>et al.</i> , 1997
61 (n=10)	Puro-sangue Inglês	Nogueira <i>et al.</i> , 1997
49 (n=33)	Puro-sangue Inglês	Brown-Douglas <i>et al.</i> , 2004
80 (n=?)	Sela-Francês	Guillaume <i>et al.</i> , 2006

A diferença de resultados existente prende-se muitas vezes com a época de nascimento do animal. Animais nascidos na Primavera ou Verão entram na puberdade mais jovens e com PV inferior ao de animais nascidos no Outono (Wesson e Ginther, 1981b). Este resultado parece sugerir que a influência do fotoperíodo se sobrepõe ao PV do animal, uma vez que se o animal atingir o PV crítico na estação típica de anestro sazonal (Outono/Inverno), só entra na puberdade quando o fotoperíodo se torna permissivo. Por outro lado, mesmo que submetidos a dias longos, animais nascidos no Outono têm menor probabilidade de se tornarem púberes na Primavera seguinte, o que sugere que é necessário atingirem um grau de maturidade mínimo para que ocorram os processos de maturação sexual necessários à produção de gâmetas (Wesson e Ginther, 1981b; Ginther, 1992; Lemazurier *et al*, 2002). Ou seja, é necessária a conjugação dos dois factores para que o animal entre na puberdade, principalmente em regiões temperadas (Wesson e Ginther, 1981b; Ginther, 1992; Brown-Douglas *et al.*, 2004).

Na maioria das espécies pecuárias a idade de entrada na puberdade tem uma elevada importância na economia da exploração. Nas ovelhas, a puberdade depende da obtenção de um PV mínimo pelo que, se se alimentar em pleno os animais destinados à reprodução, consegue-se um aumento do seu tempo de vida útil visto que iniciam a vida produtiva mais cedo (Foster e Ryan, 1979). No caso do cavalo doméstico, existe uma grande diferença de idades entre a entrada na puberdade (entre os 7 e os 25 meses) e a primeira cobrição (depois dos três anos) pelo que, aparentemente, não existe um interesse directo em que o animal entre na puberdade a uma idade determinada. No entanto El-Ghannam e EL-Sawaf (1976), ao estudarem éguas Árabes, verificaram que existia uma relação significativa entre a idade de entrada na puberdade e a fertilidade, definida como o número de saltos necessários para que a égua ficasse gestante.

2.2.3.2. Desenvolvimento dos órgãos reprodutores

O desenvolvimento dos órgãos reprodutores começa *in-utero*. Nesta fase inicia-se a primeira etapa da gametogénese. As oogónias são produzidas através da multiplicação mitótica, que é seguida de divisão meiótica da qual resultam milhões de oócitos, que permanecem em *stand-by* na profase. Ao nascimento e durante a puberdade ocorre atresia de muitos desses oócitos, de tal forma que apenas algumas centenas permanecem para se desenvolverem durante a vida do animal (Hafez e Hafez, 2000b).

A maior parte do crescimento dos órgãos reprodutores da égua ocorre durante o desenvolvimento fetal. Entre os 100 e os 200 dias de gestação as gónadas registam um crescimento muito rápido, de tal forma que, entre os sete e os oito meses, são maiores do que os ovários da égua nessa fase da gestação e do que os de poldras recém-nascidas

(Ginther, 1992). A acompanhar este fenómeno, verifica-se também um aumento do tamanho da hipófise que, no entanto, só regista o máximo de crescimento entre os 200 e os 300 dias de gestação (Ginther, 1992). A hiperplasia e hipertrofia das gónadas começa a regredir aos 250 dias e, ao nascimento, pesam cerca de 10 a 20 gramas.

Durante os primeiros meses de vida, os ovários sofrem alterações morfo-funcionais. Ao nascimento, são simétricos e têm uma forma elipsoidal (Ginther, 1992). Aos três meses de idade, o córtex sofre uma invaginação e fica localizado por debaixo do infundíbulo, indicando o futuro local da fossa ovulatória que pode ser distinguido tão cedo como sete ou oito meses. A aquisição da configuração em feijão com a fossa ovulatória proeminente, típica dos ovários da égua, só ocorre na puberdade (Ginther, 1992).

2.2.3.3. *Controlo endócrino da puberdade na égua*

Em termos de maturação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, podem considerar-se vários períodos na vida do animal: período fetal, período infantil, período pré-pubere, puberdade (ou transição para a primeira época de ciclicidade ovárica) e período pós-pubere. Cada um desses períodos é caracterizado essencialmente por padrões de secreção hormonal específicos, sendo possível encarar a ausência de actividade ovulatória da poldra imatura como um estado de inibição activa da função reprodutiva, e o desencadear da puberdade como um retrocesso dessa inibição. A reactivação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, que se encontra quiescente até à puberdade, leva à aquisição das características sexuais secundárias, aquisição da estatura típica do indivíduo adulto e à fertilidade (Odell, 1990; Hall, 2003). O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal encontra-se activo durante a vida do feto e no início da vida infantil, mas permanece em dormência durante a pausa juvenil, sendo reactivado gradualmente no período pré-pubere em ovelhas, éguas, ratos e humanos (Foster, 1981; Naden *et al.*, 1990b; Odell, 1990; Hall, 2003).

Apesar de ainda não existirem estudos no *Equus caballus*, está comprovado que em seres humanos o período de inactividade juvenil ocorre devido, por um lado, ao *feedback* negativo que está dependente das gonadotrofinas, presentes em quantidades reduzidas em indivíduos recém-nascidos e pré-puberes (Hall, 2003); e, por outro lado, à inibição intrínseca do sistema nervoso central (SNC) e que é independente das gonadotrofinas (Hall, 2003). Pouco antes da puberdade, a inibição intrínseca do SNC desvanece parcialmente devido à menor sensibilidade ao *feedback* negativo da GnRH, principalmente durante o sono (Hall, 2003). A GnRH tem origem hipotalâmica e promove a estimulação da secreção de gonadotrofinas pela hipófise. Por outro lado, alguns neurotransmissores como o ácido γ -aminobutírico (GABA) e o neuropeptido Y (NPY) parecem ter um papel na regulação da entrada na puberdade, actuando como inibidores durante a fase juvenil. Estudos em

primatas demonstraram que o GABA inibe tonicamente a GnRH no período pré-pubere (Terasawa e Fernandez, 2001). O mRNA do NPY decresce durante o início da puberdade, ao mesmo tempo que ocorre uma subida da GnRH e, se inibido, estimula a secreção de LH (Terasawa e Fernandez, 2001).

Período fetal

O sistema reprodutivo no feto consiste em duas gónadas indiferenciadas quanto ao sexo, dois pares de ductos, um sino urogenital, um tubérculo genital e uma prega vestibular (Hafez e Hafez, 2000b). Existem evidências de que o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal se encontra activo durante o período fetal. Por um lado, é a ausência de androgénios que fomenta o desenvolvimento dos ductos de Muller em detrimento dos ductos de Wolff, promovendo a formação do útero, cervix e parte anterior da vagina (Hafez e Hafez, 2000b); por outro lado, existem evidências da secreção de gonadotrofinas durante o período fetal no pónei. Num estudo conduzido por Wesson e Ginther (1980), verificou-se que as concentrações de LH aumentaram entre os 90 e os 150 dias de gestação, permanecendo constantes daí por diante. O sistema porta que liga o hipotálamo à hipófise estabelece-se entre o 50º e o 95º dia, criando uma ligação potencialmente funcional entre as duas estruturas (Ginther, 1992). A concentração de LH acompanhou também o desenvolvimento das gónadas: o máximo registou-se entre os 100 e os 150 dias, o que coincidiu com o período de maior crescimento das gónadas, e o decréscimo coincidiu com o momento em que esse crescimento cessou. Nesse mesmo estudo, a FSH não foi detectada nem na hipófise nem no sangue do feto. Por outro lado, Wesson e Ginther (1979 e 1980) observaram que póneis recém-nascidas possuíam concentrações das duas gonadotrofinas (LH e FSH) baixas (<2 ng/mL) mas acima dos valores registados para as mães. A presença de FSH ao primeiro dia de vida poder dever-se a um processo de maturação na secreção da FSH no recém-nascido (Wesson e Ginther, 1980).

À nascença não foram observadas diferenças para a FSH entre os sexos, mas os póneis fêmea exibiram concentrações de LH superiores (Wesson e Ginther, 1979 e 1980). Num outro estudo, Houghton e colaboradores (1991) estudaram as concentrações de progestagénios no feto e encontraram uma concentração de progesterona na ordem dos 12,7 ng/mL no plasma do sangue retirado da veia fetal. Estas associações temporais são compatíveis com a hipótese da existência de uma relação entre as hormonas segregadas pelas gónadas e a LH hipofisária no feto de póneis (Wesson e Ginther, 1979).

Período infantil

Durante o período infantil, a concentração de gonadotrofinas é baixa. Tal como sucede para a idade de entrada na puberdade, a duração desta fase é variável. Wesson e Ginther (1981b) observaram um aumento de gonadotrofinas a partir do 1º mês de idade (Junho), enquanto para Naden e colaboradores (1990b), este resultado só surgiu aos 7 meses (Janeiro). A duração do período infantil parece estar relacionada com a idade de entrada na puberdade, uma vez que para Wesson e Ginther (1981b) o período infantil terminou no mesmo ano de nascimento dos animais, e a puberdade foi atingida no ano seguinte (entre 12 e 15 meses). Para Naden *et al.* (1990b), o período infantil só terminou no ano seguinte ao nascimento, e os animais só entraram na puberdade dois anos depois do nascimento, entre os 21 e os 24 meses.

Período pré-pubere

O período pré-puberal é marcado por alterações no eixo hipotálamo-hipofisário, que resultam na secreção de gonadotrofinas. A partir do momento em que se verifica o aumento da concentração de gonadotrofinas (principalmente FSH), considera-se que se transitou do período infantil para o período pré-pubere. Durante este período, as gonadotrofinas podem sofrer oscilações de concentração por efeito do fotoperíodo, sem que o valor máximo seja permissivo para a ocorrência de ovulação (Wesson e Ginther, 1980; Naden *et al.*, 1990b). Após a primeira semana de vida, os níveis iniciais de gonadotrofinas descem para valores basais. A LH permaneceu baixa (<0.5 ng/mL) em pôneis desde a semana a seguir ao nascimento e até Dezembro, quando os animais tinham 8 meses de idade (Wesson e Ginther, 1979 e 1980) o que contrasta com as conclusões de estudos em ovelhas (Foster *et al.*, 1975) e bovinos (Gonzalez-Padilla *et al.*, 1975) que evidenciam concentrações de LH consideráveis no período pré-puberal. Poldras Quarter-horse (Naden *et al.*, 1990b), mantiveram concentrações indetectáveis de LH desde o primeiro mês de vida (Julho) até ao 7º mês (Janeiro), subindo a partir deste momento até atingir um máximo de aproximadamente 8ng/mL ao 10º mês (Abril), e decrescendo até regressar aos níveis basais no 16º mês (Outubro).

Por outro lado, a FSH pareceu acompanhar o fotoperíodo, aumentando significativamente de concentração (de 1 a >4 ng/mL) durante os meses de Verão e recaindo para os valores basais (1 ng/mL) no final de Setembro e até Dezembro (Wesson e Ginther, 1980). Este padrão hormonal foi diferente entre animais (2-15 ng/mL) e entre poldras nascidas na Primavera e poldras nascidas no final da época reprodutiva, o que parece suportar a importância do fotoperíodo no aumento de FSH sérica (Wesson e Ginther, 1979 e 1980). O aumento de FSH na fase pré-puberal na poldra também foi diferente do

verificado noutras espécies pecuárias, como a ovelha (Foster *et al.*, 1975). O mesmo tipo de comportamento foi encontrado na curva de concentração de FSH em éguas Quarter Horse (Naden *et al.*, 1990b). Neste estudo, a FSH começou a aumentar ligeiramente a partir de Outubro e sofreu um aumento brusco a partir de Janeiro e até Abril, onde verificou um máximo superior a 25 ng/mL, quando os animais tinham em média 10 meses de idade.

Os esteróides sexuais também apresentam um padrão de secreção no período pré-pubere (Nogueira *et al.*, 1997; Lemazurier *et al.*, 2002). O perfil dos esteróides sexuais das poldras pré-puberes caracteriza-se pela predominância dos estrogénios totais sobre os androgénios totais, apesar do valor total de estrogénios ser inferior ao verificado nos machos (Lemazurier *et al.*, 2002). No primeiro dia de vida, poldras PSI apresentaram elevadas concentrações de progestagénios (aproximadamente 11 nmol/mL) e de estradiol (aproximadamente 9 pmol/mL), que desceram para os valores basais ao fim de uma semana e se mantiveram baixas até à primeira ovulação (Nogueira *et al.*, 1997). Também de forma análoga ao que sucede com as gonadotrofinas, a função endócrina das gónadas no primeiro ano de vida é essencialmente regulada por factores climáticos e pelo fotoperíodo, e não pela idade do animal (Lemazurier *et al.*, 2002). Os níveis séricos de esteróides sexuais em éguas pré-puberes apresentam diferenças significativas ao longo do ano, com um pico no final da Primavera, e concentrações elevadas na Primavera e Verão, tal como nos animais adultos, (Lemazurier *et al.*, 2002). Também de forma idêntica ao que sucede com os animais adultos, as fêmeas pré-puberes parecem apresentar uma maior sensibilidade ao fotoperíodo do que os machos, uma vez que o aumento dos níveis de esteróides totais acontece mais cedo (cerca de um mês) nas poldras (Lemazurier *et al.*, 2002).

Puberdade

O perfil hormonal da entrada na puberdade é caracterizado por um aumento da concentração plasmática de LH e FSH, que ocorre durante a transição para a época reprodutiva (Wesson e Ginther, 1981b; Naden *et al.*, 1990b; Nogueira *et al.*, 1997). As concentrações de FSH e LH aumentam a partir de Fevereiro e Março, respectivamente, e atingem um máximo no final da Primavera, quando geralmente ocorre a entrada na puberdade, decrescendo daí por diante até Dezembro (Wesson e Ginther, 1981b). Esta sincronização do aumento das gonadotrofinas é provavelmente regida pelos mesmos mecanismos que promovem a recrudescência da ciclicidade ovárica em éguas adultas (Ginther, 1992).

No estudo realizado em pôneis por Wesson e Ginther (1981b), o aumento da concentração plasmática de LH deveu-se sobretudo ao aumento da intensidade dos picos durante a época reprodutiva, com o máximo atingido no mês da ovulação (Wesson e

Ginther, 1981b). Num outro estudo, realizado em cavalos Quarter-Horse por Naden *et al.* (1990b), as concentrações basais de LH registaram um comportamento semelhante: mantiveram-se baixas entre Agosto e Fevereiro, quando as poldras tinham entre 14 e 20 meses, e subiram drasticamente em Abril, aos 22 meses de idade. Verificou-se também um pico de LH (aumentando de aproximadamente 6 ng/mL até níveis superiores a 13 ng/mL) que começou no 14º dia que antecedeu o primeiro estro. Este incremento de concentração basal de LH também foi encontrado em ovelhas pré-puberes (Foster e Ryan, 1979).

Na segunda ovulação, o pico pré-ovulatório de LH foi de maior intensidade, contrariamente ao que sucedeu para a FSH. O aumento da secreção de LH pode reflectir as concentrações de GnRH e a sensibilidade sazonal da hipófise ao estímulo providenciado por esta hormona. Naden *et al.* (1990b) verificaram uma resposta diferente à administração da mesma quantidade de GnRH exógena mediante a época do ano. A resposta aumentou de Janeiro a Julho, quando as poldras tinham entre 7 e 13 meses; diminuiu de Julho até Outubro, quando as poldras atingiriam os 16 meses de idade, e voltou a aumentar de Outubro até Abril, atingindo o máximo no mês que se seguiu à idade média de entrada na puberdade.

A FSH também parece sofrer também um aumento da concentração basal nos meses que precedem o início da ciclicidade ovárica (Wesson e Ginther, 1981b; Naden *et al.*, 1990b). Em pôneis, a FSH basal começou a aumentar no início da Primavera. A primeira ovulação foi precedida em um mês por um pico de FSH. A concentração de FSH decresceu acentuadamente 8 a 12 dias antes do pico de LH pré-ovulatório, até registar um mínimo quando a LH atingiu o valor máximo (Wesson e Ginther, 1981b). Um padrão semelhante foi observado por Naden *et al.* (1990b), em que éguas Quarter-horse evidenciaram níveis de FSH que oscilaram entre 20 e 40 ng/mL dois meses antes da primeira ovulação. As concentrações aumentaram entre os 22 e os 14 dias antes da primeira ovulação e, contrariamente à LH, este pico de FSH foi mais evidente do que o que se verificou na segunda ovulação (Naden *et al.*, 1990b).

Tal como sucedeu com a LH para o mesmo estudo, o aumento da concentração plasmática de FSH parece depender da época do ano, uma vez que a administração de GnRH exógena levou a um aumento da concentração plasmática desta hormona entre Janeiro e Julho, uma redução em Setembro, um pico em Outubro e um decréscimo até Abril, quando os animais tinham 22 meses de idade. A resposta à GnRH exógena foi significativamente diferente entre gonadotrofinas a partir do final de Dezembro – apesar da resposta aumentar para a LH, diminuiu para a FSH (Naden *et al.*, 1990b).

Durante a primeira época de ciclicidade ovárica em éguas verificam-se elevados níveis de estrogénios (Nogueira *et al.*, 1997) e progesterona (Wesson e Ginther, 1981b; Nogueira *et al.*, 1997; Brown-Douglas *et al.*, 2004; Cebulj-Kadunc, 2006; Guillaume *et al.*,

2006). Ao estudarem poldras PSI, Nogueira *et al.* (1997) constataram que os níveis de estradiol variaram após o nascimento, e aumentaram significativamente antes do primeiro pico de progesterona, tendendo a variar de forma episódica ao longo dos ciclos ovários.

Os níveis de progesterona não são detectáveis até à primeira época de ciclicidade ovária (Wesson e Ginther, 1981b; Nogueira *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 1997; Brown-Douglas *et al.*, 2004; Cebulj-Kadunc, 2006; Guillaume *et al.*, 2006). Durante a puberdade, os níveis basais, inferiores a 1 ng/mL ascendem a valores que podem oscilar entre 2 e 30 ng/mL, característicos da fase lútea (Brown-Douglas *et al.*, 2004) e são semelhantes aos valores encontrados em éguas adultas (Ginther, 1992).

Outras hormonas estão envolvidas na entrada na puberdade da égua. A leptina, hormona segregada pelos adipócitos, é de grande importância, pelo que o seu papel será explorado no ponto 2.4 da presente revisão. A kisspeptin é um péptido, descoberto muito recentemente, que tem sido amplamente estudado como sendo o “gatilho” que actua a nível do SNC para dar início à cascada de eventos que rodeiam a entrada na puberdade. Esta hormona já foi estudada em éguas adultas (Magee *et al.*, 2007; Decourta *et al.*, 2008) e noutras espécies sazonais (Greives *et al.*, 2007). A kisspeptin é uma hormona peptídica codificada pelo gene KiSS-1 e que age como um regulador positivo do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, ao estimular a actividade dos neurónios da GnRH (Greives *et al.*, 2007). Ao que parece, a kisspeptin está implicada no *feedback* positivo dos estrogénios sobre a secreção de GnRH, principalmente no pico GnRH/LH pré-ovulatório (Smith e Clarke, 2007). A kisspeptin e o seu receptor, GPR54, são elementos cruciais no mecanismo da puberdade e podem ter também importância na regulação do estro sazonal em animais sazonais como o hamster (Revel *et al.* 2007) e o cavalo (Magee *et al.*, 2007). Nas éguas, já foram encontrados receptores no núcleo arqueado, especialmente na área paraventricular (Decourta *et al.*, 2008). Já foi comprovado que a administração de kisspeptin leva ao aumento da secreção de LH, potenciando a ovulação através do estímulo positivo da secreção de GnRH hipotalâmica em éguas (Magee *et al.*, 2007). Em cobaias, os receptores para a kisspeptin parecem existir em igual número em animais jovens e adultos, mas a expressão do mRNA do gene KISS-1 no núcleo anteroventral paraventricular aumenta drasticamente durante a transição da vida juvenil para a vida adulta, actuando como o gatilho que vai estimular a secreção de GnRH (Han *et al.*, 2005).

Período pós-pubere

A partir do momento em que o animal entra na puberdade, o comportamento reprodutivo e os padrões de secreção hormonal de gonadotrofinas são muito semelhantes aos das éguas adultas (Wesson e Ginther, 1981b; Naden *et al.*, 1990b; Brown-Douglas *et*

al., 2004). Pode considerar-se que um elemento fundamental do mecanismo da puberdade fica retido no animal maduro e é activado todos os anos para regular a fertilidade durante a fase adulta (Foster e Ryan, 1979). Após a época reprodutiva, as poldras entram geralmente em anestro sazonal até recrudescência reprodutiva na Primavera do ano seguinte (Wesson e Ginther, 1981b).

2.3. ESPECIFICIDADES REPRODUTIVAS DO GARANHÃO

2.3.1. Anatomia reprodutiva do garanhão

A função do aparelho reprodutor do garanhão é a de produção e armazenamento de esperma para posteriormente o depositar no interior do aparelho reprodutor da fêmea. É composto por vários órgãos de função específica (Hafez, 2000; Morel, 2003).

- Pênis – é uma estrutura composta pela glânde, corpo e raiz. O corpo subdivide-se em duas secções, o corpo cavernoso uretra e o corpo cavernoso peniano, que é composto por tecidos erécteis hemodinâmicos. Na zona inferior do pênis existe um músculo retractor que recolhe o pênis para dentro do prepúcio no final da erecção. A sequência de eventos que levam à erecção depende do estímulo sexual providenciado pela fêmea em estro e é resultado da estimulação do SNC (Hafez, 2000; Morel, 2003).
- Glândulas acessórias – existem quatro glândulas acessórias responsáveis pela secreção do plasma seminal: as glândulas bulbouretrais (ou glândulas de Cowper), a próstata, as glândulas vesiculares (ou vesículas seminais) e a ampula. O funcionamento e, conseqüentemente, o volume das secreções das glândulas vesiculares, estão dependentes do aumento da concentração de testosterona que se verifica durante a época reprodutiva. A sua contribuição para o plasma seminal é menor durante a época de anestro sazonal (Thompson *et al.*, 1980; Weber *et al.*, 1990; Robalo Silva *et al.*, 2007).
- Epidídimo – situa-se sobre os testículos e subdivide-se na cabeça, corpo e cauda. Está ligado à uretra pelo vaso deferente e possui microvilosidades cuja função é promover a maturação do esperma (Morel, 2003).
- Testículos – têm por função a produção de gâmetas e libertação de hormonas. São compostos pelo escroto, túnica albuginea, tubos seminíferos, epididimo, plexo pampiniforme e *vas deferens*. O perímetro escrotal dos adultos é em média 7-13 cm e pesam em média 300-350g (Morel, 2003). Estas medidas dependem da idade do animal e aumentam durante a época reprodutiva (Johnson e Thompson, 1983; Clay *et al.*, 1987; Robalo Silva *et al.*, 2007). As células de Sertoli e os tubos seminíferos têm uma função citogénica. A função endócrina é da responsabilidade do tecido intertubular e das células de Leydig (Morel, 2003). Estas são largamente responsáveis pela secreção de hormonas que controlam a produção de esperma e o desenvolvimento do comportamento e características sexuais secundárias. A produção de esperma está correlacionada positivamente com o tamanho e/ou volume testicular (VT) (Love *et al.*, 1991; Robalo Silva *et al.*, 2007).

2.3.2. Controlo endócrino da reprodução no garanhão

O controlo endócrino da reprodução no garanhão foi concebido para manter a actividade reprodutiva de forma contínua, contrariamente ao que sucede com a égua, que apresenta uma produção cíclica de gâmetas e que obedece a restrições sazonais mais marcadas. O garanhão apresenta produção de gâmetas contínua ao longo do ano, mediada pelo eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (figura 2.4).

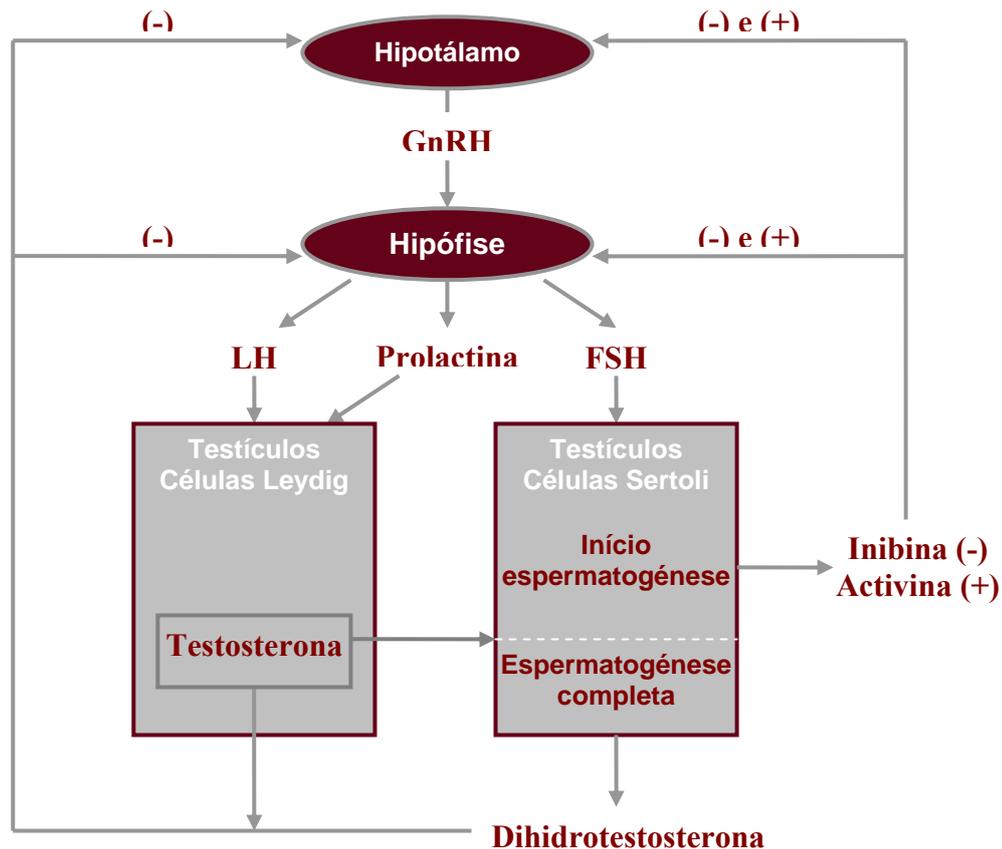


Figura 2.4. O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal evidenciando as principais hormonas e mecanismos de *feedback* do controlo endócrino da reprodução no garanhão. GnRH, hormona libertadora gonadotrofinas; FSH, hormona foliculo-estimulante; LH, hormona luteotrófica (adaptado de Morel, 2003).

2.3.2.1. Sazonalidade reprodutiva

A actividade reprodutiva do garanhão também é condicionada pela estação do ano. Os factores externos, como o fotoperíodo e a temperatura, regulam os mecanismos de secreção da melatonina e prolactina que, ao interferirem com o funcionamento do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, vão influenciar o comportamento sexual e as características seminais do macho (Morel, 2003). No entanto, esta influência é menos marcada do que na égua, uma vez que, no geral, o garanhão mantém a competência reprodutiva durante os meses correspondentes ao anestro sazonal na égua (Pickett, 1993; Hafez e Hafez, 2000a;

Morel, 2003). Outra das diferenças entre machos e fêmeas reside no facto da recrudescência da função gonadal nos machos não depender dos dias longos, uma vez que se inicia no Outono, quando os dias ainda estão a decrescer (Clay *et al.*, 1987; Robalo *et al.*, 2007). Ou seja, a oscilação circanual da função reprodutiva do garanhão pode ter uma componente foto-induzida e outra foto-independente (Clay *et al.*, 1987).

No início da época reprodutiva a maioria dos garanhões sofre um significativo aumento do libido (Pickett e Voss, 1972), uma vez que existe uma maior produção de testosterona no período Primavera-Verão do que durante o Outono-Inverno (Johnson e Thompson, 1983) e que existe uma correlação positiva entre a produção de testosterona e o comportamento sexual (Irvine e Alexander, 1991). A dimensão dos testículos e a quantidade e qualidade do sémen também são influenciados pela estação do ano (Clay *et al.*, 1987; Barbosa *et al.*, 2002; Agrícola *et al.*, 2004; Robalo Silva *et al.*, 2007). A função endócrina testicular e, conseqüentemente, a produção de espermatozóides são mais elevadas durante a Primavera-Verão do que durante o Outono-Inverno (Janett *et al.*, 2003). Isto ocorre em consequência do aumento do número e do volume das células de Sertoli e da quantidade de células germinativas, que estão associados também com o aumento do peso e VT (Johnson e Thompson, 1983; Johnson e Thompson, 1987). O volume e peso dos testículos atingem o máximo nos meses de Junho e Julho (Clay *et al.*, 1987) e estão associados com o aumento da produção total de espermatozóides (PTE) e de espermatozóides viáveis (Barbosa *et al.*, 2002; Robalo Silva *et al.*, 2007). O pico de produção de gâmetas ocorre nos meses de Verão, o que coincide com o pico da época reprodutiva das éguas (Johnson e Thompson, 1983).

Em cavalos PSL, à latitude 39° 12' N, o pico da gametogénese ocorre na Primavera, mas o sémen é de melhor qualidade no Verão (Robalo Silva *et al.*, 2007). Durante a época reprodutiva (Março a Julho) verifica-se uma forte correlação positiva entre o volume dos testículos dos garanhões e (1) a PTE ($r=0,915$, $P=0,02$); (2) a produção de espermatozóides viáveis ($r=0,93$, $P=0,02$) (Barbosa *et al.*, 2002). O VT é máximo em Março e mínimo em Outubro, e volta a aumentar em Janeiro (Robalo Silva *et al.*, 2003; Agrícola *et al.*, 2004, Robalo Silva *et al.*, 2007). O VT apresenta uma correlação positiva com a PTE ($r=0,654$, $P=0,0024$), mas apesar de alcançar o mínimo em Outubro, a PTE decresce até atingir o mínimo em Janeiro (Robalo Silva *et al.*, 2007). O número total de espermatozóides viáveis também decresce para cerca de metade desde a Primavera até ao Inverno (Agrícola *et al.*, 2004), onde se registou o valor mínimo (Robalo Silva *et al.*, 2007).

O aumento da produção diária de espermatozóides que marca o início do período reprodutivo está associado a elevações significativas na concentração plasmática de FSH, de LH, de testosterona (Johnson e Thompson, 1983; Clay *et al.*, 1988) e de estradiol-17 β (Thompson *et al.*, 1978). Estas hormonas apresentam um padrão circanual de secreção,

estimulado pelo aumento do número de horas de luz, com picos em Maio e Junho (Clay *et al.*, 1988). A FSH sofre um efeito redutor sazonal menos acentuado que a LH e a testosterona. Durante o período de recrudescência sazonal, o aumento da concentração de LH deve-se ao aumento da concentração basal e da amplitude dos pulsos, e não do número de pulsos diários (Clay *et al.*, 1988). Existe uma relação temporal entre a concentração de LH e de testosterona em que picos de concentração plasmática de testosterona se seguem a picos de concentração plasmática de LH. Presumivelmente, o aumento de concentração de gonadotrofinas, principalmente da LH (Clay *et al.*, 1989), vem na sequência do aumento da secreção de GnRH pelo hipotálamo e/ou aumento da sensibilidade da hipófise a esta hormona, uma vez que esta sensibilidade é parcialmente regulada pelas hormonas produzidas nas gónadas (Clay *et al.*, 1988 e 1989).

A genética também tem uma participação activa sobre a sazonalidade. Os carneiros de raças desenvolvidas em regiões temperadas (por exemplo a raça Suffolk) apresentam uma sazonalidade mais marcada do que carneiros oriundos de regiões mediterrânicas (como é o caso do Merino). Da mesma forma, equídeos originários de zonas temperadas evidenciam uma sazonalidade mais marcada que os seus parentes tropicais (Asa, 2002). Em latitudes mais elevadas, a sazonalidade é principalmente determinada pelo número de horas de luz, enquanto que em regiões mediterrâneas, a nutrição pode sobrepor-se a esse efeito (Hotzel *et al.*, 2003). Daí que éguas e garanhões PSL com boa condição corporal continuam a exibir ciclicidade ovárica e/ou boa capacidade reprodutiva durante os meses de Outono e Inverno (Ferreira-Dias *et al.*, 2005; Robalo Silva *et al.*, 2007). O clima mediterrânico, muito quente no Verão, pode inclusivamente dificultar o comportamento sexual dos garanhões PSL, que manifestam melhores parâmetros comportamentais durante o Outono-Inverno (Robalo Silva *et al.*, 2007).

2.3.2.2: Controlo endócrino da espermatogénese

Os processos da produção de gâmetas e secreção de hormonas pelas gónadas são regulados por um mecanismo complexo de sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos (Roser, 2008). Para garantir a função testicular é necessário conjugar a acção de hormonas sistémicas e factores testiculares locais (Roser, 2008). O estímulo hormonal é providenciado por um vasto conjunto de hormonas cujo mecanismo de acção se desenvolve durante o período pré-pubere do animal (Hafez e Hafez, 2000b).

A produção de gâmetas inicia-se a partir da puberdade e prolonga-se durante a vida do garanhão. A duração média da espermatogénese no cavalo é de 12 dias e implica a transformação faseada de células germinativas em espermatozóides (figura 2.5).

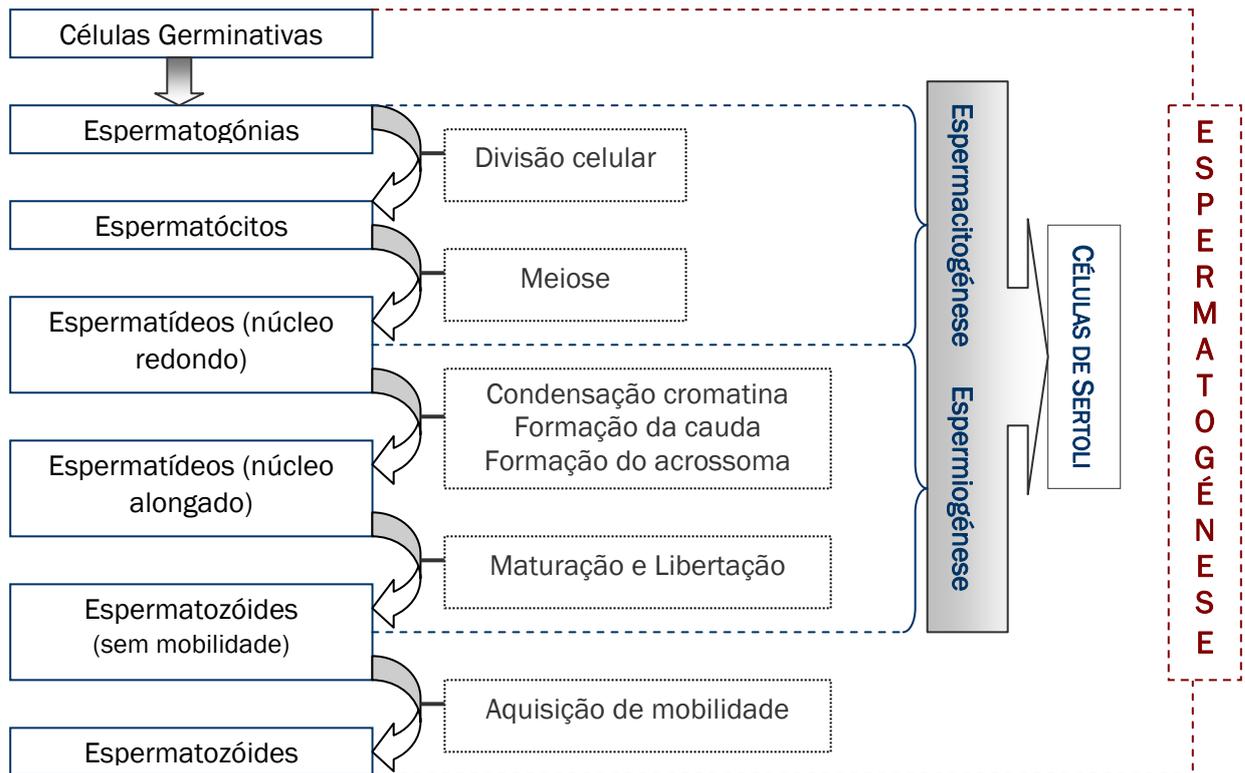


Figura 2.5. Mecanismo da espermatogênese.

Ao contrário do que sucede com a produção dos gâmetas femininos, a produção de espermatozóides não é governada por alterações hormonais cíclicas. As hormonas mais importantes para a regulação da reprodução nos machos são a GnRH, FSH, LH, testosterona, estradiol-17 β , inibina, activina e prolactina (PRL). A secreção de gonadotrofinas, testosterona e estradiol-17 β ocorre ao longo do ano mas apresenta um padrão circanual de maior concentração na Primavera-Verão (dias longos), o que faz com que a libertação de gâmetas seja permanente mas que se concentre durante a época reprodutiva (Clay *et al.*, 1987; Robalo Silva *et al.*, 2007). Outras hormonas como a hormona da tiróide (TH) e hormona do crescimento (GH) podem estar envolvidas na regulação da função testicular no macho, uma vez que a sua importância já foi comprovada noutros mamíferos (Roser, 2008).

As gonadotrofinas, LH e FSH, actuam sobre tecidos alvo específicos nos testículos do macho. O tecido alvo da LH são as células de Leydig que se encontram nos tecidos intersticiais dos testículos. A sua função prende-se com o estímulo à produção de testosterona e estrogénios, necessários para o processo da espermatogênese. A LH atinge o máximo de concentração plasmática no sangue no pico da época reprodutiva, o que coincide com o pico de produção de gâmetas. A sua secreção é controlada pela GnRH hipotalâmica, e tem um ritmo pulsátil. A concentração plasmática de LH do macho sexualmente activo é da ordem dos 3 a 4 ng/mL (Morel, 2003). A PRL potencia a acção da

LH sobre as células de Leydig em espécies pecuárias, mas a sua acção ainda não é totalmente clara nos cavalos (Thomson *et al*, 1996).

O ritmo de secreção de FSH é contínuo e depende dos níveis de GnRH segregados pelo hipotálamo. A concentração plasmática de FSH no garanhão sexualmente activo ronda os 7-7,5 ng/mL (Morel, 2003). A FSH é o sinal endócrino que leva as células de Sertoli a desencadear a espermatogénese, ao estimular a evolução das espermatogónias para espermatócitos secundários. Paralelamente, e também por acção da FSH, ocorre a regulação da produção de estrogénios, inibina e activina pelas células de Sertoli. Quando a concentração plasmática de FSH é elevada, ocorre um aumento da secreção de inibina, surtindo-se um efeito de *feedback* negativo sobre a libertação de FSH pela hipófise. A inibina é elevada durante o período de anestro sazonal (Morel, 2003). A activina é produzida quando as concentrações de FSH são baixas. Aumenta de concentração na época reprodutiva (Roser, 1997), inibe a GH (Hafez e Hafez, 2000b) e considera-se que surte um efeito de *feedback* positivo sobre a secreção hipofisária de FSH (Blanchard e Varner 1996), apesar deste mecanismo ainda não ser claro nos cavalos (Roser, 2008). A proteína transportadora de androgénios (PTA) é segregada pelas células de Sertoli para o lúmen dos tubos seminíferos, forma um complexo com os androgénios e permite-lhes transitar para o epidídimo juntamente com os espermatozóides (Hafez e Hafez, 2000a).

A testosterona é um androgénio constituído por um esteroide de 19 carbonos produzido pelas células de Leydig e pelo córtex adrenal (Hafez, 2000). A secreção de testosterona pelas células de Leydig implica a estimulação destas células pela LH. Um pico de testosterona é geralmente precedido por um pico de LH e, uma vez que a LH apresenta uma secreção do tipo pulsátil, a testosterona exhibe um comportamento semelhante (Clay *et al.*, 1988). Nos cavalos, também ocorre produção de testosterona a nível dos tubos seminíferos e do epidídimo (Morel, 2003). Para que se torne biologicamente activa e actue no núcleo da célula alvo, a testosterona tem de ser convertida em di-hidrotestosterona (Morel, 2003). Os principais tecidos alvo da testosterona encontram-se no SNC, no hipotálamo, na hipófise e nos testículos. Um nível plasmático elevado de testosterona estimula o aumento da libido, acção esta exercida a nível do SNC. Por outro lado, também é a condição para que ocorra *feedback* negativo sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, inibindo a produção de GnRH e, conseqüentemente, a libertação de LH. Uma menor secreção de LH leva a uma menor produção de testosterona, o que diminui o efeito do *feedback* negativo até se tornar possível a formação de um novo pulso de secreção de GnRH (Morel, 2003).

O principal modo de acção da testosterona é o endócrino, o que requer que a hormona seja transportada até ao tecido alvo via corrente sanguínea, ligada à α -globulina. A nível dos testículos, também pode passar por difusão das células de Leydig para os tubos seminíferos e, em conjunto com a FSH, ministra o sinal para que as células de Sertoli

produzam factores locais que induzem e mantêm o desenvolvimento das células germinativas (Roser, 2008). A espermatogénese é iniciada pela acção da FSH mas são necessários níveis elevados de testosterona para que ocorra a maturação de espermátócitos de núcleo alongado em espermatozóides e se complete o processo (Morel, 1999).

Durante os meses típicos da época reprodutiva as concentrações de testosterona sofrem um aumento significativo (Johnson e Thompson, 1983; Clay *et al.*, 1988; Clay *et al.*, 1989). Nesta época, a sensibilidade da hipófise à GnRH exógena também está aumentada, principalmente entre Fevereiro e Agosto (Clay *et al.*, 1989). Consequentemente, o estímulo da GnRH exógena vai surtir um efeito positivo sobre a secreção de FSH e, principalmente, de LH, que por sua vez vai estimular a testosterona (Clay *et al.*, 1989). Os níveis basais de testosterona plasmática típicos da época reprodutiva são >1,0 ng/mL (quadro 2.3) (Johnson e Thompson, 1983; Clay *et al.*, 1988; Clay *et al.*, 1989).

Quadro 2.3. Valores de testosterona em garanhões adultos durante a época reprodutiva e a época correspondente ao anestro sazonal das éguas.

Testosterona (ng/mL)		Autor
Primavera-Verão	Outono-Inverno	
>2 ng/mL – 4 ng/mL	≈ 2 ng/mL	Clay <i>et al.</i> , 1988
1,5 – 3 ng/mL	< 1,5 ng/mL	Clay <i>et al.</i> , 1989
2 – 4 ng/mL	1,9 – 3,0 ng/mL	Johnson e Thompson, 1983

Para além das variações sazonais que se verificam, existem evidências de que existe um ritmo diurno de secreção de testosterona, com picos às 06:00 e às 18:00 horas (Pickett *et al.*, 1989). No entanto, Blanchard *et al.* (2003), recomendam que para ensaios hormonais, as colheitas de sangue se devem efectuar entre as 09:00 e as 13:00 horas, pois é neste período que as concentrações de gonadotrofinas e de androgénios atingem o pico.

Os estrogénios resultam da bioconversão irreversível da testosterona em estradiol por acção da enzima aromatase. Esta hormona é considerada como crucial no balanço entre estrogénios e androgénios. Como tal, é importante na regulação de processos dependentes dos estrogénios como são a maturação do tecido ósseo (Lemazurier *et al.*, 2002) e a reprodução (Hess *et al.*, 1998). São os esteróides que se encontram em maior concentração nos animais imaturos (Lemazurier *et al.*, 2002). O garanhão possui uma concentração testicular de estrogénios muito superior a outras espécies pecuárias, e aumenta com o grau de maturidade sexual (Sipahutar *et al.*, 2003). A produção de estrogénios ocorre sobretudo nas células de Leydig, mas no cavalo também ocorre secreção a nível das células de Sertoli (Sipahutar *et al.*, 2003) pelo que depende da

estimulação destas células por parte da LH e da FSH (Roser, 2008). Considera-se que os estrogénios também surtem o mesmo efeito de *feedback* negativo que a testosterona sobre a libertação de LH ao inibir a secreção de GnRH pelo hipotálamo (Blanchard *et al.*, 2003; Roser, 2008). A função dos estrogénios é essencialmente endócrina, mas uma vez que foram encontrados receptores nos tubos seminíferos, especula-se que possa apresentar uma função parácrina a nível da espermatogénese (Sipahutar *et al.*, 2003).

2.3.3. A Puberdade no Garanhão

A puberdade no cavalo doméstico tem vindo a ser estudada há mais de cinquenta anos, sem que se conheçam ainda todos os mecanismos envolvidos neste processo. A entrada na puberdade nos animais do sexo masculino é mais difícil de determinar, uma vez que corresponde a um processo de desenvolvimento progressivo e não a um acontecimento pontual (Brown-Douglas *et al.*, 2004; Guillaume *et al.*, 2006). Em animais do sexo masculino do género *Equus*, com base na primeira cópula, as idades de entrada na puberdade oscilam entre os 7 meses e os 60 meses (*E.grevyi*), mas com a média das restantes espécies estudadas – *E. zebra*, *E. burchelli* e *E.przewalski* – a rondar os 42, 24 e 31 meses, respectivamente. Estes valores são tendencialmente maiores para os machos do que para as fêmeas da mesma espécie, podendo essa diferença chegar a vários anos (Asa, 2002). A diferença entre a idade à primeira cópula pode prender-se com questões sociais, uma vez que mesmo que os machos jovens manifestem comportamento sexual (reflexo de Flehmen, extensão e erecção do pénis), são geralmente rejeitados pelas fêmeas, mesmo que estas estejam em cio (Melo *et al.*, 1998).

2.3.3.1. Idade de entrada na puberdade em poldros

Tal como sucede com as éguas, a idade média de entrada na puberdade dos machos do *Equus caballus* é de 18 meses, mas pode oscilar entre os 8 e os 24 meses (Naden *et al.*, 1990a; Brown-Douglas *et al.*, 2004). A idade de entrada na puberdade nos cavalos depende da época de nascimento, (Ginther, 1992; Brown-Douglas *et al.*, 2004), do fotoperíodo (Skinner e Bowen, 1968; Naden *et al.*, 1990a e 1990c; Guillaume *et al.*, 2006) do estado imunitário e/ou sanitário (Ginther, 1992) da raça (Dordari *et al.*, 2005) e do nível alimentar (Guillaume *et al.*, 2006).

O aumento da produção de gâmetas e o aumento da libido típico da época reprodutiva em garanhões são precedidos de um aumento da concentração de gonadotrofinas e de androgénios (Johnson e Thompson, 1983; Clay *et al.*, 1988; Irvine e Alexander, 1991; Robalo *et al.*, 2007). Em 1990(a), Naden e colaboradores observaram o

mesmo padrão em animais pré-pubescentes, que verificaram níveis de testosterona plasmática elevados e superiores a 0,5 ng/mL no mês anterior ao mês em que obtiveram capacidade reprodutiva. A puberdade foi então definida como o momento em que as gónadas atingiram a capacidade de produzir androgénios suficientes para garantirem um ejaculado com 50×10^6 espermatozóides com pelo menos 10% mobilidade.

Atualmente aceita-se que não existe previsibilidade na idade de entrada na puberdade, dada a complexidade dos mecanismos envolvidos e as diferenças nos resultados dos trabalhos realizados em diferentes raças (quadro 2.4).

Quadro 2.4. Idade média de entrada na puberdade determinada por diferentes autores e para diferentes raças em machos da espécie *Equus caballus*.

Idade média (meses)	Raça	Autores
11,5 a 14,5 (n=4)	Póneis Welsh	Skinner e Bowen, 1968
12 a 23,6 (n=23)	Quarter Horse	Cornwell, 1972
17 a 22	Anglo-Normando	Glassneck, 1978
12,9 a 22,3 (n=15)	Quarter Horse	Naden <i>et al.</i> , 1990a
19 (n=8)	Quarter Horse	Naden <i>et al.</i> , 1990c
19 (n=?)	N.D.	Clay e Clay, 1992
24	N.D.	Hondo <i>et al.</i> , 1998
15,6 a 27,5 (n=26)	Pantaneiro	Melo <i>et al.</i> , 1998
17 a 19 (n=8)	Póneis	Argo <i>et al.</i> , 2001
12	Warmblood	Lemazurier <i>et al.</i> , 2002
8 a 13 (n=23)	Puro-Sangue Inglês	Brown-Douglas <i>et al.</i> , 2004
13 (n=6)	Puro-Sangue Inglês	Brown-Douglas <i>et al.</i> , 2005
12 a 34 (n=7)	Cavalo-miniatura Cáspio	Dordari <i>et al.</i> , 2005
17,3 a 24,7 (n=11)	Sela Francês	Guillaume <i>et al.</i> , 2006

Legenda: N.D. = não definido.

Raça

A genética do animal também é importante, sendo que determinadas raças são mais precoces tanto em termos de crescimento como de desenvolvimento sexual, entrando mais cedo na puberdade (Dordari *et al.* 2005). Devido à introdução no Novo Mundo de cavalos de origem ibérica (Andrade, 1954 citado por Luís *et al.*, 2007), das raças apresentadas no quadro 2.4, a que mais se aproxima geneticamente do cavalo PSL é a raça Pantaneiro (Luís *et al.*, 2007).

Época de Nascimento – efeito da sazonalidade

Tal como foi mencionado para as éguas (ponto 2.2.3 da presente revisão), e para os garanhões adultos (ponto 2.2.2.1), a influência do fotoperíodo também se faz sentir na cinética hormonal de poldros e, conseqüentemente, afecta o desencadear da puberdade. Brown-Douglas *et al.* (2004 e 2005) conduziram um estudo em poldros PSI para testar as diferenças no padrão hormonal de gonadotrofinas e testosterona entre animais nascidos na Primavera e animais nascidos no Outono. Neste ensaio, os animais evidenciaram a mesma cinética hormonal, independentemente da época de nascimento, tendo os poldros nascidos no Outono apresentado concentrações de gonadotrofinas crescentes com menor idade que os poldros nascidos na Primavera. Todos os poldros entraram na puberdade na Primavera do segundo ano de vida, entre os 8 e os 11 meses de idade. No entanto, os valores de concentrações hormonais foram inferiores nos animais nascidos mais tarde, assim como a intensidade da resposta ao estímulo providenciado pela administração de GnRH exógena (Brown-Douglas *et al.*, 2005).

Peso Vivo (Maturidade)

Existem diversos estudos que comprovaram a importância da obtenção de uma percentagem do PVA em poldras (vide ponto 2.2.3 da presente revisão). No entanto, apesar de outros trabalhos mencionarem a sua potencial importância em poldros, apenas Brown-Douglas *et al.* (2004) concluíram que em poldros PSI, o limite para entrada na puberdade é de 49% do PVA, independentemente da idade. A importância do peso do animal é evidente quando se comparam garanhões entre os 13 e os 40 meses: o peso apresenta correlações positivas com o peso dos testículos, a produção diária de espermatozóides e os níveis de testosterona (Melo *et al.*, 1998). Brown-Douglas *et al.* (2005), observaram algo semelhante quando os dois poldros mais pesados foram os que mais cedo evidenciaram uma resposta da testosterona à GnRH exógena.

2.3.3.2. Desenvolvimento do aparelho reprodutivo

O desenvolvimento dos órgãos reprodutores do poldro inicia-se durante o período pré-natal. Os testículos desenvolvem-se no abdómen do feto, na linha medial dos mesonefros. A diferenciação das diferentes estruturas que compõem o aparelho sexual masculino decorrem devido à acção de androgénios fetais e de uma glicoproteína, que inibem o desenvolvimento dos ductos de Müller em benefício dos ductos de Wolff (Hafez, 2000). De forma semelhante ao que sucede com as gónadas femininas, os testículos dos poldros demonstram um período de elevado crescimento até aos 215 dias de gestação,

quando atingem os 80g. Até ao nascimento, a hipertrofia testicular regride até as gónadas terem entre 10 a 20g (Cole *et al.*, 1933).

A principal característica morfológica dos testículos durante o período fetal é a sua grande massa intersticial, que decresce a partir do nascimento e até aos nove anos de idade (Hondo *et al.*, 1998). Os mesmos autores estudaram testículos de fetos e verificaram que entre os 155 dias de gestação e o ano de idade do animal, o epitélio seminífero era constituído de gonócitas e células de Sertoli.

A descida dos testículos ocorre a diferentes idades, mediante a espécie animal (Hafez, 2000). Nos cavalos, a descida dos testículos ocorre geralmente entre 1 a 3 semanas de idade, podendo no entanto já ter ocorrido no momento do nascimento (Hafez, 2000; Morel, 2003).

Durante o período pré-pubere, ocorre um crescimento intenso das gónadas, que aumentam de peso e de volume (Naden *et al.*, 1990a; Melo *et al.*, 1998; Hafez e Hafez, 2000). Este crescimento está correlacionado essencialmente com a idade ($r > 0.82$, Naden *et al.*, 1990a; $r = 0.87$, Melo *et al.*, 1998) e com o PV do animal ($r > 0.67$, Melo *et al.*, 1998). A velocidade do crescimento testicular aumenta após o primeiro Inverno, quando a secreção de androgénios aumenta em função do fotoperíodo crescente (Skinner e Bowen, 1968). Nos cavalos, o testículo esquerdo é geralmente maior do que o direito, e essa diferença intensifica-se após a puberdade (Naden *et al.*, 1990a; Melo *et al.*, 1998; Hafez e Hafez, 2000a). Uma das principais características histológicas dos testículos durante o período pré-pubere é o aparecimento e o desaparecimento de grânulos pigmentados nos espaços intersticiais – estes grânulos não se encontram presentes entre os 155 e os 248 dias de gestação, mas aparecem bruscamente aos 3 dias pós-parto. Após atingir um máximo aos 2 meses de idade, o número de grânulos decresce gradualmente a partir do ano de idade ao longo da maturação sexual dos poldros, até desaparecer aos 3 anos de idade (Hondo *et al.*, 1998).

Paralelamente ao crescimento, ocorre também desenvolvimento e diferenciação celular. Em 1983, Amann e Walker postularam que o incremento da concentração de LH pós-invernal no poldro pré-pubere induz a diferenciação das células de Leydig, permitindo a secreção de testosterona necessária para o funcionamento normal das células de Sertoli e, conseqüentemente, para o início da espermatogénese. O aparecimento de espermatozoides nos testículos pode ocorrer durante o primeiro ano de vida, mas só mais tarde surge no ejaculado (Swierstra *et al.*, 1974). Através da avaliação histológica do tecido testicular, Melo *et al.* (1998), verificaram que em poldros Pantaneiro de até um ano de idade, o lúmen tubular ainda se encontrava em fase de desenvolvimento. O estado de imaturidade das gónadas foi notória, uma vez que os gâmetas ainda se encontravam na fase de espermátócitos primários e eram em menor número que nos garanhões adultos.

A manipulação de alguns factores, como a nutrição, durante a fase pré-puberal pode antecipar o início da puberdade ou aumentar o ritmo do crescimento testicular (Guillaume *et al.*, 2006). O momento da formação das células de Sertoli e da formação de espermatogónias definitivas marca o final do período pré-puberal e o início da espermatogénese (Hafez e Hafez, 2000a).

Assim, uma das formas mais fiáveis de determinar o grau de maturidade sexual no ganhão é através do estudo dos parâmetros seminais, uma vez que estes reflectem o grau de desenvolvimento e maturação gonadal (Skinner e Bowen, 1968; Naden *et al.*, 1990a; Hondo *et al.* 1998; Melo *et al.*, 1998; Hafez e Hafez, 2000a). Skinner e Bowen (1968) encontraram espermatozóides no ejaculado pela primeira vez quando os animais tinham em média 13 meses de idade, mas estes tinham uma fraca mobilidade. Já na fase púbere, cavalos Quarter-Horse apresentavam em média $1,14 \times 10^9$ espermatozóides por ejaculado, com mobilidade de apenas 26% (Naden *et al.*, 1990a). Neste estudo, verificou-se um crescimento acentuado dos testículos entre os 11 e os 20 meses de idade, que compreendeu grande parte do período pré-pubere e a puberdade dos animais. Entre os 20 e os 22 meses surgiu um patamar na curva de crescimento, o que coincidiu com os meses de Verão e com os valores apresentados por Pickett *et al* em 1989. O volume seminal e o número de espermatozóides aumenta nos anos seguintes ao da puberdade. Entre a puberdade e os dois anos de idade, a quantidade de espermatozóides pode aumentar três vezes, e aos três anos, essa diferença pode ser de sete vezes (Pickett *et al.*, 1989; Naden *et al.*, 1990a).

2.3.3.3. Controlo endócrino da puberdade no ganhão

Relativamente à maturação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, pode considerar-se que existem vários períodos que diferem entre si na cinética hormonal. Tal como sucede para as fêmeas, podem considerar-se o período fetal, período infantil, período pré-pubere, puberdade e período pós-pubere. No poldro, a diferença entre períodos encontra-se mais esbatida e verifica-se que a duração do período pré-pubere é geralmente maior que nas poldras. A reactivação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, que se encontra quiescente até à puberdade, leva à aquisição das características sexuais secundárias, aquisição da estatura típica do indivíduo adulto e à fertilidade (Odell, 1990; Hall, 2003).

Período fetal

Durante o período fetal, ocorre a secreção de androgénios responsáveis pela diferenciação celular necessária à formação do aparelho sexual masculino (Hafez, 2000). Já

no final da gestação, a exposição do hipotálamo aos androgénios origina um hipotálamo do tipo macho e, na sua ausência, o hipotálamo organiza-se de forma feminina (Davidson e Stabenfeldt, 1999). Ao nascimento, o poldro evidencia concentrações detectáveis de LH e FSH (Wesson e Ginther, 1980), mas pouco se sabe relativamente ao comportamento da curva de concentração destas hormonas *in-útero*.

Período infantil

De forma semelhante ao que sucede com as poldras, nos primeiros dias de vida os poldros apresentam concentração de gonadotrofinas detectáveis e, segundo o que determinaram Wesson e Ginther (1980) em pónéis nascidos na Primavera, na ordem dos 0,4 ng/mL para a LH e entre 0,8 e 1,4 ng/mL para a FSH. No entanto, contrariamente ao que sucedeu com as poldras, ambas as gonadotrofinas evidenciaram alterações nos níveis basais no primeiro ano. Do nono dia em diante, os poldros apresentaram níveis basais de FSH praticamente constantes ao longo do Verão e Outono, não aumentando como sucedeu com as poldras da mesma idade. No entanto, o comportamento da curva foi extremamente errático, oscilando entre os 3 e os 14 ng/mL e evidenciando vários picos entre Junho e Dezembro.

A LH sofreu um aumento (até aproximadamente 2 ng/mL) no princípio do Verão (2-2,5 meses de idade), que foi acompanhado por um aumento dos níveis de testosterona, pondo termo ao período infantil. No entanto, em cavalos de raça Quarter-Horse, apesar da LH ser segregada e chegar a concentrações na ordem dos 4-8 ng/mL durante o primeiro ano de vida, não foi suficiente para ocorrer secreção de testosterona. As alterações na concentração base das gonadotrofinas e a detecção de testosterona só aconteceram no ano seguinte ao de nascimento, a partir de Fevereiro, quando os animais já tinham 7 meses (Naden *et al.*, 1990a e 1990c).

Tal como sucede nas poldras, a duração do período infantil depende da época do nascimento, uma vez que as gonadotrofinas se mantiveram baixas e relativamente constantes em pónéis nascidos no Verão comparativamente a animais nascidos na Primavera (Wesson e Ginther, 1980).

Período pré-pubere

Pode considerar-se que os poldros entram no período pré-pubere, ou período preparatório para a entrada na puberdade, quando os níveis de gonadotrofinas aumentam, mas não o suficiente para permitir a gametogénese. A idade a que o animal entra no período pré-pubere depende da duração do período infantil. Nos pónéis estudados por Wesson e Ginther (1980), o período infantil dos animais nascidos na Primavera terminou por volta dos

dois meses, no Verão, quando se verificaram aumentos nos níveis de LH seguidos do aumento dos níveis de testosterona. Quando o fotoperíodo começou a decrescer, os níveis de LH desceram até <1 ng/mL, assim permanecendo até Dezembro, quando a média de idades era de dez meses. Durante os meses típicos de anestro, a concentração basal de LH mantém-se geralmente no mínimo até que o fotoperíodo aumente (Wesson e Ginther, 1980; Naden *et al.*, 1990 e 1990c; Brown-Douglas 2004 e 2005).

Em 1980, Wesson e Ginther determinaram que no primeiro Verão, a concentração de testosterona apresentou uma correlação temporal com a concentração de LH e foi de aproximadamente 120 pg/mL em poldros com 2,5 meses de idade, valor que é muito baixo comparativamente às concentrações verificadas num adulto contemporâneo (1,2 ng/mL). Este comportamento da curva de LH é semelhante ao observado em ovinos (Lee *et al.*, 1976). O pequeno aumento da concentração de LH e testosterona logo no primeiro Verão pode estar envolvido na programação do hipotálamo e da regulação do sistema hipofisário-gonadal (Wesson e Ginther, 1980). Mais tarde, Naden *et al.* (1990a), ao estudarem poldros de raça Quarter Horse, só encontraram um aumento de LH no início da Primavera do segundo ano, quando os poldros tinham em médias sete meses de idade. O prolongamento das baixas concentrações de LH nestes poldros deveu-se provavelmente à inibição sazonal que também se verificou nos meses de Outono e Inverno em poldros PSI nascidos na Primavera e no Outono (Brown-Douglas *et al.*, 2004 e 2005) e em garanhões adultos (Clay *et al.*, 1988). Em Abril, as concentrações de LH aumentaram bruscamente, de 2,5 para 7,5 ng/mL e, após este pico, foram detectadas as primeiras concentrações de testosterona, apesar de muito baixas ($<0,1$ ng/mL). Após o surgimento da testosterona, os níveis de LH desceram acentuadamente, até chegaram a um mínimo em Março do ano seguinte ($<1,0$ ng/mL) (Naden *et al.*, 1990a).

As elevações transitórias de LH e testosterona estão provavelmente envolvidas na sensibilização dos testículos à LH e no estabelecimento do *feedback* negativo da testosterona sobre o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. No ensaio de Naden *et al.* (1990a), a sincronização do aumento de testosterona com a redução dos níveis de LH é particularmente evidente e indicadora do estabelecimento do *feedback* negativo entre as gónadas e a hipófise. Em poldros PSI nascidos na Primavera ou no Outono, o rácio T/LH também aumentou em função da idade e do fotoperíodo, demonstrando que concentrações de LH semelhantes originam uma resposta sucessivamente maior, que se manifesta no aumento de concentração plasmática de testosterona (Brown-Douglas *et al.*, 2005). As concentrações médias máximas de LH nestes animais foram obtidas em Outubro (Primavera no hemisfério Sul), quando os poldros tinham entre 8 e 12 meses. A testosterona manteve-se baixa ($< 0,05$ ng/mL) desde o primeiro Verão e durante a maior parte do Inverno,

começando a aumentar no final desta estação para uma média de 0,22 ng/mL e chegando a >0,8 ng/mL no segundo Verão.

Apesar de nos animais adultos ambas as gonadotrofinas serem afectadas pelo *feedback* negativo, a FSH não sofreu uma redução de concentração tão intensa como a LH, sugerindo que as gonadotrofinas são reguladas de forma diferente durante o período pré-pubere (Naden *et al.*, 1990a). Também no trabalho de Wesson e Ginther (1980) ficou comprovado que o *feedback* negativo sobre o eixo hipotálamo-hipofisário se inicia durante o período pré-pubere. Estes autores verificaram que poldros castrados apresentavam concentrações de FSH e de LH superiores às dos poldros controlo, provavelmente devido à remoção do *feedback* negativo exercido pelas gónadas.

A resposta da hipófise à GnRH pode ser testada através da administração da GnRH exógena (Clay *et al.*, 1989; Naden *et al.*, 1990c; Brown-Douglas *et al.*, 2005). Naden *et al.* (1990c), verificaram que a resposta da hipófise foi maior e mais rápida quando as concentrações basais de LH eram mais elevadas, o que coincidiu com os meses de fotoperíodo elevado. A FSH teve um comportamento semelhante à LH apenas até Setembro do primeiro ano, mas a diminuição dos níveis basais de FSH precedeu em dois meses a redução da resposta à GnRH exógena. De Setembro em diante, a resposta da FSH foi semelhante à de animais adultos que evidenciam uma redução da resposta à GnRH exógena por efeito da sazonalidade (Clay *et al.*, 1988; Naden *et al.*, 1990c). Para além do fotoperíodo, a secreção de testosterona, através do aumento dos níveis de LH depende também da idade e do PV do animal. Os poldros PSI que evidenciaram uma maior resposta à GnRH, traduzida por um maior e mais precoce aumento da concentração plasmática de testosterona, foram simultaneamente os mais velhos e os mais pesados (Brown-Douglas *et al.* 2005). A primeira detecção de testosterona nestes animais ocorreu no período típico de anestro sazonal e quatro meses mais cedo do que nos animais nascidos no Outono, que só evidenciaram resposta na Primavera seguinte. É possível que a obtenção de um PV crítico esteja relacionado com o funcionamento das células de Leydig, e é também evidente que a sazonalidade não é tão marcada em animais do sexo masculino no *Equus caballus*.

No período pré-pubere ocorrem também alterações a nível do perfil das hormonas segregadas pelas gónadas. Os animais pré-puberes apresentam concentrações de testosterona (Wesson e Ginther, 1980; Inoue *et al.*, 1993) e de estrogénios inferiores aos dos machos adultos, o que sugere que estas duas hormonas são dois possíveis indicadores do grau de sensibilidade da função endócrina testicular no garanhão (Inoue *et al.*, 1993). Durante o primeiro ano de vida, os poldros apresentam geralmente um aumento dos níveis de esteróides sexuais no sangue durante os meses típicos da época reprodutiva (Primavera e Verão). Este fenómeno é independente da idade, o que é indiciador da supremacia dos factores climáticos e do fotoperíodo sobre a idade no que respeita à secreção de hormonas

pelas gónadas e à bioconversão dos androgénios em estrogénios nos animais imaturos (Lemazurier *et al.*, 2002).

Existem diferenças relevantes na primeira fase do desenvolvimento sexual entre machos e fêmeas do cavalo doméstico. Os poldros evidenciam uma maior concentração de esteróides sexuais (1,5 a 3,5 vezes superior) que as poldras no primeiro ano de vida, o que mostra a maior actividade da função hormonal testicular em comparação com a ovárica, no período pré-pubere (Lemazurier *et al.*, 2002). De entre as hormonas esteróides, os estrogénios são as que se encontram em maior concentração, sendo mais elevadas que em fêmeas do mesmo grau de maturidade sexual (Lemazurier *et al.*, 2002). Em termos da intensidade do efeito do fotoperíodo e do grau de maturação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal adquirida no primeiro ano de vida também são diferentes. Num estudo realizado por Wesson *et al.* (1980), comprovou-se que a resposta da LH à GnRH exógena em poldros com idade inferior a 70 dias se encontrava correlacionada positivamente com a idade do animal, mas o mesmo não se verificou nas fêmeas. Para além disso, ao passo que em poldros castrados o aumento da concentração de FSH e LH foi imediato, em poldras ovariectomizadas, o aumento da concentração de gonadotrofinas por efeito da remoção das gónadas só se verificou na Primavera do segundo ano. Isto sugere que o efeito de *feedback* negativo das gónadas sobre o eixo hipotálamo-hipofisário se desenvolve mais cedo nos machos e, possivelmente, que estes são menos influenciados pelo fotoperíodo, como aliás se constata nos animais adultos (Wesson e Ginther, 1980; Ginther, 1992).

Puberdade

Um dos primeiros trabalhos sobre a puberdade de poldros remonta a 1968. Skinner e Bowen (1968), estudaram um grupo de quatro pôneis e observaram as primeiras evidências de comportamento sexual, incluindo a masturbação, por volta dos 10,5 meses de idade, na segunda Primavera. Foi também por esta altura que ocorreu um aumento dos níveis de androgénios. Apesar dos animais reagirem à presença de uma égua em estro, as amostras de sémen só revelaram a presença de espermatozóides entre 1 a 3,5 meses depois, quando os animais tinham em média 13 meses de idade. No entanto, os espermatozóides presentes nos primeiros ejaculados apresentavam uma mobilidade muito reduzida.

A idade média de entrada na puberdade em gananhões Quarter-Horse determinada por Naden *et al.* (1990a e 1990c) foi de 19 meses. Apesar das concentrações de LH serem relativamente baixas no mês anterior à data de entrada na puberdade, Naden *et al.* (1990) verificaram um aumento brusco de testosterona em gananhões Quarter-Horse peripuberes no momento de entrada na puberdade. Logo, a obtenção de capacidade reprodutiva pode estimar-se através dos níveis de testosterona, uma vez que existe uma relação directa entre

esta hormona e o grau de desenvolvimento das células de Leydig e entre estas e o processo de espermatogénese (Johnson e Thompson, 1983; Naden *et al*, 1990; Hondo *et al*, 1998). A puberdade foi então definida como o momento que verifica três condições essenciais: níveis de testosterona >0.5 ng/mL e presença de 50×10^6 espermatozóides com 10% de mobilidade no sémen. Considerando que todo o processo da espermatogénese demora 57 dias no ganhão (Pickett *et al.*, 1989), a espermatogénese foi iniciada mais de um mês e meio antes do ejaculado apresentar as características supramencionadas. Por esta altura, verificou-se um aumento brusco dos níveis de testosterona, um aumento gradual da secreção de LH e FSH (Naden *et al*, 1990a) e uma maior resposta à GnRH exógena (Naden *et al*, 1990c). Este aumento ocorreu provavelmente por acção estimuladora da entrada na época reprodutiva (Fevereiro/Março), e marcou o início da puberdade (Naden *et al*, 1990a).

Num estudo posterior realizado por Melo *et al.* (1998), ganhões de raça Pantaneiro também evidenciaram comportamento sexual e níveis de testosterona típicos do período puberal no segundo ano de idade. Neste estudo, comprovaram mais uma vez que os níveis séricos de testosterona apresentavam uma correlação positiva com a idade e que a idade tinha uma correlação positiva forte ($r=0,86$) com o peso dos testículos e com a produção diária total de espermatozóides ($r=0,87$). No entanto, o desenvolvimento do epitélio seminífero era muito variável entre indivíduos e a eficiência do processo de espermatogénese era de apenas 50% dos valores estimados para ganhões adultos, limitando o potencial reprodutivo nesta idade (Melo *et al*, 1998). Estas características são o reflexo do desenvolvimento histológico gradual das gónadas. Para Hondo *et al*, (1998) os primeiros espermatozóides foram encontrados nos testículos ao segundo ano de vida, e o número de tubos seminíferos com espermatozóides no seu lúmen aumentou com a idade desde o primeiro até ao quarto ano de idade, quando o efeito da sazonalidade sobre os tubos seminíferos se fez sentir pela primeira vez.

Para além das gonadotrofinas, também o perfil dos esteróides sexuais se altera nos machos após a obtenção da maturidade sexual, com o aumento da concentração de testosterona e de estrogénios totais (Inoue *et al.*, 1993; Lemazurier *et al.*, 2002), que são evidência do aumento da actividade da enzima aromatase com a idade (Lemazurier *et al.*, 2001; Sipahutar *et al*, 2003). Num trabalho realizado por Inoue *et al.* (1993), as concentrações normais de testosterona e estrogénios para um animal sexualmente maduro foram obtidas quando os animais atingiram, em média, 16 meses de idade. Nesta fase, verifica-se uma inversão da relação entre os estrogénios e a testosterona – os estrogénios, (principalmente a estrona) que são o principal grupo de hormonas esteróides no poldro imaturo, são convertidos em testosterona por acção da enzima aromatase, fazendo com que esta aumente de concentração em detrimento dos estrogénios (Lemazurier *et al.*, 2002; Sipahutar *et al*, 2003). No entanto, o estradiol aumenta de concentração, sendo esta

elevada quantidade de estrogénios em circulação uma das particularidades do garanhão face a outras espécies pecuárias (Claus *et al.*, 1992; Lemazurier *et al.*, 2002).

Outras hormonas, como a leptina (vide ponto 2.4 da presente revisão) e a kisspeptin (vide ponto 2.2.3 da presente revisão) estão envolvidas nos mecanismos da puberdade. A leptina funciona como um factor permissivo, enquanto sinal metabólico do estado de condição corporal do animal, e a kisspeptin tem sido descrita como o sinal que dá início ao rol de eventos endócrinos inerentes ao momento entrada na puberdade.

Período pós-pubere

Nos animais do sexo masculino, o desenvolvimento das gónadas continua muito para além da puberdade. No garanhão, o tamanho máximo dos testículos e a plena maturação sexual, traduzida pela capacidade de produção máxima de androgénios e de gâmetas, só são atingidos anos depois da puberdade (Johnson e Thompson, 1983; Melo *et al.*, 1998; Hafez, 2000). Após a puberdade, e à medida que o fotoperíodo se vai tornando mais curto, a capacidade androgénica é retardada durante o segundo período invernal, após o qual o garanhão pode obter a sua função sexual potencial (Skinner e Bowen, 1968). Ao terceiro ano de vida, verifica-se um aumento da concentração de LH por efeito do aumento da intensidade dos pulsos, até atingir os valores típicos dos adultos (Clay *et al.*, 1988). Apesar dos 5 anos serem considerados como a idade em que os cavalos atingem o seu pleno desenvolvimento e a produção de espermatozóides típica da idade adulta (Melo *et al.*, 1998), o aumento do volume dos testículos pode verificar-se para além dessa idade (Johnson e Thompson, 1983) e a actividade espermatogénica pode crescer até aos 12 anos (Hondo *et al.*, 1998).

2.4. EFEITO DA NUTRIÇÃO SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS

A nutrição é um dos factores que mais condiciona o potencial reprodutivo nos mamíferos. A resposta do sistema reprodutivo a alterações no estado nutricional e metabólico influencia largamente a eficiência reprodutiva e económica das espécies zootécnicas, pelo que a maior parte dos estudos conduzidos sobre nutrição e reprodução têm recaído sobre as fêmeas.

O SNC é capaz de detectar as mais ténues variações nas alterações das reservas energéticas do organismo. Em resultado, a secreção de GnRH sofre estimulação ou inibição, dependendo de se tratar de um aumento ou redução da energia disponível (em circulação ou de reserva) (Williams *et al*, 2002). Nas fêmeas, está provado que a subnutrição aguda ou crónica leva à redução da secreção de LH, por inibição da secreção de GnRH. Mas, ao passo que nos casos de subnutrição durante um curto período se consegue reverter rapidamente este efeito, em casos de subnutrição crónica em que ocorre uma grande mobilização das reservas de gordura do organismo, o fornecimento de alimentos não restaura a função reprodutiva a curto prazo (Amstalden *et al.*, 2000; Williams *et al*, 2002; Barb e Kraeling, 2004). É necessário primeiro que o animal atinja um índice de massa corporal mínimo, ou de condição corporal, que é traduzida na deposição de massa gorda. Existem actualmente várias escalas para a estimativa da condição corporal em animais domésticos, incluindo os cavalos (anexo 2). A escala de avaliação da condição corporal foi inicialmente concebida para ovinos, uma vez que (1) nesta produção é usual fazer a gestão das reservas corporais de gordura dos animais de forma a fazer uso máximo dos recursos da pastagem e a baixar os custos de produção e que, (2) devido à lã que cobre o corpo do animal, é necessário recorrer à palpação para estimar a quantidade de reservas corporais e o sentido da sua variação (Caldeira, 2005).

Existe uma associação clara entre a nutrição e a maturidade sexual. Em humanos, a subnutrição leva a um atraso do aumento do crescimento típico na puberdade, ao passo que a obesidade está associada com o antecipar desta fase, de tal forma que em países desenvolvidos existe uma tendência para a puberdade ocorrer a idades mais jovens (Styne, 1995; Hall, 2003). Por outro lado, a subnutrição crónica ou a rápida perda de peso em mulheres resulta na cessão dos ciclos menstruais (Hall, 2003). Estes princípios também são válidos para as espécies animais. Em bovinos, suínos e ratos, a restrição alimentar atrasou a puberdade (Amstalden *et al*, 2000; Barb *et al.*, 2001; Zeinoaldini *et al*, 2006).

Nas espécies sazonais, a nutrição e o fotoperíodo são os principais determinantes da idade de entrada na puberdade. Foster e Ryan (1979), referiram a importância da nutrição na puberdade em ovinos. Em cavalos, Wesson e Ginther (1981b) verificaram uma elevada sincronização no mês de entrada na puberdade em 9 pôneis (fêmeas), após terem

transferido os animais de um recinto fechado para a pastagem. Durante o mês que se seguiu, os animais obtiveram uma velocidade de crescimento duas vezes superior ao verificado até então, sugerindo que a sincronização pode ter-se devido ao estímulo nutricional. Uma nutrição insuficiente no pós-desmame (6 a 12 meses de idade) retarda o crescimento e pode atrasar em vários meses ou mesmo inibir a entrada na puberdade no pônei (Ellis e Lawrence, 1978). Mais recentemente, Guillaume *et al.* (2006), estudaram o efeito de dois níveis nutricionais na puberdade de cavalos Sela-Francês e concluíram que os poldros que foram alimentados com um regime alimentar de “nível elevado” (NE) apresentaram maiores níveis de testosterona e estrogénios plasmáticos que os animais alimentados com um regime alimentar de “nível moderado” (NM), entre os 6 e os 24 meses de idade e durante a primeira época reprodutiva, entre os 11 e 19 meses idade ($p < 0,0001$). Para estes autores, a idade de entrada na puberdade foi de $17,3 \pm 1,9$ meses para o grupo dos poldros NE e $24,7 \pm 1,0$ para os poldros NM a qual foi significativamente diferente entre os grupos ($p < 0,01$).

O crescimento depende naturalmente dos aportes nutricionais e é bastante evidente a interacção entre a puberdade e o crescimento (Ellis e Lawrence, 1978; Wesson e Ginther, 1981b; Melo *et al.*, 1998; Guillaume *et al.*, 2006). Até há pouco tempo não era claro como funcionava este mecanismo de *feedback* da nutrição e da condição corporal sobre a reprodução. Sabe-se hoje que a acção da nutrição sobre a reprodução e a acção do crescimento sobre a puberdade nos mamíferos, estão relacionados com a hormona leptina (Houseknecht *et al.*, 1998).

2.4.1. A Leptina

O tecido adiposo, outrora considerado somente como um tecido de armazenamento de massa gorda, é agora reconhecido como tendo um papel fundamental na homeostasia (Yang *et al.*, 2001). Recentemente, ficou comprovado que os adipócitos segregam moléculas biologicamente activas – as adipocitoquinas. Entre elas encontra-se a leptina, um factor de saciedade (Havel, 2002), que é geralmente proporcional à adiposidade (Takahashi *et al.*, 1996). A leptina é uma proteína 16kDa formada por 146 aminoácidos, sintetizada principalmente pelo tecido adiposo branco e segregada para o sistema vascular (Zhang, 1994).

Estudos já efectuados, localizaram os receptores da leptina (RL) na região hipotalâmica e na hipófise (Lin, *et al.*, 2000; Bjorbaek e Kahn, 2004), revelando a importância desta hormona na regulação do apetite, do crescimento e da reprodução (Houseknecht *et al.*, 1998; Barb *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2001). Também existem evidências de que o córtex cerebral é um alvo directo para a leptina na regulação da

ingestão de alimento e da função neuroendócrina (Grill *et al.*, 2002; Hosoi *et al.*, 2002). A acção da leptina no eixo hipotálamo-hipofisário é provavelmente mediada por neuropéptidos, como o neuropeptido Y (NPY), proopiomelanocortina (PMCO) e ácido gama-aminobutírico (GABA) (Cunningham *et al.*, 1999; Iqbal *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2002., Sullivan e Meontrer, 2004).

A leptina tem um papel fundamental no controlo da reprodução, como foi demonstrado em ratos deficientes nesta hormona (genótipo *ob/ob*) (Houseknecht *et al.*, 1998). Estudos em humanos e animais domésticos suportam a hipótese da leptina actuar como um sinal metabólico entre o estado nutricional e o SNC para facilitar e/ou permitir o desencadear da puberdade (Hall, 2003). Barb e Kraeling (2004), propuseram um modelo de acção da leptina sobre a reprodução para mamíferos de interesse zootécnico. Segundo estes autores, a produção de leptina a nível do tecido adiposo é controlada por alterações no balanço energético e surge um efeito de inibição sobre o NPY e de estimulação sobre a POMC, inibindo ou estimulando a secreção de GnRH e, conseqüentemente, de LH. As gónadas, por outro lado, surtem um efeito estimulador do tecido adiposo por intermédio dos estrogénios (figura 2.6).

Nos equinos, o receptor de mRNA da leptina foi detectado no fígado, pulmão, testículo, ovário, plexo coróide, hipotálamo e tecido adiposo subcutâneo (Buff *et al.*, 2002). Isto sugere que para além de actuar sobre a concentração de gonadotrofinas através do controle do eixo hipotálamo-hipófise, pode actuar directamente sobre a reprodução a nível das gónadas (figura 2.6) (Chilliard *et al.*, 2001; Houseknecht *et al.*, 1998; Spicer, 2001).

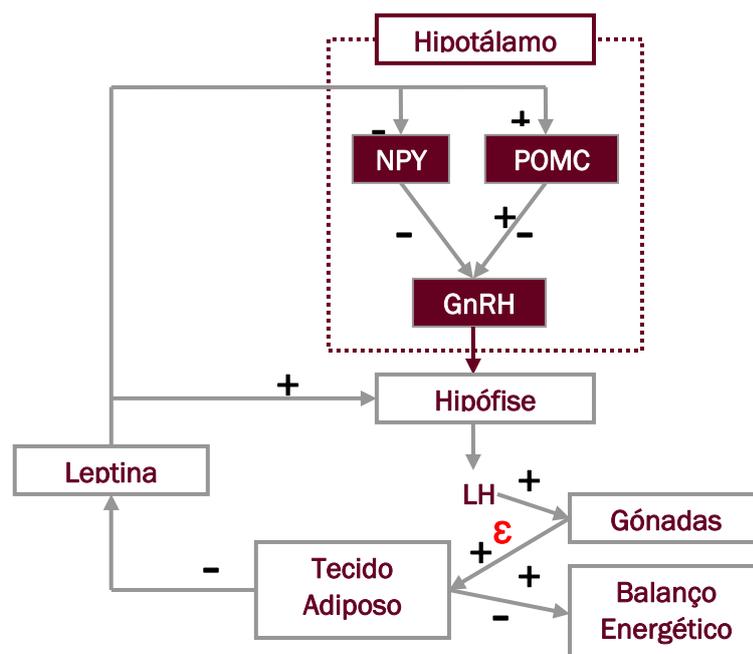


Figura 2.6. Modelo teórico proposto por Barb e Kraeling para a acção da leptina na regulação da reprodução em animais domésticos. (NPY, neuropeptido Y; PMCO, proopiomelanocortina; GnRH, hormona libertadora de gonadotrofinas; LH, hormona luteotrófica; ϵ , estrogéneos (adaptado de Barb e Kraeling, 2004).

A concentração de leptina tem uma forte correlação positiva com a nota de condição corporal (Waller *et al.*, 2006), reflectindo significativamente a quantidade de tecido adiposo do animal (Chilliard *et al.*, 2001). Depende também (1) do sexo, sendo maior em garanhões ou cavalos castrados (Buff *et al.*, 2002); (2) da idade, apresentando valores mais elevados para animais mais velhos (Buff *et al.*, 2002; Kearns *et al.*, 2006) e (3) da estação do ano (Garcia *et al.*, 2002), podendo decrescer 50% no período de anestro sem que haja alteração da condição corporal (Waller *et al.*, 2006). Para além disto, também varia ao longo do ciclo éstrico de fêmeas. Em bovinos, Garcia *et al.* (2002), verificaram que a leptina sérica tendia a decrescer no final da fase lútea e princípio da fase folicular, derivado a uma redução da expressão do gene da leptina.

Quando o aporte nutricional é insuficiente, em condições de escassez alimentar aguda ou prolongada, ocorre um decréscimo dos níveis plasmáticos de leptina (Buff *et al.*, 2005) que tem como consequência a inibição da secreção de gonadotrofinas, pelo que a condição corporal e o estado nutricional têm um impacto profundo na ocorrência, intensidade e duração do anestro sazonal nas éguas (Henneke *et al.*, 1983; Ginther, 1992; Gentry *et al.*, 2002b). A intensidade e a velocidade deste efeito inibidor dependem do tempo de duração do período de restrição alimentar e da espécie animal (Amstalden *et al.* 2000; Henry *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 2001; Buff *et al.*; 2002; Barb e Kraeling, 2004). Geralmente, animais com maiores notas de condição corporal sofrem uma redução das concentrações plasmáticas de leptina mais tardia (Buff *et al.*, 2002). Estudos já reportaram que, dentro das mesmas condições ambientais mas em restrição alimentar, éguas com baixa condição corporal apresentam níveis circulatórios de leptina baixos e um período sazonal de anestro mais prolongado que éguas em boa condição corporal (Gentry *et al.*, 2002b). Por outro lado, éguas jovens e magras tendem a entrar em anestro mais cedo do que éguas mais velhas e de condição corporal superior (Fitzgerald e McManus, 2000), e exibem uma recrudescência reprodutiva mais demorada no ano seguinte, chegando mesmo a permanecer em anestro até Abril ou Maio (Gentry *et al.*, 2002). Também já foi comprovado que éguas com nota de condição corporal elevada podem manter um nível de actividade folicular considerável durante todo o ano (Ferreira-Dias *et al.*, 2005; Waller *et al.*, 2006). No entanto, dada uma constante nota de condição corporal, o aumento artificial da concentração de leptina não influencia a data da primeira ovulação e a actividade ovárica e não altera as concentrações de progesterona, de LH e de FSH (Waller *et al.*, 2006).

No cavalo, existem diferenças nos níveis séricos de leptina entre sexos, apresentando os machos maiores concentrações de leptina que as fêmeas (Buff *et al.*, 2002). Nos machos, a concentração plasmática de leptina aumenta com a nota de condição corporal e com a idade, mas não se verificam diferenças significativas entre animais inteiros e animais castrados, sugerindo que a testosterona não está envolvida na regulação

periférica da leptina (Buff *et al.*, 2002). Os níveis circulatórios de leptina tendem a ser superiores em animais mais velhos (Kearns *et al.*, 2006), possivelmente devido à redução do nível de actividade física que se verifica nos animais de desporto (Buff *et al.*, 2002).

As sequências do gene para a leptina derivados de tecidos equinos têm uma elevada homologia com a leptina ovina, suína e bovina e também com os genes receptores da leptina o que indica que, do ponto de vista prático, o anti-soro de uma destas espécies pode ser utilizado noutra para efeito de estudos *in vitro* ou *in vivo* (Buff *et al.*, 2002). Os níveis de leptina sérica podem ser medidos por métodos enzimáticos (EIA) ou rádio-imunoensaios (RIA). O kit comercial multiespécies tem sido amplamente utilizado nos ensaios de equinos e baseia-se em anticorpos contra a leptina humana que demonstraram uma elevada reactividade com várias espécies (Cebulj-Kadunc e Cestnik, 2005).

Em suma, a leptina desempenha um papel importante ao transmitir informações sobre o estado nutricional do organismo ao eixo reprodutor central dos mamíferos, e há evidências que apontam para a possibilidade de ser um factor permissivo do início da puberdade (Zieba *et al.*, 2005). Nutrição insuficiente, ou escassez profunda de alimento, leva a uma diminuição na secreção de gonadotrofinas (LH e FSH) na maioria dos animais atrasando, ou mesmo impedindo, o início da puberdade, o início do período de estro nas fêmeas e provocando hipogonadotrofismo e infertilidade nos machos (Houseknecht *et al.*, 1998; Henry *et al.*, 2001; Spicer, 2001; Barb e Kraeling, 2004).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo, a recolha de dados decorreu entre Fevereiro de 2006 e Dezembro de 2008 e teve lugar essencialmente na coudelaria de Alter Real (AR), em Alter do Chão, Alentejo (39,2N -7,7). Em virtude de terem sido estudados animais de vários locais de origem, parte do trabalho decorreu também na Coudelaria Nacional (CN), no Mouchão do Esfola Vacas (39,1N -8,7) e no Mouchão do Salgueiral (39,0N -8,8). Nos dias em que se procedeu à recolha de amostras os animais foram recolhidos para um parque e conduzidos a uma manga de contenção, onde se efectuou a pesagem e a colheita de sangue. O período de recolhas decorreu entre as 10 e as 14 horas e foi feito de forma a salvaguardar o bem-estar e a integridade física dos animais.

3.1. ANIMAIS

O trabalho compreendeu 38 animais dos dois sexos, pertencentes à Fundação Alter Real, dos núcleos de AR e de CN. Em virtude das diferenças de maneio entre os dois núcleos, e de acordo com a idade e os procedimentos experimentais, subdividiram-se os animais em três grupos:

Grupo Fêmeas 1 ano (F1) – 14 poldras AR, nascidas em 2006.

Grupo Fêmeas 2 anos (F2) – 5 poldras AR, nascidas em 2005.

Grupo Machos 1 ano (M1) – 19 poldros (AR e CN) nascidos em 2006. (**M1A** – 16 poldros AR; **M2B** – 3 poldros CN)

- **F1** – As poldras de um ano foram acompanhadas entre Julho de 2006 e Setembro de 2007. Nasceram entre 27 de Janeiro e 12 de Maio de 2006 e foram desmamadas no final de Outubro de 2006, com uma idade média de $7,5 \pm 2,5$ meses.
- **F2** – As poldras de dois anos foram estudadas entre 21 de Junho e 24 de Julho de 2007 para verificar a ciclicidade ovária na 3ª Primavera. Estes animais foram seleccionados aleatoriamente e nasceram entre 23 de Janeiro e 9 de Maio de 2005.
- **M1A** – Os poldros AR foram acompanhados entre Março de 2007 e Outubro de 2008. Nasceram entre 11 de Fevereiro e 17 de Maio de 2006 e a idade média ao desmame foi de $7,1 \pm 2,2$ meses.
- **M1B** – Os poldros CN foram seguidos entre Janeiro de 2007 e Dezembro de 2008. Nasceram entre 6 de Abril e 17 de Maio de 2006 e a idade média ao desmame foi de 6,4 meses.

3.1.1. Maneio Geral

As operações de maneio geral no que se refere à alimentação dos animais, tipo e forma de utilização das instalações e operações de maneio higio-sanitário decorreram de acordo com as práticas de cada coudelaria.

Identificação

Todos os animais foram identificados desde o nascimento com um nome obtido mediante as regras de nomenclatura da raça, número de registo interno da coudelaria e/ou resenho. Após o desmame, os animais foram marcados a fogo, com o ferro da respectiva coudelaria na coxa direita e com o número de registo de nascimento na tábua esquerda do pescoço. No núcleo AR a identificação dos animais foi completada com a implantação de um micro-chip na base da crineira do lado esquerdo do pescoço.

Maneio Alimentar

No decurso do estudo, os dois núcleos de animais foram mantidos maioritariamente em regime extensivo, tendo a pastagem como base alimentar, de forma a maximizar a utilização dos recursos naturais disponíveis em cada coudelaria. Ao longo do ano, e em função das disponibilidades de erva, foi distribuído alimento composto complementar comercial, formulado para éguas em lactação e poldros em crescimento, cuja composição se descreve no quadro 3.1.

Quadro 3.1. Composição química do alimento composto complementar fornecido a todos os animais (informação fornecida na rotulagem).

PB (%)	GB (%)	Cinza total (%)	Celulose total (%)	Vitamina A (UI/kg)	Vitamina D3 (UI/kg)	Vitamina E (mg/kg)	Cobre (mg/kg)
17	3	6	10	7500	750	25	15

Núcleo AR (grupos F1 e M1A)

Os animais do núcleo AR utilizaram parcelas com pastagem espontânea de sequeiro, em regime rotacional, por vezes sobcoberto de azinho ou de olival disperso. Estas parcelas apresentavam alguma biodiversidade, embora com elevado número de plantas indesejáveis.

Do nascimento até ao desmame, os poldros foram mantidos na pastagem com as mães. Durante esta fase e conforme o maneio habitual desta coudelaria, as mães foram recolhidas diariamente (entre as 10 e as 15 horas) para distribuição do alimento composto

(quadro 3.1). Apesar desta prática não ser destinada aos poldros, o acesso ao alimento distribuído às mães não lhes foi restringido.

No pós-desmame os animais (F1 e M1A) transitaram para um parque onde permaneceram durante uma fase de adaptação. O regime alimentar durante este período consistiu na distribuição de feno ou palha de cereais e do alimento composto complementar (quadro 3.1), em quantidades que oscilaram entre 3,25 a 6 kg/animal/dia e 2,0 a 2,5 kg/animal/dia, respectivamente. Misturado no alimento composto foi ainda adicionado cerca de 0,6 kg de leite em pó.

No início de Fevereiro de 2007, os animais regressaram à pastagem, tendo a distribuição de alimento sido reduzida para uma média de 1,0 kg de alimento composto/animal/dia, dada a quantidade de erva disponível. Em Junho os machos (M1A) foram separados das fêmeas (F1) e formaram um grupo independente. As poldras F1 foram transferidas para outra parcela e incluídas no grupo de fêmeas de 2 e 3 anos.

Núcleo CN (grupo M1B)

As pastagens utilizadas pelos animais da coudelaria CN são igualmente pastagens permanentes de sequeiro, espontâneas e com um elevado número de plantas indesejáveis. Neste caso não é praticado o pastoreio rotacional. O manejo alimentar é semelhante ao praticado na coudelaria AR, mas a distribuição de alimento composto complementar às éguas de ventre foi realizada no campo, em comedouros destinados para o efeito.

Após o desmame, os poldros foram recolhidos para dois parques cobertos (Mouchão do Esfolo Vacas) onde permaneceram até serem transferidos para a pastagem. Durante este período, os animais foram alimentados com palha *ad libitum* e com alimento composto (quadro 3.1) numa quantidade média de 5 kg/animal/dia. No início da Primavera, as poldras (não estudadas) foram retiradas do parque contíguo ao dos poldros, transferidas para a pastagem e integradas no grupo das fêmeas de dois e três anos.

No início do Verão, os poldros (M1B) foram transferidos para a ilha do Mouchão do Salgueiral, tornando-se parte de um grupo composto por 74 animais até aos 4 anos de idade. A ilha tem cerca de 80 ha e a pastagem é espontânea, de sequeiro, existindo alguma erva verde nas margens que estão sujeitas ao alagamento, pelo efeito das marés. Diariamente, e em função das disponibilidades de erva, foi distribuído alimento composto complementar aos 74 animais em quantidades que variaram, em média, entre os 2 e 3 kg/animal/dia.

3.2. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Para a caracterização biométrica e ponderal dos animais foi efectuada a pesagem dos mesmos. Entre Abril e Julho de 2007 fez-se também uma apreciação visual da condição corporal (Anexo 2) dos animais do F1 e M1A, a partir da aplicação da escala francesa (IE, IC, INRA, 1997)

Peso

Para efeitos da avaliação do crescimento, foram utilizados dados referentes ao peso vivo (PV). Consoante o local, o PV foi determinado com uma balança digital ou uma balança manual de pesos, ambas com 1 kg de sensibilidade e com a seguinte periodicidade:

F1 – mensal, de Janeiro a Setembro de 2007;

M1A – mensal de Janeiro a Março e em Abril, Maio, Julho e Outubro de 2007.

M1B – mensal de Janeiro a Abril e em Junho e Setembro de 2007.

3.3. HORMONAS

Para a determinação das concentrações hormonais plasmáticas foram colhidas amostras de sangue por venopunctura da jugular para tubos de NH₄-heparina (Monovette-Sarsted) de 10mL de capacidade, com a periodicidade descrita nos pontos 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3. As amostras foram conservadas a 0 °C durante o transporte e centrifugadas a 4°C e a 2500 rpm durante 15 minutos. O plasma foi conservado em tubos “ependorfs” de 1,5 mL a -20°C até à realização dos ensaios para determinação das concentrações hormonais plasmáticas pelo método de rádio-imunoensaio (RIA). O princípio do procedimento do RIA de fase sólida assenta sobre a competição entre a hormona marcada radioactivamente e a hormona da amostra pela ligação específica com o anticorpo imobilizado na superfície do tubo. Após a ligação, procede-se à decantação e à posterior leitura dos tubos num contador gama. O valor devolvido pelo aparelho é convertido numa medida de concentração com base na curva de calibração.

3.3.1. Progesterona

O doseamento de progesterona sérica ou plasmática é um método eficaz e largamente utilizado para determinar a fase do ciclo éstrico das fêmeas em estudo (Thimonier, 2000; Brown-Douglas *et al.* 2004). No presente trabalho, a progesterona foi determinada por RIA em fase sólida, através de um kit comercial validado para equinos (Coat-a-count Progesterone, Siemens, California, EUA). O ensaio foi realizado em duplicado

para cada amostra e decorreu de acordo com os procedimentos descritos na bula (anexo 3). As determinações de progesterona reportam-se às colheitas de sangue realizadas com a seguinte periodicidade:

F1 – Entre Julho de 2006 e 11 de Abril de 2007 foram realizadas colheitas mensais (n=5). Entre 11 de Abril e 24 de Junho e em Setembro de 2007 foram recolhidas amostras com intervalos não superiores a 11 dias (n=14).

F2 – Entre 21 de Junho e 24 de Julho de 2007 foram realizadas quatro colheitas com periodicidade de 11 dias (n=5).

3.3.2. Testosterona

Em 2007, a determinação da concentração plasmática de testosterona foi efectuada utilizando um kit comercial RIA validado para equinos (Coat-a-count Testosterone, Siemens, Califórnia, EUA). O ensaio foi realizado em duplicado para cada amostra e decorreu como descrito na bula (Anexo 4) e com a seguinte periodicidade:

M1A – Mensal entre Fevereiro e Maio e bi-mensal entre Julho e Dezembro de 2007.

M1B – Mensal entre Janeiro e Fevereiro e em Junho e Setembro de 2007.

3.3.3. Leptina

A concentração de leptina reflecte a quantidade de tecido adiposo (Chilliard *et al.*, 2001) e está positivamente correlacionada com a nota de condição corporal (Waller *et al.*, 2006). Esta hormona apresenta um papel importante na regulação da reprodução (Houseknecht *et al.*, 1998).

Dado que as sequências do gene para a leptina apresentam uma elevada homologia entre as espécies pecuárias (Buff *et al.*, 2002), no presente trabalho utilizou-se o kit “Multispecies Leptin RIA kit, Linco Research, Missouri, USA” para determinação das concentrações plasmáticas desta hormona.

O ensaio foi realizado em duplicado para cada amostra e decorreu de acordo com os procedimentos descritos na bula (anexo 5). As determinações de leptina foram realizadas com a seguinte periodicidade:

F1 – Quinzenal, entre 11 de Abril e 24 de Julho de 2007 (n=14).

M1A – Mensal, entre Janeiro e Maio e bi-mensal entre Maio e Dezembro de 2007 (n=5).

M1B – Mensal, entre Janeiro e Abril, e em Junho e Setembro de 2007.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E TRATAMENTO DE DADOS

Para a análise descritiva dos resultados, nomeadamente média e desvio padrão, foram utilizados dois programas, o Microsoft Office Excel 2003 e o STATISTICA® versão 6.0 (StatSoft® Inc., EUA).

O modelo factorial para a análise de variância foi utilizado para avaliar o efeito dos níveis de cada hormona dos animais nas diferentes fases de maturidade sexual. A interacção hormona x fase do ciclo éstrico; hormona x sexo x idade foram determinadas analisando a diferença entre as médias para um intervalo de confiança de 95%, calculado pelo teste de Fisher.

4- APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O fotoperíodo é um dos factores determinantes na entrada na puberdade em animais sazonais. Em Portugal continental e nos locais de realização do trabalho, o número de horas de luz atinge um máximo de 15 horas diárias em Junho e ultrapassa o limiar de 9,5 horas de escuridão referidas por Palmer e Driancourt (1982) em Maio (figura 4.1).

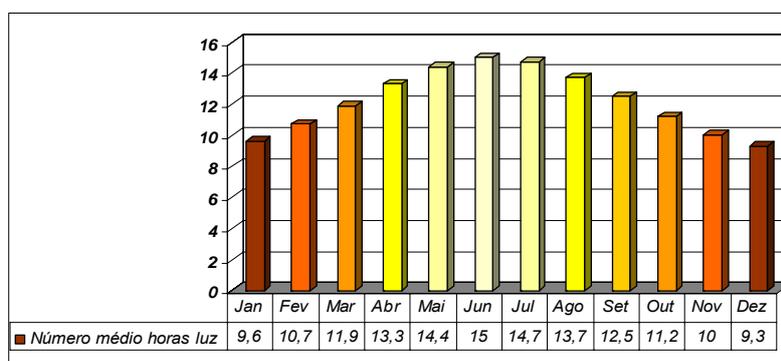


Figura 4.1. Número médio de horas de luz por mês, à latitude de 39° N (Doorembos e Pruit, 1977).

4.1 – POLDRAS

4.1.1. Idade de entrada na puberdade em poldras PSL

Para garantir que o pico de concentração plasmática de progesterona que se segue à primeira ovulação fosse identificado, as colheitas de sangue foram efectuadas com uma periodicidade máxima de 11 dias, tal como foi feito por Cebulj-Kadunc *et al* em 2006 para poldras Lipizzan. Os resultados obtidos para as poldras F1 entre dia 11 de Abril e 5 de Setembro de 2007 podem ser observados na figura 4.2.

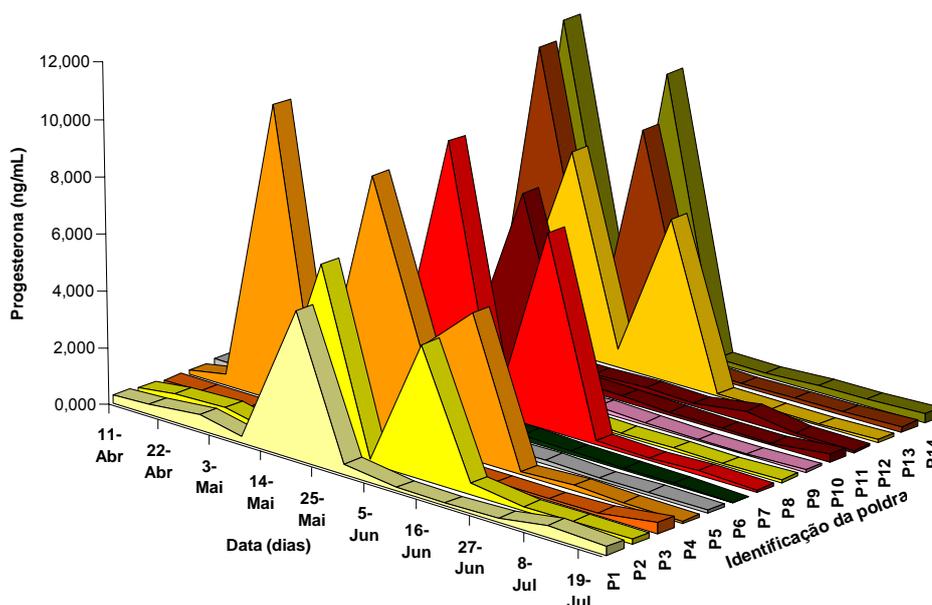


Figura 4.2. Curvas individuais da concentração plasmática de progesterona de poldras F1 nos meses em que os níveis de progesterona foram compatíveis com a actividade ovária cíclica.

As amostras de sangue recolhidas em cinco poldras, entre Julho de 2006 e Março de 2007, não revelaram concentrações de progesterona compatíveis com ciclicidade ovárica. Da análise da figura 4.2 verifica-se que a partir de Abril, das 14 poldras incluídas no estudo, apenas oito (57,1%) apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona superiores a 2 ng/mL no período de duração do ensaio (P1, P2, P4, P7, P10, P12, P13 e P14), o que garante a ocorrência da primeira ovulação e entrada na puberdade (Brown-Douglas *et al.*, 2004).

A média das concentrações de progesterona obtidas nos diferentes picos foi de $7,4 \pm 2,3$ ng/mL, o que é um valor normal para éguas em fase lútea. Todas apresentaram valores superiores a 5ng/mL, o que está dentro do intervalo de concentração de valores para a etapa intermédia da fase lútea sugerido por Ginther, 1992. A concentração mais baixa, e a única inferior a 5ng/mL foi de 3,4 ng/mL e pertenceu à poldra P4, que evidenciou um corpo lúteo de duração prolongada entre 21 de Maio e 11 de Junho.

4.1.1.1. Efeito da idade sobre a entrada na puberdade

Todos os animais F1 nasceram na mesma época (entre 27 de Janeiro e 12 de Maio de 2006). A figura 4.3 diz respeito ao número de animais que entraram na puberdade em cada grupo etário.

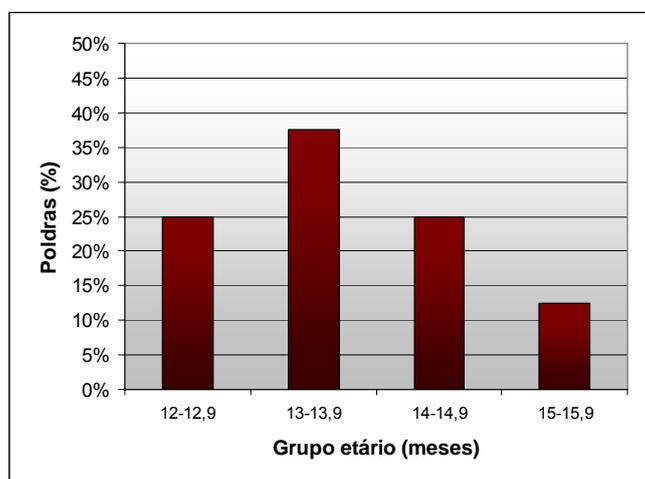


Figura 4.3. Poldras F1 (%) que ovularam pela primeira vez, por cada grupo etário (n=8).

Da análise da figura 4.3 verifica-se que, aquando da primeira ovulação, 2 dos animais tinham 12-12,9 meses (25%), 3 tinham entre 13 e 13,9 meses (37,5%), 2 tinham entre 14 e 14,9 meses (25%), enquanto que somente 1 dos animais entrou na puberdade com mais de 15 meses (12,5%). Os animais tinham entre os 12 e os 16 meses (média de $13,9 \pm 0,37$ meses) quando ovularam pela primeira vez. Este valor está dentro da gama de valores apresentados por outros autores para as raças ligeiras (Adams e Bosu, 1988;

Skelton *et al.*, 1991; Souza *et al.*, 1997; Lemazurier *et al.*, 2002; Brown-Douglas *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2004; Cebulj-Kadunc *et al.*, 2006; Guillaume *et al.*, 2006) e para pôneis (Wesson e Ginther, 1981a; Wesson e Ginther, 1981b; Palmer e Driancourt, 1983).

A idade da poldra não teve uma relação significativa com a entrada na puberdade ($p>0,05$). Apesar de nenhum dos animais nascidos em Maio de 2006 ter entrado na puberdade, um dos animais nascidos em Fevereiro e dois dos nascidos em Março também não evidenciaram ciclicidade ovárica no período de ensaio. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores relativamente à importância da idade na entrada na puberdade (Wesson e Ginther, 1981b; Brown-Douglas *et al.*, 2004; Cebulj-Kadunc *et al.*, 2006).

4.1.2. Efeito da sazonalidade sobre o momento de entrada na puberdade

Um dos principais factores permissivos da entrada na puberdade é o fotoperíodo. Todas as poldras que apresentaram picos de progesterona entraram em ciclicidade ovárica durante a Primavera do seu segundo ano de vida, no período típico de estro sazonal das éguas PSL adultas (Ferreira-Dias *et al.*, 2005).

Na figura 4.4. é possível observar que apenas uma das poldras (7,1% do total e 12,5% das poldras púberes) ovulou no final de Abril. As restantes 7 poldras (57,1% do total e 87,5% das poldras púberes) ovularam pela primeira vez em Maio, e todas as 8 poldras púberes se encontravam em ciclicidade ovárica durante este mês. Apesar dos ensaios de Wesson e Ginther (1981b) e de Cebulj-Kadunc e colaboradores (2006) terem sido executados a latitudes superiores, também o mês de Maio foi o mês em que um maior número de poldras entrou na puberdade. Maio antecedeu o mês de maior número de horas de luz (figura 4.1). Este resultado está de acordo com o que Nogueira *et al.*, (1997), observaram em poldras PSI no hemisfério Sul, em que o mês de entrada na puberdade precedeu o mês de maior fotoperíodo.

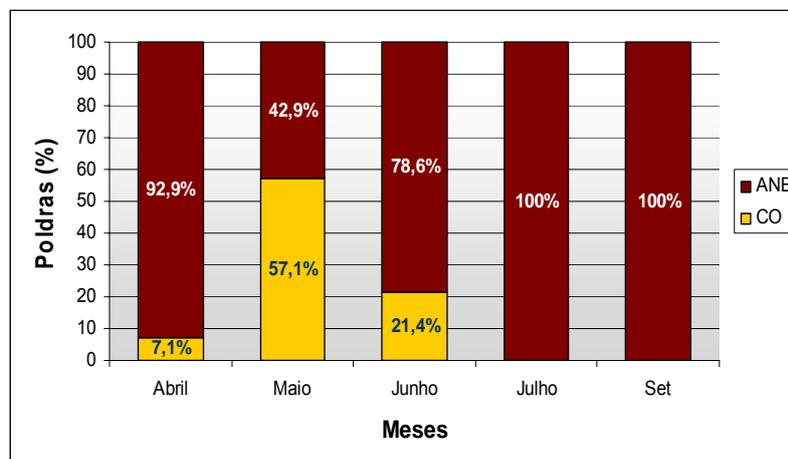


Figura 4.4. Poldras PSL de um ano de idade (%) que exibiram ciclicidade ovárica (CO) ou anestro (ANE) entre Abril e Setembro (n=14).

Após o mês de Junho, todas as poldras que entraram na puberdade evidenciaram dois valores baixos consecutivos de progesterona plasmática, o que sinalizou a entrada em anestro (Cebulj-Kadunc *et al*, 2006). Apesar do efeito da sazonalidade se ter feito sentir no momento de entrada na puberdade, o facto das poldras terem entrado em anestro no mês de Junho parece contrariar o que geralmente se verifica em éguas adultas, cuja época reprodutiva cessa geralmente no Outono (Ginther, 1992; Daels e Hughes, 1993; Nagy *et al*, 2000; Morel, 2003). Wesson e Ginther, (1981b) e Guillaume e colaboradores (2006) chegaram mesmo a registar a continuidade de ciclicidade ovárica nos meses de Inverno numa das poldras do seu estudo.

4.1.3. Duração da ciclicidade ovárica e número de ovulações

Dos animais que entraram em estro, 75% ovularam duas vezes e as restantes 25% ovularam apenas uma vez, em Maio (vide figura 4.2). Uma das poldras (P4) que ovulou duas vezes apresentou valores elevados de progesterona plasmática em três colheitas sucessivas, provavelmente devido à presença de um corpo lúteo prolongado. Resultados similares foram obtidos por Wesson e Ginther, (1981b) numa das pónes do seu estudo.

O número de ovulações verificado para as poldras PSL parece ser baixo relativamente ao verificado noutros estudos (Wesson e Ginther, 1981b; Brown-Douglas, 2004; Guillaume *et al*, 2006). Wesson e Ginther (1981b) verificaram um número baixo de ovulações (2 a 3) em pónes de nascimento tardio (Junho e Julho) quando comparados com animais nascidos no início da Primavera.

A duração da ciclicidade ovárica foi inferior a 2 meses e semelhante ao observado por Cebulj-Kadunc *et al*, (2006) em poldras Lipizzan, cujo período de ciclicidade ovárica durou em média $2.37 \pm 0,62$ meses. No entanto, este valor é inferior à média observada em pónes (Wesson e Ginther, 1981b), e em poldras PSI (Nogueira *et al*, 1997; Brown-Douglas *et al*, 2004), Quarter-Horse (Naden *et al.*, 1990b) e Sela-Francês (Guillaume *et al*, 2006). Confirmou-se que, em poldras PSL e nas condições de manejo extensivo, a duração do primeiro período sazonal de ciclicidade ovárica é inferior ao de animais adultos de outras raças (Ginther, 1974) e da mesma raça (Ferreira-Dias *et al*, 2005). Estes resultados estão de acordo com os estudos de Wesson e Ginther (1981b), Cebulj-Kadunc (2006), mas não com os de Guillaume *et al*, (2006), em que a maioria das poldras apresentaram ciclicidade ovárica desde Junho até Outubro.

Há que referir também que todas as poldras PSL do F1 (grupo de um ano de idade) se encontravam em anestro em Junho (figura 4.4), o que é bastante prematuro tendo em consideração que, de todos os estudos supramencionados, as poldras PSL são as que se

encontram em latitudes mais baixas. O mês em que cessou a actividade ovárica coincidiu com a separação dos grupos F1 e M1A (Junho), que poderá ter eliminado qualquer efeito estimulador da presença dos machos. As poldras de um ano foram incluídas num grupo de fêmeas de dois e três anos. A partir de Junho foram feitas colheitas de sangue de poldras de dois anos (F2, n=5). Os valores de progesterona obtidos estão apresentados na figura 4.5.

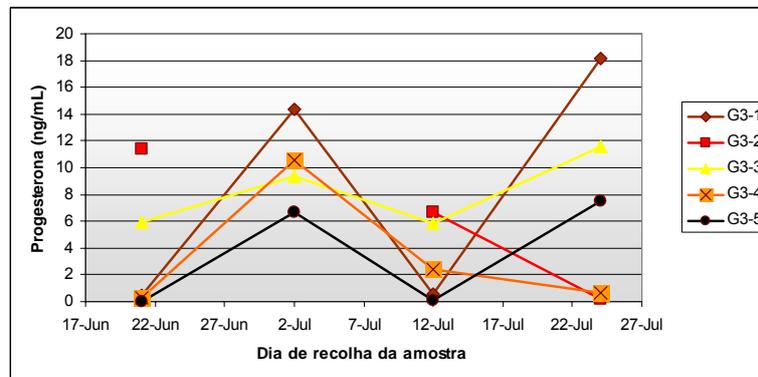


Figura 4.5. Curvas individuais de concentração de progesterona em éguas PSL de dois anos de idade (F2).

Durante o período de amostragem, todos os animais F2 evidenciaram níveis de progesterona >2 ng/mL em duas das amostras. A média da concentração foi de $9,2 \pm 1,2$ ng/mL, mas não existiram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores dos picos de progesterona registados em éguas de 1 ano (F1) e de 2 anos (F2). O facto da totalidade das poldras F2 se encontrarem a ciclar leva a crer que as poldras F1 que não entraram em ciclicidade em 2007 (42,9%) o poderão ter feito na segunda Primavera (ano de 2008), de forma idêntica ao concluído noutras raças (Adams e Bosu, 1988; Brown-Douglas *et al*, 2004; Cebulj-Kadunc *et al*, 2006 e Guillaume *et al*, 2006).

Todas as colheitas efectuadas em poldras F2 foram posteriores ao início do anestro dos animais do F1 e à junção dos dois grupos. Verificou-se que os animais F1 perderam condição corporal a partir de Maio, e que essa perda de condição corporal se intensificou no mês de Julho. Este facto pode ter estado associado com: a) a menor disponibilidade de alimento, uma vez que os recursos da pastagem diminuíram em termos de quantidade e qualidade nesta altura; b) com a competição com os animais mais velhos pelo alimento concentrado. Ou seja, o cessar da actividade ovárica pode não ter ocorrido por acção do fotoperíodo como se verifica geralmente em éguas adultas e poldras em boa condição corporal (Ginther, 1992) mas possivelmente por efeito da nutrição (Adams e Bosu, 1988). Para verificar esta hipótese, foram analisados os níveis de leptina plasmática.

4.1.4. Efeito da nutrição sobre o primeiro período de estro sazonal

No momento em que as poldras F1 evidenciaram ciclicidade ovárica pela primeira vez pesavam em média 308 ± 6.3 kg o que, para o padrão da raça PSL (500 kg) representa 61,6% do PVA. Apesar de ser ligeiramente superior, este valor está em conformidade com os valores obtidos para outras raças ligeiras (Wesson e Ginther, 1981b; Souza *et al.*, 1997; Brown-Douglas *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2004). Não foi encontrada uma relação significativa entre o peso da poldra e a entrada na puberdade ($p > 0,05$). O peso médio das poldras púberes aumentou ao longo do período de ensaio, de forma gradual, como se pode ver pela figura 4.6.

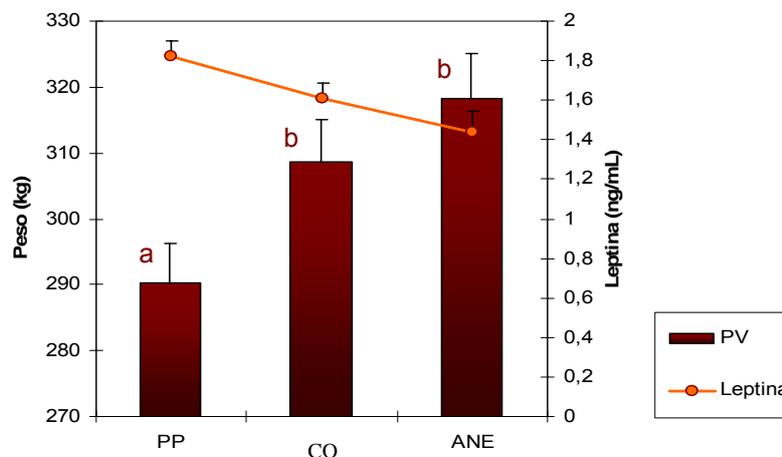


Figura 4.6. Evolução do peso e da concentração plasmática de leptina na fase pré-pubere (PP), na fase de ciclicidade ovárica (CO) e na fase de anestro (ANE) das poldras púberes (n=8).

Entre o período pré-pubere e o período de ciclicidade ovárica, o peso aumentou significativamente ($p < 0,05$) e a diferença foi ainda mais significativa entre o período pré-púbere e o anestro ($p < 0,01$). No entanto, o facto de não se registarem diferenças significativas do peso entre o período de ciclicidade ovárica e o período de anestro ($p > 0,05$), que correspondeu a menos de dois meses, sugere que nesta fase o crescimento sofreu uma desaceleração, ao contrário do que verificaram Nogueira *et al* (1997) em poldras PSI. Talvez isto se deva ao facto da deposição de tecido adiposo ter sido comprometida, visto que se observou uma redução da condição corporal durante e após o período de estro.

A nota de condição corporal (CC) foi obtida apenas por apreciação global, segundo a escala francesa (anexo 2). Entre Maio e Julho, as costelas tornaram-se visíveis e palpáveis, a inserção da cauda sobressaiu ligeiramente da garupa e os processos espinhosos da linha do dorso tornaram-se perceptíveis, pelo que se estimou que na fase de transição da ciclicidade ovárica para o anestro os animais se encontravam numa nota de CC inferior a 3. A duração do período de ciclicidade ovárica está relacionada com o estado de nutrição em éguas adultas (Ferreira-Dias *et al*, 2005; Waller *et al*, 2006). Em poldras, a nutrição afecta a

entrada na puberdade (Adams e Bosu, 1988; Ginther, 1992) e tem uma correlação significativa com a duração do primeiro período de ciclicidade ovárica, como verificaram Guillaume *et al* (2006). Estes autores testaram o efeito que dois níveis de nutrição – nível moderado e nível elevado – surtiram sobre a puberdade em poldras Sela Francês. As poldras do regime de nível moderado apresentaram uma maior duração do período de anestro comparativamente às do regime elevado ($p < 0,05$). Apesar de não terem sido determinadas as concentrações plasmáticas de leptina nestes animais, este resultado está em concordância com o observado por Ferreira-Dias *et al.* (2005), em éguas adultas PSL e que relacionou a condição corporal e a leptina com o prolongamento do período de estro nos meses de Outono e Inverno.

A figura 4.6 ilustra também a curva de leptina das poldras F1 que entraram em actividade cíclica ovárica. A concentração plasmática média de leptina destas poldras foi de $1,61 \pm 0,06$ ng/mL, com um máximo de 2,98 ng/mL apresentando grandes variações individuais ao longo do tempo em que decorreu o estudo. Estes valores coincidem com os de éguas PSL adultas em fase de anestro determinados por Ferreira-Dias *et al.* (2005).

A concentração plasmática de leptina mostrou uma tendência para decrescer entre o período pré-pubere e o período de ciclicidade ovárica, e desceu significativamente entre o período pré-pubere e o anestro ($p < 0,01$). Dentro de cada fase do ciclo éstrico, não existiram diferenças nos níveis de leptina plasmática entre a primeira e segundas fases foliculares ($p > 0,05$), entre as duas fases lúteas ($p > 0,05$), nem entre as fases lútea e folicular ($p > 0,05$) ao contrário do que sugeriu Garcia *et al.*, (2002) para vitelas, mas em concordância com o estudo de Ferreira-Dias *et al.* (2005), em éguas PSL adultas. No entanto, uma vez que os animais do presente estudo se encontravam a perder condição corporal, é difícil avaliar o efeito que a fase do ciclo éstrico possa ter nos níveis de leptina em poldras púberes, como fizeram Garcia e colaboradores (2002) em vitelas. O anestro também foi precedido pela diminuição dos níveis plasmáticos de leptina em éguas PSL adultas no estudo de Ferreira-Dias *et al.* (2005).

A concentração plasmática de leptina também desceu ao longo do ensaio nas poldras que não entraram em ciclicidade ovárica ($p < 0,05$), sugerindo que esta diminuição se deveu a um factor que afectou todo o grupo e não exclusivamente as poldras que entraram na puberdade. Pode ter sido esta a razão pela qual estas poldras não entraram em ciclicidade ovárica. Dado que: a) não existiu influência do peso na entrada ou não na puberdade das poldras PSL e b) o fotoperíodo encontrava-se no máximo na altura em que as poldras entraram em anestro, é possível que as poldras que não ciclaram tenham sofrido inibição da função reprodutiva por acção da quebra dos níveis de leptina sobre o eixo hipotálamo-hipofisário. Assim sendo, teria sido inibida a secreção de GnRH e, consequentemente de LH, cujo pico é essencial para a ocorrência da ovulação em éguas adultas (Ginther, 1992) e em poldras (Wesson e Ginther, 1981b).

4.2 – IDADE DE ENTRADA NA PUBERDADE DE POLDROS PSL

Segundo Naden *et al*, (1990a), o poldro atinge o estado de maturidade sexual quando a testosterona plasmática é $>0,5\text{ng/mL}$. Para efeitos do estudo de entrada na puberdade de poldros PSL determinaram-se as concentrações plasmáticas de testosterona de poldros de um ano (M1). A figura 4.7. ilustra as curvas individuais da concentração de testosterona dos animais em que esta foi detectável.

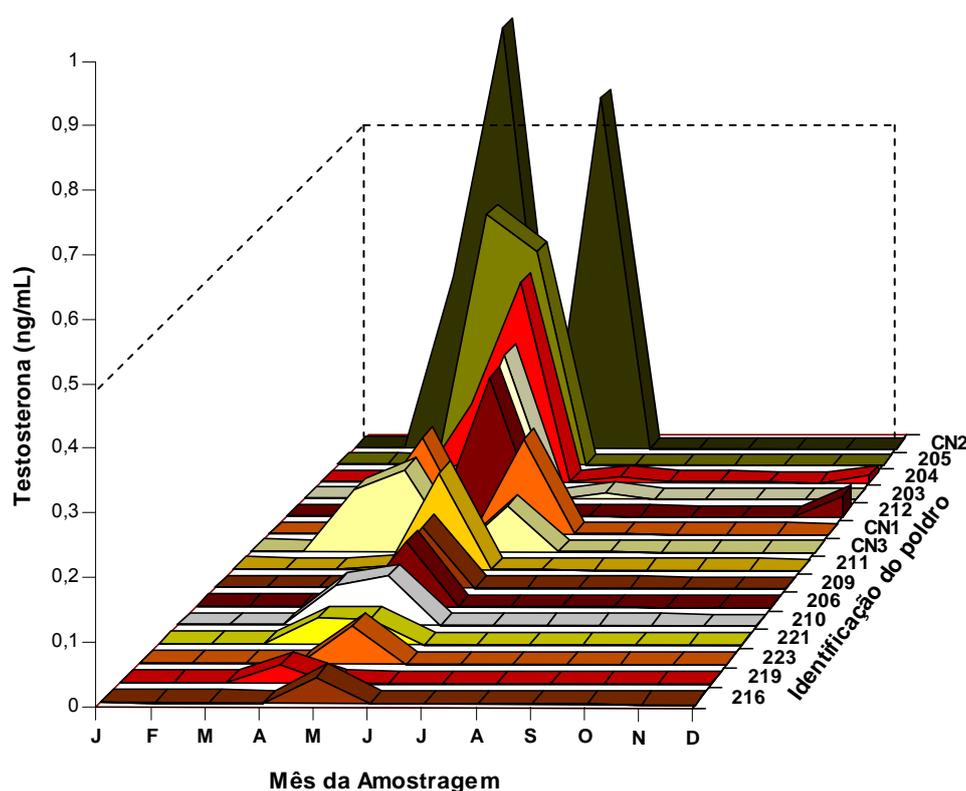


Figura 4.7. Curvas individuais de concentração plasmática de testosterona em poldros PSL, por mês e por poldro.

De Janeiro a Abril e de Julho até Dezembro, não foram encontrados níveis detectáveis de testosterona plasmática nos poldros M1. Entre Abril e Julho, 14 dos 19 poldros M1 (73,7%) registaram concentrações plasmáticas de testosterona. Destes, apenas um (CN2) obteve uma concentração plasmática de testosterona acima do limiar de entrada na puberdade, em Abril e em Junho. Todos os restantes animais no gráfico da figura 4.7 apresentaram valores de concentração plasmática de testosterona consistentes com a fase pré-pubere (Wesson e Ginther, 1980; Naden *et al*, 1990a; Guillaume *et al*, 2006).

Os poldros do grupo M1A já não apresentaram valores detectáveis de testosterona no plasma a partir de Maio. Curiosamente, verificou-se o mesmo padrão nas poldras F1, que entraram em anestro em Junho. No entanto, ao passo que nas poldras se verificou uma diminuição da condição corporal, nos poldros o mesmo não foi tão evidente. Depois da separação, não foram transferidos para outro grupo de animais, logo, não estiveram sujeitos

à competição por alimento com animais de posição hierárquica superior. Resta, portanto, o possível efeito estimulante que as poldras poderiam ter surtido sobre os machos, que se anulou quando os grupos foram separados.

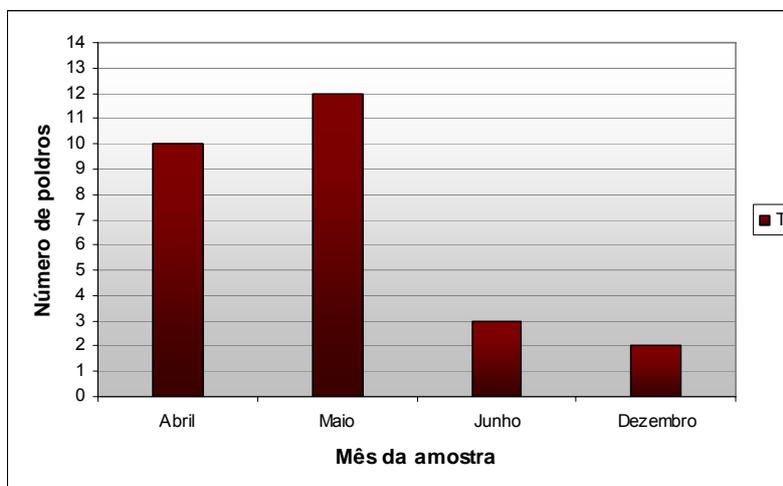


Figura 4.8. Número de poldros PSL que evidenciaram concentrações plasmáticas de testosterona (T) nos meses em que houve detecção de T plasmática.

Nos meses em que houve um maior número de registos não se verificaram diferenças significativas nos níveis médios de testosterona (Abril= $0,11\pm 0,04$; Maio= $0,16\pm 0,04$; $p>0,05$). Os valores médios estiveram dentro dos valores obtidos por Wesson e Ginther, (1980) em pôneis no Verão do primeiro ano de vida (valores de aproximadamente 0,03 a 0,14ng/mL). Estas concentrações plasmáticas corresponderam a um décimo da concentração registada para animais adultos obtida no mesmo trabalho.

Apesar de não existir um efeito sobre a concentração plasmática de testosterona, parece haver uma tendência para que esta fosse detectada num maior número de animais em Abril e Maio. Ou seja, houve um efeito do mês sobre o número de animais com testosterona detectável e verificou-se o mesmo padrão de secreção sazonal que se verifica nos ganhões adultos, nos quais as concentrações de testosterona aumentam durante a época reprodutiva (Johnson e Thompson, 1983; Clay *et al.*, 1988).

Quanto ao único poldro que entrou na puberdade (CN2, pertencente ao grupo M1B) o pico máximo de concentração (0,72ng/mL) verificou-se em Abril, quando o animal tinha 12,3 meses e pesava 349kg, o que corresponde a 69,8% do PVA do PSL. Este foi o maior valor testosterona plasmática registado de todos os 19 animais do sexo masculino no mês de Abril. Este animal era também o mais pesado do grupo M1, o que está de acordo com os resultados de Brown-Douglas e colaboradores (2005), cujos animais com maior PV tiveram maior resposta à GnRH exógena, ou seja, apresentaram um eixo hipotálamo-hipofisário em estado mais avançado de maturação. A média de pesos em Abril foi de $298,6\pm 6,6$ kg no grupo M1A e de $315,7\pm 24,0$ kg no M1B, diferindo significativamente ($p<0,05$). No entanto,

dada a diferença de amostra dos dois grupos (M1A, n=14; M1B, n=3) e o elevado erro padrão associado à média do M1B, não é seguro inferir quanto à existência de um efeito de grupo proveniente das diferenças do manejo para explicar este resultado. Ainda assim, é possível que o CN2 tenha sofrido um efeito estimulante do nível nutricional elevado a que foi sujeito durante os primeiros meses do ano de 2007. Guillaume *et al.* (2006), conseguiram antecipar a puberdade em vários meses em poldros alimentados com um regime de elevado nível nutricional. Nenhum dos outros poldros do grupo M1B apresentou concentrações plasmáticas de testosterona acima da média global mas, por outro lado, nenhum tinha um PV tão elevado como CN2. No entanto, se o critério fosse a obtenção de um determinado PV, muitos dos restantes poldros poderiam ter entrado na puberdade durante o Verão, quando o fotoperíodo ainda é permissivo. Portanto, tudo leva a crer que se tenha tratado de um caso pontual e que foi a programação genética do próprio indivíduo e não os factores externos que determinaram a entrada na puberdade no CN2.

Dos 19 poldros em estudo, os 5 poldros (22,3%) que nunca chegaram a registar um aumento na concentração de testosterona, pertenciam ao M1A. Tendo em consideração a cinética hormonal típica dos diferentes períodos que marcam a maturação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, aparentemente, ainda se encontravam no período infantil. Em virtude do que se verificou para as outras raças, neste período todos os poldros deveriam ter, no mínimo, registado níveis de testosterona típicos do período pré-pubere.

Não é também de descartar a hipótese de que o momento das colheitas tenha correspondido a um mínimo da concentração de testosterona. As amostras foram obtidas no período da manhã, entre as 10 e as 14 horas, no mesmo dia para todos os animais de cada grupo de forma a contornar os padrões circadianos. No entanto, uma vez que apenas foi retirada uma amostra de sangue de cada animal no dia da colheita, e dado o comportamento pulsátil da testosterona, é possível que a amostragem tenha coincidido com um momento em que a concentração de testosterona era reduzida. Ainda assim, esperavam-se níveis basais de testosterona detectáveis se os animais tivessem realmente atingido a puberdade no primeiro ano (Naden *et al.*, 1990a e 1990c).

O facto de a grande maioria dos machos (94,7%) não entrar na puberdade durante a segunda Primavera, quando a maioria das fêmeas entrou (57,1%) está em concordância com a bibliografia (quadros 2.2 e quadro 2.4). No geral, os poldros entram na puberdade mais tarde que as poldras.

4.2.1. Leptina

Ao contrário do que se verificou nas poldras F1, os poldros M1 não apresentaram alterações nos níveis de leptina ao longo do período de estudo ($p > 0,05$). Este facto pode dever-se à melhor condição corporal em que os machos se encontravam, e que se manteve praticamente inalterada ao longo do período de estudo ($CC \approx 3$, anexo 2). Para além disso, os animais M1A não foram incluídos num grupo de animais mais velhos, pelo que não sofreram restrição de acesso ao alimento concentrado que uma mudança na posição hierárquica pudesse ter provocado.

Durante os meses do estudo, a concentração média de leptina foi de $2,0 \pm 0,2$ ng/mL nos animais M1 foi e $1,58 \pm 0,11$ ng/mL nas fêmeas F1. A variação das concentrações de leptina ao longo do período de ensaio para ambos os sexos está ilustrada na figura 4.9.

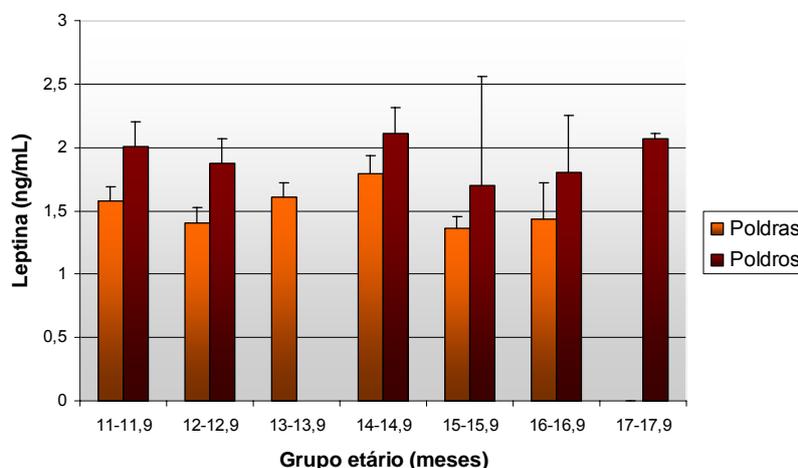


Figura 4.9. Concentração plasmática média de leptina em poldros e poldras PSL, por escalão etário.

A concentração plasmática de leptina foi significativamente mais elevada nos machos (M1) que nas fêmeas (F1) ($p < 0,01$). Este resultado vai de encontro ao apresentado por Buff *et al.* (2002), mas não ficou claro se se deveu à influência do sexo, como referiram Buff e colaboradores, ou da nutrição, uma vez que os machos não sofreram restrição alimentar e/ou consequente redução da condição corporal.

5 - CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A entrada na puberdade é uma fase do desenvolvimento sexual dos animais que ainda não é inteiramente compreendida. Os inúmeros factores envolvidos tornam bastante complexa a problemática da determinação da influência de cada um deles, visto ser extraordinariamente difícil isolá-los e provar o seu efeito individual.

Neste estudo verificou-se que 57,1% das poldras apresentaram picos de progesterona concordantes com a fase lútea na segunda Primavera de vida. Neste ponto, o cavalo PSL não diferiu da maioria das raças ligeiras que foram mencionadas.

Este estudo sugeriu também que é necessário atingir um limiar crítico de concentração plasmática de leptina para que as poldras entrem em puberdade e para que mantenham a ciclicidade ovárica. Apesar da redução dos níveis de leptina poder ter influenciado a entrada em anestro nas poldras PSL, em virtude da redução da sua nota de condição corporal, muitas questões permanecem ainda em aberto, tanto para suportar esta hipótese como para justificar o papel de outras hormonas neste período.

Apenas um poldro PSL entrou na puberdade na segunda Primavera, o que correspondeu a 5,3% dos machos estudados. A concentração plasmática de leptina foi superior nos poldros, embora estes tenham sido menos precoces na entrada na puberdade que as poldras, o que está em concordância com resultados obtidos para outras raças ligeiras.

Os resultados inerentes à determinação da concentração plasmática de testosterona em poldros de dois anos de idade (2008) não foram conclusivos. Serão necessários estudos posteriores, provavelmente com metodologias de determinação mais específicas para avaliar esta fase do desenvolvimento.

Em suma, o conhecimento dos mecanismos fisiológicos que regem a entrada na puberdade no cavalo PSL necessita ainda de ser aprofundado. Como tal, os presentes resultados devem ser encarados como preliminares, sugerindo a necessidade de estudos posteriores nesta área.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G.P., Bosu, W.T.K. (1988) Reproductive physiology of the non-pregnant mare. An overview and update. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 4, 161-176.
- Agricola, R., Barbosa, R., Mateus, M., Silva, J.R. (2004) Effect of season on testicular dimensions and sperm production in Lusitano Stallions. *Proc. International Vet. Congress*. Pp 223.
- Alan, D., ROGOL, M.D., Ph.D., Roemmich, J. N. Ph.D., Clark, P. A. M.D. (2002) Growth at Puberty. *Journal of adolescent health*, 31, 192–200.
- Amann, R.P., Walker, O.A. (1983) Changes in the pituitary gonadal axis associated with puberty in Holstein bulls. *J. Anim Sci.* 57, 433-442.
- Amstalden, M., Garcia, M.R., Williams, S.W., Stanko, R.L., Nizielski, S.E., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Williams, G.L. (2000) Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-growth factor I. *Biol. Reprod.* 63, 127-133.
- Andrade, R.D. (1954) Alredor del caballo Español. Colección de Estúdios, Lisboa, Portugal.
- Anónimo, 1994. *Equinos: Legislação e regulamentos*. IEADR. Ministério da Agricultura.
- Argo, C. McG., Collingsworth, M. G. R., Cox, J. E. (2001) Seasonal changes in reproductive and pelage status during the initial 'quiescent' and first 'active' breeding seasons of the peripubertal pony colt. *Animal Science* 72, 55-64.
- Asa, C.S. (2002) Equid Reproductive Biology. *In* Equids: Zebras, Asses and Horses – Status Survey and Conservation Action. Ed Moehlman, PD. IUCN/SSC Equid Specialis Group. pp 113-117
- Aurich, C., Schlote, S., Hoppen, H.O., Klug, E., Hoppe, H., Aurich, J.E. (1994) Effects of the opioid antagonist naloxone on release of luteinizing hormones in mares during anovulatory season. *Journal of Endocrinology*. 142, 139-144.
- Barb, C.R., Hausman, G.J., Houseknecht, K.L. (2001) Biology of leptin in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*. 21, 297-317.
- Barb, C.R., Kraeling, R.R. (2004) Role of Leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Animal Rep. Sci.* 82, 155-167.
- Barbosa, M., Agrícola, R., Mateus, R., Silva, J.R. (2002) Características morfológicas dos testículos e produção de espermatozóides em cavalos Lusitanos com 6-8 anos de idade. *Proc. Congresso Ciências Veterinárias*. Pp 463.
- Bex, F., Bartke, A., Goldman, B.D., Dalterio, S., (1978) Prolactin, growth hormone, luteinizing hormone receptors, and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster. *Endocrinology* 103, 2069–2080.
- Bjorbaek, C., Kahn, B.B. (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Progress in Hormone Research*. 59, 203-217.
- Blanchard, T.L. Dickson, D.V. Love, C.C. Brinsko, S.P. (2003) Manual of Equine Reproduction, 2nd Edition, Mosby, USA, pp 162.

- Blanchard, T.L., Varner, D.D. (1996) Evaluating breeding soundness in stallions-1: the basic examination. *Vet. Med.* 54-63.
- Brown, B.W. (1994) A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reprod Nutr Dev* 34, 89-114.
- Brown-Douglas, C.G., Firth, E.C., Parkinson, T.J., Fennessy, P.F. (2004) Onset of puberty in pasture-raised Thoroughbreds born in southern hemisphere spring and autumn. *Equine vet. J.* 36,6, 499-504.
- Brown-Douglas, C.G., Firth, E.C., Parkinson, T.J., Fennessy, P.F. (2005) The pituitary and testicular responses to GnRH challenge between 4 and 14 months of age in thoroughbred colts born in spring and autumn. *Animal Reproduction Science*, 88, 287-298.
- Buff, P.R., Dodds, A.C., Morrison, C.D., Whitley, N.C., Mcfadin, E.L., Daniel, J.A., Djiane, J., Keisler, D.H. (2002) Leptin in horses: Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *J. Anim. Sci.* 80, 2942-2948
- Buff, P.R., Morrison, C.D., Ganjam, V.K., Keisler, D.H. (2005) Effects of short-termed feed deprivation and melatonin implants on circadian patterns of leptin in the horse. *J. Anim. Sci.* 83, 1023-1032.
- Caldeira, R.M. (2005) Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 100, 125-139
- Cameron, J.L. (1990) Factors controlling the onset of puberty in primates. *Adolescence and Puberty*, Oxford University Press, New York. Pp 9-28.
- Camillo, F., Vannozi, I., Rota, A., Panzani, D., Illuzy, A., Guillaume, D. (2002) Age at puberty, cyclicity, clinical response to PGF2 α , hGC and GnRH and embryo recovery rate in yearling mares in 8th International Symposium on Equine Reproduction, Colorado USA. *Theriogenology* 6642, Abst; 627.
- Cebulj-Kadunc, N., Cestnik, V. (2005) Circulating Leptin concentrations in Lipizzan horses and Jezersko-solchava sheep. *Slovenian Veterinary Research.* 42, 11-14.
- Cebulj-Kadunc, N., Cestnik, V., Kosec, M. (2006) Onset of puberty and duration of seasonal cyclicity in Lipizzan fillies. *Equine vet. J.* 38, 350-353.
- Chebab, F.F., Mounzih, R., Lim, M.E. (1997) Early onset of puberty in female mice treated with leptin. *Science* (Wash. DC) 275, 88-90.
- Chilliard, Y., Bonnet, M., Delavaud, C., Faulconier, Y., Leroux, C., Djiane, J., Bocquier, F. (2001) Leptin in ruminants. Gene Expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Animal Endocrinology.* 21, 271-295.
- Claus, R., Dimmick, M.A., Gimenez, T., Hudson, L.W. (1992) Estrogens and Prostaglandin F2 α in the semen and blood plasma of stallions. *Theriogenology.* 38,687-693.
- Clay, C.M., Clay, J.N. (1992) Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod, and the peri-pubertal period in stallions. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract;* 8, 31-56.
- Clay, C.M., Squires, E.L., Amann, R.P., Nett, T.M. (1988) Influences of Season and Artificial Photoperiod on stallions: Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone. *J. Anim. Sci.* 66, 1246-1255.

- Clay, C.M., Squires, E.L., Amann, R.P., Nett, T.M. (1989) Influences of Season and Artificial Photoperiod on Stallions: Pituitary and Testicular Responses to Exogenous GnRH. *J. Anim. Sci.* 67, 763-770.
- Clay, C.M., Squires, E.L., Amann, R.P., Pickett, B.W. (1987) Influences of Season and Artificial Photoperiod on Stallions: Testicular Size, Seminal Characteristics and Sexual Behavior. *J. Anim. Sci.* 64, 517-525
- Cole H.H., Hart, G.H., Lyons, W.R., Catchpole, H.R. (1933) The development and hormonal content of fetal horse gonads. *Anat Rec.* 56, 275-293.
- Cordeiro, A. (1997) *Cavalo Lusitano – O filho do vento*. 4ª edição. Edições Inapa, pp:229.
- Cornwell, J.C. (1972) Seasonal variation in stallion semen and puberty in the Quarter Horse colt. *M.S. Thesis*, Louisiana State University.
- Cunningham, M.J., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (1999) Leptin's action on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol. Reprod.* 60, 216-222.
- Daels, P.F., Hughes, J.P. (1993) The normal oestrous cycle *In* Equine Reproduction. A.O. McKinnon e J.L. Voss, Lea e Febiger, Pennsylvania, pp 121-132.
- Davidson, A.P., Stabelfeldt, G.H. (1999) Reprodução e lactação *In* Tratado de Fisiologia Veterinária. 2ª Edição. Ed Cunningham, J.G. Editora Guanabara Koogan, S.A. pp: 351-375
- Davies-Morel, M.C.G., O'Sullivan, J.A.M. (2001) Ovulation rate and distribution in the thoroughbred mare, as determined by ultrasonic scanning: the effect of age. *An. Reprod. Sci.* 66,59-70
- Decourta, C., Tilleta, Y., Carataya, A., Franceschinia, I., Briant, C. (2008) Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus: Interactions with GnRH neuronal system. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 36 (3-4), 131-137
- Donadeu, F.X., Thompson, J.D.L. (2002) Administration of sulpiride to anovulatory mares in winter: effects on prolactin and gonadotropin concentrations, ovarian activity, ovulation and hair shedding. *Theriogenology.* 57: 963–976.
- Donadeu, F.X., Watson, E.D. (2007) Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. *Anim. Reprod. Sci.* 100: 225 – 242.
- Doorembos, J., Pruit, W.O. (1977) Guidelines for predicting Crop Water Requirements. Irrigation and Drainage Paper nº 24, FAO, Rome, Italy.
- Dordari, S., Amini, F., Rezaie, M. (2005) Puberty and sexual behaviour in the Caspian miniature colts in *Proceedings of Measuring Behavior 2005*, 5th International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research. Ed. L.P.J.J. Noldus, F. Grieco, L.W.S. Loijens e P.H. Zimmerman. Wageningen: Noldus Information Technology. Pp: 502
- El-Ghannam, F., El-Sawaf, S. (1976) The influence of age of onset of puberty on the subsequent fertility level of the Arabian mare. *Zentralbl Veterinarmed Association.* 23, 338-341.
- Ellis, R.N.W., Lawrence, T.L.J. (1978) Energy under-nutrition in the weanling filly foal. I. Effects on subsequent live-weight gains and onset of oestrus. *Br Vet J.* 134, 205-211.
- Ferreira-Dias, G., Claudino, F., Carvalho, H., Agrícola, R., Alpoim-Moreira, J., Robalo, J.S. (2005) Seasonal Reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status. *Domest. Anim. Endocrinol* 29, 203-213.

- Fitzgerald, B.P. (1996) Effects of administration of N-methyl-D,L-aspartate (NMA) on gonadotropin secretion in untreated and steroid-treated ovariectomized mares during the breeding season and in intact and ovariectomized mares during anestrus. *Domest. Anim. Endocrinol* 13, 211-218.
- Fitzgerald, B.P. Mellbye, L.B. (1988) Effect of administration of an α_2 -adrenergic agonist, xylazine, on pulsatile gonadotrophin secretion in anoestrous horse mares. *J. Reprod. Fert* 84, 693-700.
- Fitzgerald, B.P., Davison, L.A. (1998) Thyroxine concentrations are elevated in mares which continue to exhibit estrous cycles during the non-breeding season. *Journal of Equine Veterinary Science*. 18, 48-51.
- Fitzgerald, B.P., L'Anson, H., Legan, S.J., Loy, R.G. (1985) Changes in patterns of luteinising hormone secretion before and after the first ovulation in the post-partum mare. *Biol. Reprod* 33, 316-323.
- Fitzgerald, B.P., Mcmanus, C.J. (2000) Photoperiodic versus metabolic signal as determinants of seasonal anestrus in the mare. *Biol. Reprod* 63, 335-340.
- Foster, D., Ryan, K. (1979) Mechanisms governing onset of ovarian cyclicity at puberty in the lamb. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys* 19 (4b), 1369-1380.
- Foster, D.L. (1981) Mechanisms for the delay in first ovulation in lambs born in the wrong season (fall). *Biol. Reprod* 25, 85-92.
- Foster, D.L., Lemons, J.A., Jaffe, R.B., Niswender, G.D. (1975) Sequential patterns of circulating luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in female sheep from early postnatal life through the first estrous cycles. *Endocrinol* 97, 985-994.
- Foster, D.L., Nagatani, S. (1999) Physiological perspectives on Leptin as a Regulator of Reproduction: role in timing puberty. *Biol. Rep.* 60:205-215.
- Fradinho, M.J., Fernandes, R., Gomes, T., Correia, M.J., Vila-Viçosa, M.J.C., Silva, M.F., Ferreira-Dias, G., Caldeira, R.M. (2008b) Padrões de crescimento e desenvolvimento no poldro Puro-Sangue Lusitano. In *Resumos das comunicações do IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Vale de Santarém. Pp: 21.
- Fradinho, M.J.; Fernandes, R.; Gomes, T.; Correia, M.J.; Vila-Viçosa, M.J.C.; Silva, M.F.; Ferreira-Dias, G.; Caldeira, R.M. (2008a) Growth and conformation changes in the young Lusitano horse: evaluation from birth to one year of age in *Nutrition of the exercising horse*, EAAP. 125: 367-370.
- Gamba, M., Pralong, F.P. (2006) Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 254-255, 133-139.
- Garcia, M.R., Amstalden, M., Williams, S.W., Stanko, R.L., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Nizielski, S.E., Williams, G.L. (2002) Serum leptin and its adipose gene expression during prepubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J.Anim. Sci* 80, 2158-2167.
- Gentry, L.R.; Thompson, D.L.; Gentry, G.T.; Davis, K.A.; Godke, R.A. (2002a) *High versus low body condition in mares: Interactions with responses to somatotropin, GnRH analog and dexamethasone*. *J. Anim. Sci.* 80, 3277-3285.
- Gentry, L.R.; Thompson, D.L.; Gentry, G.T.; Davis, K.A.; Godke, R.A.; Cartmill, J.A., (2002b) *The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period*. *J. Anim. Sci.* 80, 2695-2703.

- Ginther, O.J. (1974) Occurrence of anestrus, estrus, diestrus and ovulation over a 12-month period in mares. *Amer. J. Vet. Res.* 35, 1173-1179.
- Ginther, O.J. (1992) *Reproductive Biology of the Mare – Basic and applied aspects*, second edition. Equiservices, Wisconsin.
- Glassneck, H.W. (1978) *Histometrische Untersuchungen über die Entwicklung des Pferdehodens Zwischen 1. Und 18. Lebensmonat*. D.M.V. dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Gomes, L.G.; Gastal M.O.; Gastal E.L. (2002) Follicular activity in fillies during the prepubertal phase: effects of season, body condition and hair coat. *Theriogenology*. Elsevier Science Inc. 58, 615-618.
- Gonzalez-Padilla, E.; Wiltbank, J.N.; Niswender, G.D. (1975). *Puberty in beef heifers I – the interrelationship between pituitary, hypothalamic and ovarian hormones*. *J. Anim. Sci.* 40:1091-1104.
- Greives, T.J., Mason, A.O., Scotti, M.L., Levine, J., Ketterson, E.D., Kriegsfeld, L.J., Demas, G.E. (2007). Environmental Control of Kisspeptin: Implications for Seasonal Reproduction. *Endocrinology* 148 (3), 1158-1166.
- Grill, H.J., Schwartz, M.W., Kaplan, J.M., Foxhall, J.S., Breininger, J., Baskin, D.G. (2002) Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 143, 239-246.
- Guillaume, D., Fleurance, G., Donabedian, M., Robert, C., Arnaud, G., Leveau, M., Chesneau, D., Ottogalli, M., Schneider, J., Martin-Rosset, W. (2006) Effets de deux modes nutritionnels depuis la naissance sur l'âge de l'apparition de la puberté chez le cheval de sport. Les Haras nationaux, 32ème journée de la recherche équine. Pp 105-116.
- Hafez, B., Hafez, E.S.E. (2000a) Horses. *In* Reproduction in Farm Animals, 7th edition. Ed B.Hafez e E.S.E. Hafez. Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, USA. Pp: 193-217.
- Hafez, B., Hafez, E.S.E. (2000b) Anatomy of Female Reproduction *In* Reproduction in Farm Animals, 7th edition. Editado B.Hafez e E.S.E. Hafez. Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, USA.
- Hafez, E.S.E. (2000) Anatomy of male reproduction *In* Reproduction in Farm Animals - 7th edition. Editado B.Hafez e E.S.E. Hafez. Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, USA, pp 3-12.
- Hall, C.M. (2003) Applied physiology: the control of puberty. *Current Paediatrics*. 13, 371—375.
- Han, S., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Herbison, A.E. (2005). Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty. *The Journal of Neuroscience*, 25(49):11349-11356.
- Havel, P. (2002) Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Current Opinions in Lipidology*. 13, 51-59.
- Henneke, D.R., Potter, G.D., Kreider, J.L., Yheates, B.F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine vet. J.* 15, 371–376.
- Henry, B.A., Goding, J.W., Tilbrook, A.J., Dunshea, F.R., Clarke, I.J. (2001). Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinizing hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth-hormone irrespective of bodyweight. *Journal of Endocrinology*. 168, 67-77.

- Hess, R.A., Bunick, D., Lee K., Bahr, J., Taylor, J.A., Korach, K.S., Lubahn, D.B. (1998). A Role for Oestrogens in the Male Reproductive System. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 53(6), 359-360.
- Hoffman, K. 1978. Effects of short-periods on puberty, growth and moult in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J. Reprod. Fertil.* 54, 29-35.
- Hondo, E.; Murabayashi, H.; Hoshiba, H.; Kitamura, N.; Yamanouchi, K.; Nambo, T.; Kurohmaru, M.; Yamada, J. (1998) Morphological studies on testicular development in the horse. *J Reprod Dev.* 44, 377-383.
- Hosoi, T., Kawagishi, T., Okuma, Y., Tanaka, J., Nomura, Y. (2002) Brain stem is a direct target for leptin's action in the central nervous system. *Endocrinology*. 143, 3498-3504.
- Hotzel, M.J., Walkden-Brown, S.W., Fisher, J.S., Martin, G.B. 2003. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: responses to a nutritional stimulus in the breeding and non-breeding seasons. *Reprod. Fertil. Dev.* 15, 1-9.
- Houghton, E., Holtan D.W., Silver, M., Fowden, Al., Ousey, J., Rosedale, Pd. (1991). Plasma progestagens in the mare, fetus and newborn foal. *J Reprod Fertil*, sup. 44, 517-28.
- Houseknecht, K.L.; Baile, C.A.; Matteri, R.L.; Spurlock, M.E. (1998). The biology of leptin: A review. *J. Anim. Sci.* 76, 1405-1420.
- Inoue, J., Cerbito W. A. , Oguri, N., Matsuzawa, T., Sato, K. (1993) Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions. *International Journal of Andrology*. 16 (2), 155-158.
- Inui, A., Asakawa, A., Bowers, C.Y., Mantovani, G., Laviano, A., Meguid, M.M., Fujimiya, M. (2004) Ghrelin, appetite and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *Faseb J.* 18, 439-456.
- Iqbal, J., Pompolo, S., Murakami, T., Grouzmann, E., Sakurai, T., Meister, B. , Clarke, I.J. (2001) Immunohistochemical characterization of localization of long-form leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells in the ovine hypothalamus. *Brain Research*. 920, 55-64.
- Irvine, C.H.G., Alexander, S.L. (1991) Effect of sexual arousal on gonadotrophin releasing hormone, luteinising hormone and follicle stimulating hormone secretion in stallions. *J Reprod Fertil.* 44, 135-143.
- Jannet, F., Thun, R., Niederer, K., Burger, D., Hassig, M. (2003) Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 60, 453-461.
- Johnson, L, Thompson, D.L.Jr. (1983) Age-related seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol. Reproduction* 29, 777-789.
- Johnson, L., Thompson, D.L.Jr. (1987) Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. *Journal Reprod. Fertility* 81, 227-232.
- Kearns, C.F., Mckeever, K.H., Roegner, V., Brady, S.M., Malinowski, K. (2006) Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. *The Veterinary Journal*. 172 , 460–465.
- Keiper, R., Houpt, K. (1984) Reproduction in feral horses: an 8-year study. *Amer. J. Vet. Res.* 45, 991-995.

- Kooistra, L.H., Ginther, O.J. (1975) Effect of photoperiod on reproductive activity and hair in mares. *Amer. J. Vet. Res.* 36, 1413-1419
- Lee, V.K., Cummings, I.A., De-Kretser, D.M., Findlay, J.K., Hudson, B., Keogh, E.J. (1976) Regulation of gonadotropin secretion in rams from birth to sexual maturity I: plasma LH, FSH and testosterone levels. *J Reprod Fertil* 46, 1-6.
- Lemazurier, E., Sourdain, P., Nativelle, C., Plainfosse, B., Séralini, G.E. (2001). Aromatase gene expression in the stallion. *Animal Reproduction Science.* 57,89-98.
- Lemazurier, E., Toquet, M.P., Fortier, G., Séralini, G.E. (2002) Sex steroids in serum of prepubertal male and female horses and correlation with bone characteristics. *Elsevier Science Inc. Steroids;* 67, 361-369.
- Lin, J., Barb, C.R., Matteri, R.L., Kraeling, R.R., Chen, X., Meinersmann, R.J., Rampacek, G.B. (2000) Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary and other tissues in the pig. *Domestic Animal Endocrinology.* 19, 53-61.
- Lincoln, G.A., Mackinnon, P.C.B. (1976) A study of seasonally delayed puberty in the male hare, *Lepus europaeus.* *J Reprod Fertil.* 46, 123-128.
- Love, C.C., Garcia, M.C., Riera, F.R., Kenney, R.M. (1991) Evaluation of measures taken by ultrasonography and calipers to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *J Reprod Fertil.* 44, 99-105.
- Luís, C., Juras, R., Oom, M.M., Cothram, E.G. (2007). Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation. *Animal Genetics,* 38, 20-27.
- Magee, C., Bruemmer, Je, Foradori, C.D., Mccue, P.M., Clay C.M. (2007). Evaluation of kisspeptin in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the mare. *Theriogenology* 68, 492–518.
- Malpaux, B., Thiéry, J.C., Chemineau, P. (1999) Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reproduction and Nutrition Developments;* 39, 355-366.
- Melo, M.I.V., Sereno, J.R.B., Henry, M., Cassali, G.D. (1998) Peripuberal sexual development of pantaneiro stallions. Elsevier Science Inc. *Theriogenology;* 50, 727-327.
- Monteiro, J. (1983) O cavalo Lusitano – Contributo para o seu estudo. Boletim Pecuário. Ano XLIX. Ministério da Agricultura e Pescas. Pp: 205.
- Morel, D.M.C.G. (1999). Equine Artificial Insemination. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U.K.
- Morel, D.M.C.G., (2003), Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. 2nd edition. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U.K.
- Morrison, C.D., Daniel, J.A., Holmberg, B.J., Djiane, J., Raver, N., Gertler, A., Keisler, D.H. (2001) Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology.* 168, 317-324.
- Nachreiner, R.F., Hyland, J.H. (1993) Reproductive endocrine function testing in mares. Equine Reproduction. Edições A.O. McKinnon e J.L. Voss, Lea e Febiger, Pennsylvania. Pp 303-310.
- Naden, J., Amann, R.P., Squires, E.L. (1990a). Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *Journals of Reproduction & Fertility* 88, 167-176.

- Naden, J., Squires, E.L., Nett, T.M. (1990b). Effect of maternal treatment with altrenogest on age at puberty, hormone concentrations, pituitary response to exogenous GnRH, oestrous cycle characteristics and fertility of fillies. *Journals of Reproduction & Fertility* 88, 185-195.
- Naden, J.; Squires, E.L.; Nett, T.M.; Amann, R.P (1990c). Effect of maternal treatment with altrenogest on pituitary response to exogenous GnRH in pubertal stallions. *Journals of Reproduction & Fertility* 88, 177-183.
- Nagy, P., Guillaume, D., Daels, P. (2000) Seasonality in Mares. *Animal Reproductive Science*, 60-61, 245-262.
- Nogueira, G.P., Barnabe, R.C., Verreschi, I.T.N. (1997) Puberty and growth rate in thoroughbred fillies. Elsevier Science Inc. *Theriogenology*, 48, 581-588.
- Odell, W.D. (1990) Sexual maturation in the rat. Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML (eds). *Control of the Onset of Puberty*. Baltimore: Williams-wilkins. Pp: 183-210.
- Palmer, E., Driancourt, M.A. (1982) Photoperiodic stimulation of the mare during winter anoestrous. *J. Reprod. Fert.* 32, 275-282.
- Palmer, E., Driancourt, M.A. (1983) Some interactions on season of foaling, photoperiod and ovarian activity in the equine. *Livestock Production Science*. 10, 197-210.
- Pickett, B.W., Amann, R.P., Squires, E.L., Mckinnon, A.O., Voss, J.L. (1989) Management of the stallion for maximum reproductive efficiency: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory Bulletin. 05, 27-38
- Pickett, B.W. (1993). Factors affecting sperm production and output. *Equine Reproduction*. Edição A.O. McKinnon e J.L. Voss, Lea e Fabiger, Pennsylvania, pp: 689-704.
- Pickett, B. W., Voss, J. L. (1972). Reproductive management of the stallion. *Proceedings 18th Annual Convention A.A.E.P.*, p. 501.
- Prolo, P., Wong, M.L., Licinio, J. (1998) Leptin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 1285-1290
- Revel, Fg., Ansel, L., Klosen, P., Saboureau, M., Pévet, P., Mikkelsen, Jd., Simonneaux, V. (2007). Kisspeptin: A key link to seasonal breeding. *Reviews of Endocrine & Metabolic Disorders*. 8, 57–65.
- Robalo Silva, J., Agrícola, R., Barbosa, M., Lopes Da Costa, L. (2007) Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sêmen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102, 119-125.
- Robalo Silva, J., Barbosa, M., Agrícola, R., Mateus, L. (2003). Effect of season on testicular size and function of Lusitano Stallions. *IV Congresso Ibérico Reprodução Animal*; pp 88.
- Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Stumpft, T.T., Werth, L.A., Cupp, A.S., Kojima, N., Wolfe, P.L., Kittcockm, R.J., Kinder, J.E. (1991) Influence of growth rate and exposure to bulls on age at puberty in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 69: 2092-2098.
- Roser, J.F. (1997) Endocrine basis for testicular function in the stallion. *Theriogenology*, 48, 883-892.
- Roser, J.F. (2008) Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science*. 107, 179-196.

- Rossdale, P.D., Ricketts, S.W. (1980) Equine stud farm medicine, 2nd edition. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Seal, Us; Plotka, Ed (1983) Age-specific pregnancy rates in feral horses. *Journal of Wildlife Management*, 47, 422-429.
- Sharp, D.C., Davies, S.D. (1993) Vernal transition. Equine Reproduction. Edição A.O. McKinnon e J.L. Voss, Lea e Febiger, Pennsylvania, pp: 133-143.
- Sipahutar, H., Sourdain, P., Moslemi, S., Plainfossé, B., Gilles-Eric, S. (2003) Immunolocalization of Aromatase in Stallion Leydig Cells and Seminiferous Tubules. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 51 (3), 311–318.
- Skelton, K.V.; Dowsett, K.F., Mcmeniman, N.P. (1990) Ovarian activity in pubertal fillies treated with anabolic steroids. Abstr. Internatl. Symp. Equine Reproduction. pp.116-117.
- Skiner, J.D.; Bowen, J. (1968) Puberty in the Welsh Stallion. *J Reprod Fertil*. 16, 133-135.
- Smith, Jt., Clarke, Lj. (2007) Kisspeptin expression in the brain: Catalyst for the initiation of puberty. *Reviews of Endocrinology & Metabolic Disorders*. 8, 1–9
- Souza, J.A.T., Gaceck, F., Oliveira, J.V., Augusto, C. (1997) Growth and onset of puberty in female Brazilian Sport Horses. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 21, 117-120
- Spicer, L.J. (2001) Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domestic Animal Endocrinology*. 21, 251-270.
- Styne, D. (1995). The physiology of puberty. Brook, CGD. Clinical Paediatric Endocrinology. Oxford: Blackwell Science, pp 234-252.
- Sullivan, S.D., Meonter, S.M. (2004) γ -Aminobutyric acid neurons integrate and rapidly transmit permissive and inhibitory metabolic cues to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 145, 1194-1202.
- Suttie, J.M., Foster, D.L., Veenvliet, B.A., Manley, T.R., Corson, I.D. (1991) Influence of food intake but independence of body weight on puberty in female sheep. *J Reprod Fertil*. 92, 33-39.
- Swierstra, E.E., Gebauer, M.R., Pickett, M.W. (1974) Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. *Journals of Reproduction & Fertility* 40, pp 113
- Takahashi, M., Funahashi, T., Tanaka, S., Shimomura, I., Miyaoka, K., Matsuzawa, Y. (1996) Plasma leptin levels and body fat distribution. *Hormone Metabolism Research*. 28, 751-752.
- Terasawa, E., Fernandez, D.L. (2001) Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endoc. Rev.* 22, 111-151.
- Thimonier, J. (2000) Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des niveaux de progestérone. *INRA Prod. Anim.* 13 (3), 177-183
- Thompson, D.L., Jr. Pickett, B.W., Squires, E.L., Nett, T.M. (1980) Sexual behaviour, seminal PH and accessory gland weights in gelding administered testosterone and/or estradiol 17 β . *J. Anim. Sci.* 51,1358-1366.
- Thompson, D.L., Pickett, Jr. B.W., Nett, T.M. (1978) Effect of season and artificial photoperiod on levels of estradiol-17 β and estrone in blood serum of stallions. *J. Anim. Sci.* 47:184.

- Thomson, C.H. Thompson, D.L. Jr., Kincaid, L.A., Nadal, M.R. (1996) Prolactin involvement with increase in seminal volume after sexual stimulation in stallions. *J. Anim. Sci.* 74, 2468-2472.
- Tucker, K.E., Henderson, K.A., Duby, R.T. (1991) In vitro steroidogenesis by granulosa cells from equine preovulatory follicles. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44, 45-55.
- Vicente, A.P.A. (2001) *Maneio reprodutivo em equinos de raça lusitana*. Relatório do trabalho de fim de curso em engenharia agrônoma, Instituto Superior de Agronomia, U.T.L., pp 13-48.
- Waller, C.A., Donald, L., Thompson, Jr., Cartmill, J.A., William, A.S., Nan, K.H. (2006) Reproduction in high body condition mares with high versus low leptin concentrations. *Theriogenology*; 66, 923-928.
- Weber, J.A., Geary, R.T., Woods, G.L. (1990) Changes in accessory sex glands of stallions after sexual preparation and ejaculation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186(7), 267-273.
- Wesson J.A., Ginther, O.J. (1982) Influence of photoperiod on puberty in the female pony. *J Reprod Fertil Suppl.* 32, 269-274.
- Wesson, J.A., Ginther, O.J. (1979) Plasma gonadotropin levels in intact and ovariectomized prepubertal ponies. *Biol. Reprod.* 20, 1099-1104.
- Wesson, J.A., Ginther, O.J. (1980) Plasma gonadotropin concentrations in intact female and intact and castrated male prepubertal ponies. *Biol. Reprod.* 22, 541-549
- Wesson, J.A., Ginther, O.J. (1981a) Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of a slaughterhouse survey. *J. Anim. Sci.* 51, 119-129.
- Wesson, J.A., Ginther, O.J. (1981b) Puberty in the Female Pony: Reproductive behavior, ovulation, and plasma gonadotrophin concentrations. *Biol. Reprod.* 24, 977-986.
- Wesson, J.A.; Miller, K.F.; Ginther, O.J. (1980). *Response of plasma LH and FSH to gonadotropin-releasing hormone in pony-foals and ovariectomized pony-mares*. *Theriogenology*. 14, 113-121.
- Wesson, J.A.; Quay, W.B.; Ginther, O.J. (1979) Seasonal relationship between pineal hydroxyindole-O-methyl-transferase (HIOMT) activity and reproductive status in the pony. *Gen. Comp. Endocrinol.* 38, 181-191.
- Williams, G.L.; Amstalden, M.; Garcia, M.R.; Stanko, R.L.; Nizielski, S.E.; Morrison, C.D.; Keisler, D.H. (2002) Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 23, 339-349.
- Yang, W.S., Lee, W.J., Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C.L., Chen, C.L., Tai, T.Y., Chuang, L.M. 2001. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 3815-3819.
- Zeinonaldini, S., Swarts, J.J.M., Van de Heijning, B.J.M. (2006). Chronic leptin infusion advances, and immunoneutralization of leptin postpones puberty onset in normally fed and feed restricted female rats. *Peptides*. 27: 1652-2658.15
- Zhang, Y., Proença, R., Maffel, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372, 425-432.
- Zieba, D.A., Amstalden, M., WILLIAMS, G.L. (2005). Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domestic Animal Endocrinology*. 29: 166-185.

ANEXOS

ANEXO 1

1 - Padrão da Raça Lusitana

Modelo ideal com 100 pontos

1 - TIPO: eumétrico (peso cerca dos 500 Kgr); mediolíneo; subconvexilíneo (de formas arredondadas) de silhueta inscristível num quadrado.

2 - ALTURA média ao garrote, medida com hipómetro aos 6 anos:

- fêmeas 1,55 m

- machos 1,60 m

3 - PELAGEM - As mais frequentes são a ruça e a castanha em todos os seus matizes.

4 - TEMPERAMENTO - Nobre, generoso e ardente, mas sempre dócil e sofredor.

5 - ANDAMENTOS - Ágeis e elevados projectando-se para diante, suaves e de grande comodidade para o cavaleiro.

6 - APTIDÃO - Tendência natural para a concentração, com grande predisposição para exercícios de Alta Escola e grande coragem e entusiasmo nos exercícios da gineta (combate, caça, toureio, manejo de gado, etc).

7 - CABEÇA - Bem proporcionada, de comprimento médio, delgada e seca, de ramo mandibular pouco desenvolvido e faces relativamente compridas, de perfil levemente subconvexo, fronte levemente abaulada (sobressaindo entre as arcadas supraciliares), olhos sobre o elíptico, grandes e vivos, expressivos e confiantes.

As orelhas são de comprimento médio, finas, delgadas e expressivas.

8 - PESCOÇO - De comprimento médio, rodado, de crineira delgada, de ligação estreita à cabeça, largo na base, e bem inserido nas espáduas, saindo do garrote sem depressão acentuada.

9 - GARROTE - Bem destacado e extenso, numa transição suave entre o dorso e o pescoço, sempre levemente mais elevado que a garupa. Nos machos inteiros fica afogado em gordura, mas destaca-se sempre bem das espáduas.

10 - PEITORAL - De amplitude média, profundo e musculoso.

11 - COSTADO - Bem desenvolvido, extenso e profundo, com costelas levemente arqueadas, inseridas obliquamente na coluna vertebral, proporcionando um flanco curto e cheio.

12 - ESPÁDUAS - Compridas, oblíquas e bem curvadas.

13 - DORSO - Bem dirigido, tendendo para o horizontal, servindo de traço de união suave entre o garrote e o rim.

14 - RIM - Curto, largo, musculoso, levemente corcovo, bem ligado ao dorso e à garupa com a qual forma uma linha contínua e perfeitamente harmónica.

15 - GARUPA - Forte e arredondada, bem proporcionada, ligeiramente oblíqua, de comprimento e largura de dimensões idênticas, de perfil convexo, harmónico e pontas das ancas pouco evidentes conferindo à garupa uma secção transversal elíptica. Cauda saindo no seguimento da curvatura da garupa de crinas sedosas, longas e abundantes.

16 - MEMBROS - Braço bem musculado, harmónicamente inclinado.

Antebraço bem apumado e musculado.

Joelho seco e largo.

Canelas sobre o comprimento, secas e com os tendões bem destacados.

Bolêtos secos relativamente volumosos e quase machinhos.

Quartelas relativamente compridas e oblíquas.

Cascos de boa constituição, bem conformados e proporcionados, de talões não muito abertos e com o casco pouco evidente.

Nádega curta e convexa.

Coxa musculosa, sobre o comprimento, dirigida de modo que a rótula se situe na vertical da ponta da anca. Perna sobre o comprimento, colocando a ponta do canelão na vertical da ponta da nádega.

Curvilhão largo, forte e seco.

Os membros posteriores apresentam ângulos relativamente fechados.

ANEXO 2

Zona de apreciação

Nota	Manual				Visual		
	Pescoço	Garrote	Zona transição entre a espádua e o costado	Costado	Inserção da cauda	Linha do dorso	Garupa
0	Bordo superior do pescoço emaciado; estrutura óssea bastante perceptível; Músculos secos	Bastante saliente; pele seca e colada aos processos espinhosos	Zona com forte depressão; espádua saliente e muito seca; costelas bem visíveis	Depressão entre as costelas muito pronunciada; a ligação entre as costelas e os processos transversos é visível; pele seca e colada às costelas	As vértebras da base da cauda são bem visíveis; ligamento sacro-tuberal bem destacado	Linha do dorso bem visível; corpos das vértebras individualizados	Emaciada; aspecto pontiagudo; extremidades das ancas e das nádegas bastante visíveis
1	Bordo superior ainda emaciado, mas a estrutura óssea apenas é levemente perceptível;	Garrote saliente; bordo superior da espádua visível	Zona esvaziada deixando aparecer nitidamente o relevo da espádua	Costelas e processos transversos ainda visíveis; pele colada; não há deposição de gordura	Cauda sobressai da garupa inscrita num vazio acentuado de cada lado da sua base; vértebras e ligamento sacro-tuberal visíveis	Linha do dorso acentuada; processos espinhosos bem marcados	Contornos côncavos; extremidades das ancas e das nádegas bem visíveis
2	Acumulação de tecido adiposo no bordo superior já é visível; desenha-se um ligeiro sulco ao longo da base	Garrote marcado e seco; as faces laterais são planas	Zona ligeiramente côncava; o relevo da espádua está bem desenhado; palpa-se um ligeiro depósito adiposo	As costelas adivinham-se sob a pele de forma suave; há um ligeiro depósito adiposo	A inserção da cauda sobressai da garupa; detecta-se um ligeiro depósito adiposo em torno da sua base	Linha do dorso marcada; processos pouco cobertos mas ainda individualizáveis	As extremidades das ancas e das nádegas distinguem-se bem
3	Bordo superior do pescoço ligeiramente abaulado e bem desenhado; linha ou sulco na base do pescoço quase inexistente	Garrote sobressai ligeiramente	Zona plana e a espádua identifica-se; Palpa-se um depósito adiposo bem delimitado que desliza sob a mão	Costado uniforme; as costelas não são visíveis e apenas se detectam através de palpação; uma camada de tecido adiposo reveste a linha dos processos transversos	Cauda relativamente destacada, apesar do depósito adiposo que envolve a sua base; este depósito adiposo é firme	Linha do dorso aparente; processos não individualizáveis, cobertos por um ligeiro depósito adiposo	Aspecto geral ligeiramente arredondado; adivinham-se as extremidades das ancas e das nádegas
4	Início da acumulação de gordura no bordo superior do pescoço; este apresenta-se abaulado, relativamente espesso, firme e sem sulco na base; palpável com a mão	Garrote incluso	Zona ligeiramente convexa; Palpa-se um depósito adiposo espesso e mole	Depósito adiposo ao nível das costelas bem marcado e que desliza sob a mão; zona do costado arredondada; as costelas não se conseguem palpar; palpa-se acumulações heterogéneas de gordura	Inserção da cauda pouco destacada da garupa; o depósito adiposo que a envolve é espesso e mole	Linha do dorso inclusa; processos cobertos com um depósito adiposo formando uma “barra” horizontal	Bastante arredondada e uniforme; extremidades das ancas e das nádegas inclusas e dificilmente localizáveis
5	Bordo superior do pescoço bastante abaulado e incluso na massa muscular; acumulação de gordura ao longo do pescoço que se palpa com a mão bem aberta; tendência à formação de “gato”	Garrote incluso numa massa gorda abaulada nas duas faces laterais	Zona claramente abaulada; espádua inclusa; palpa-se uma massa gorda considerável que treme à palpação	Zona do costado abaulada; as costelas estão cobertas de uma espessa camada que desliza sob a mão; acumulações de gordura heterogéneas e visíveis em contraluz	Inserção da cauda massiva e inclusa numa “almofada” de tecido gordo de consistência esponjosa	Linha do dorso inclusa; processos imersos na gordura que cobre as costelas	Muito redonda; pode aparecer um sulco médio entre duas massas simétricas “garupa dupla”

ANEXO 3

COAT-A-COUNT®

Progesterone

SIEMENS

Siemens Medical Solutions Diagnostics

Progesterone Calibrators (PGC3–9)

Seven vials of progesterone calibrators, ready to use, in processed human serum, with preservative. The zero calibrator vial A contains 4 mL; the remaining vials B through G contain 2 mL each. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or until the expiration date marked on the label.

TKPG1: 1 set. **TKPG2:** 1 set

TKPG5: 2 sets. **TKPGX:** 3 sets.

The calibrators represent, respectively, 0, 0.1, 0.5, 2, 10, 20 and 40 nanograms of progesterone per milliliter (ng/mL); equivalently: 0, 0.3, 1.6, 6.4, 31.8, 63.6 and 127.2 nanomoles per liter (nmol/L).

Materials Required But Not Provided

Gamma counter – compatible with standard 12x75 mm tubes

Vortex mixer

Radioimmunoassay

Plain 12x75 mm polypropylene tubes — for use as NSB tubes, available from Siemens Medical Solutions Diagnostics.

Micropipets: 100 µL and 1,000 µL.

Waterbath — capable of maintaining 37°C — required only for the Alternate Procedure. Neither an oven nor a heat block is suitable.

Foam decanting rack – available from Siemens Medical Solutions Diagnostics.

Logit-log graph paper – available from Siemens Medical Solutions Diagnostics (catalog number: ZP797)

A tri-level, human serum-based immunoassay control, containing progesterone as one of over 25 assayed constituents, is available from Siemens Medical Solutions Diagnostics (catalog number: CON6).

Specimen Collection

The patient need not be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture²³ into plain, heparinized or EDTA tubes and separate the serum or plasma from the cells.* The time of collection should be noted.

Lipemia may interfere with the assay. The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Samples contaminated from the administration of radioactivity to the patient are unsuitable for use.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. Coat-A-Count Progesterone has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 100 µL of serum or plasma per tube.

Storage: 2–8°C for 7 days,²⁴ or for up to 3 months frozen at –20°C.²⁴

Before assay, allow the samples to come to room temperature (15–28°C) and mix by *gentle* swirling or inversion. Aliquot, if necessary, to avoid repeated thawing and freezing. Do *not* attempt to thaw frozen specimens by heating them in a waterbath.

* Time-dependent decreases in progesterone levels have been reported when serum samples are collected and stored in Gel Barrier Tubes.^{20, 21, 22}

Basic Radioimmunoassay Procedure

All components must be at room temperature (15–28°C) before use.

- 1 Plain Tubes:** Label four plain (uncoated) 12x75 mm polypropylene tubes T (total counts) and NSB (nonspecific binding) in duplicate.

Because nonspecific binding in the Coat-A-Count procedure is characteristically low, the NSB tubes may be safely omitted without compromising accuracy or quality control.

Coated Tubes: Label fourteen Progesterone Ab-Coated Tubes A (maximum binding) and B through G in duplicate. Label additional antibody-coated tubes, also in duplicate, for controls and patient samples.

Calibrators	ng/mL	nmol/L
A (MB)	0	0
B	0.1	0.3
C	0.5	1.6
D	2	6.4
E	10	31.8
F	20	63.6
G	40	127.2

- Pipet **100 µL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, and **100 µL** of each of the calibrators B through G into correspondingly labeled tubes. Pipet **100 µL** of each control and patient sample into the tubes prepared.

Because progesterone has a tendency to adsorb to plastic, and even more so to glass, it is important to coat the pipet tip by rinsing a few times in the sample before making the transfer. It is good practice to use a disposable-tip micropipet, changing the tip between samples, in order to avoid carryover contamination.

Patient samples expected to contain progesterone concentrations greater than the highest calibrator (40 ng/mL) should be diluted in the zero calibrator before assay.

- Add **1.0 mL** of ¹²⁵I Progesterone (CLEAR) to every tube. Vortex.

No more than 10 minutes should elapse during the dispensing of the tracer. Laboratories equipped with a reliable pipettor-diluter may handle steps 2 and 3 simultaneously, but care should be taken to avoid carryover from sample to sample. Set the T tubes aside for counting (at step 6); they require no further processing.

- Incubate for **3 hours** at room temperature (15–28°C).

- Decant thoroughly.

Removing all visible moisture will greatly enhance precision. Using a foam decanting rack, decant or aspirate the contents of all tubes (except the T tubes) and allow them to drain for 2 or 3 minutes. Then strike

the tubes sharply on absorbant paper to shake off all residual droplets.

- Count for **1 minute** in a gamma counter.

Alternate Procedure

A 1-hour incubation at 37°C may be employed in contexts where rapid turnaround is essential and where low-end precision is not critical. The procedure is identical to the Basic Procedure detailed above, except for the altered incubation at step 4:

- Incubate for 1 hour at 37°C.

Use a waterbath; neither an oven nor a heat block is suitable.

Calculation of Results

To obtain results in terms of concentration from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the average NSB-corrected counts per minute:

$$\text{Net Counts} = (\text{Average CPM}) \text{ minus } (\text{Average NSB CPM})$$

Then determine the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB), with the NSB-corrected counts of the A tubes taken as 100%:

$$\text{Percent Bound} = (\text{Net Counts} / \text{Net MB Counts}) \times 100$$

(The calculation can be simplified by omitting the correction for nonspecific binding; samples within range of the calibrators yield virtually the same results when Percent Bound is calculated directly from Average CPM.)

Using logit-log graph paper, plot Percent Bound on the vertical (probability) axis against Concentration on the horizontal (logarithmic) axis for each of the nonzero calibrators, and draw a straight line approximating the path of these points. Results for the unknowns may then be read from the line by interpolation.

It is good practice to inspect results for agreement within replicates, and to construct a graph of the calibration curve (even if the calculations are handled by computer) as a visual check on the appropriateness of the transformation used and as a way to detect deviant

calibration points. We also recommend keeping track of these data reduction parameters:

T = Total Counts (as counts per minute)

%NSB = $100 \times (\text{Average NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB = $100 \times (\text{Net Counts} / \text{Total Counts})$

And the 20, 50 and 80 percent "intercepts," where

20% = Concentration at 20 Percent Bound, etc.

Note that other approaches, e.g. a sound implementation of the 4-parameter logistic, are also acceptable. See Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Example Run: Basic Procedure / Alternate Procedure

For illustration only, not for calculating results from another run. (See "Basic Procedure" and "Alternate Procedure" tables.)

Quality Control

Controls (or serum pools) with at least two progesterone concentration levels — low and high — should routinely be assayed as unknowns.

Report patient results only if the control results for that assay meet your laboratory's established criteria for acceptability.

It is good laboratory practice to record for each assay the lot numbers of the components used, as well as the dates when they were first reconstituted or opened. We also recommend charting control results from day to day — as described, for example, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note that repeat samples can serve as a valuable additional tool for monitoring interassay precision, and that pairs of control tubes can be spaced throughout the assay to help verify the absence of significant drift.

Expected Values: Serum

Reference range studies were performed using the Coat-A-Count Progesterone kit. The populations were screened to exclude women with fertility problems. The results are displayed below in ng/mL and nmol/L.

(Note that the *mid*-luteal samples constitute a subset of the luteal phase group.)

Reference Group	Median ng/mL	Absolute Range ng/mL	Central 95% Range ng/mL	<i>n</i>
Males	0.58		0.10–1.2	100
Females:				
Follicular Phase	0.41		0.15–1.4	95
Luteal Phase	6.8		1.6–21	85
Mid-Luteal Phase	13	5.2–23		32
Post Menopausal	0.27	0.11–0.90		20
Oral Contraceptives	0.34	0.18–0.64		60
Pregnant Females:				
First Trimester	21	7.4–71		20
Second Trimester	46	18–106		20
Third Trimester	77	41–110		20

Reference Group	Median nmol/L	Absolute Range nmol/L	Central 95% Range nmol/L	<i>n</i>
Males	1.8		0.32–3.8	100
Females:				
Follicular Phase	1.3		0.48–4.5	95
Luteal Phase	22		5.1–67	85
Mid-Luteal Phase	41	17–73		32
Post Menopausal	0.86	0.35–2.9		20
Oral Contraceptives	1.1	0.57–2.0		60
Pregnant Females:				
First Trimester	67	24–226		20
Second Trimester	146	57–337		20
Third Trimester	245	130–350		20

Menstrual Cycle: The reference range for a woman of childbearing age (not on contraceptives) is a function of her location in the menstrual cycle.

Accordingly, fifteen normally ovulating women were followed throughout one cycle using radioimmunoassay kits for FSH, LH and progesterone. The women were in good health and had normal FSH and LH profiles. Samples were collected on days 0, 10, 13, 14, 15, 17, 20, 22, 24 and 28, counting from the last menstrual period. Normalization to the LH peak was achieved by designating for each woman the occasion of her highest LH result as day zero. The progesterone profiles so normalized were then plotted: the graph

ANEXO 4

COAT-A-COUNT®

Total Testosterone

SIEMENS

Siemens Medical Solutions Diagnostics

- 3 Add **200 µL** of concentrated HCl (12N, not supplied) to every tube. Loosely cap and incubate in a *boiling* water bath for **15 minutes**.
- 4 Dilute each hydrolyzed sample 1-in-25 with the zero calibrator: for example, add **10 µL** of hydrolyzed sample to **240 µL** of zero calibrator.

Do not use water to dilute the hydrolyzates; the zero calibrator must be used.

Proceed with the radioimmunoassay procedure, as described below in the Radioimmunoassay Procedure section. If not assayed immediately, the hydrolyzates should be stored tightly capped at -20°C for no more than 7 days. Volumes may be scaled up, if desired, providing the proportions specified in the hydrolysis procedure remain unchanged.

Radioimmunoassay Procedure

A single calibration curve provides the basis for determining testosterone concentrations in serum (or heparinized plasma) and in urine. Accordingly, both urinary hydrolyzates and untreated serum samples may be processed in the same assay. The calibrators are ready to use; only urine samples must be subjected to hydrolysis, as described in the Sample Preparation: Urine Hydrolysis section. All components must be at room temperature ($15\text{--}28^{\circ}\text{C}$) before use.

- 1 **Plain Tubes:** Label four plain (uncoated) 12x75 mm polypropylene tubes T (total counts) and NSB (nonspecific binding) in duplicate.

Because nonspecific binding in the Coat-A-Count procedure is characteristically low, the NSB tubes may be safely omitted without compromising accuracy or quality control.

Coated Tubes: Label twelve Total Testosterone Ab-Coated Tubes A (maximum binding) and B through F in duplicate. Label additional antibody-coated tubes, also in duplicate, for controls and patient samples.

Calibrators	ng/dL	nmol/L
A (MB)	0	0
B	20	0.7
C	100	3.5
D	400	14
E	800	28
F	1,600	55

- 2 Pipet **50 µL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, and **50 µL** of each remaining calibrator, control and patient sample (serum or heparinized plasma) into the tubes prepared. Pipet **50 µL** of each urinary *hydrolyzate* into appropriately labeled tubes. **Pipet directly to the bottom.**

Patient samples expected to contain testosterone concentrations greater than the highest calibrator (1,600 ng/dL) should be diluted in the zero calibrator.

- 3 Add **1.0 mL** of ^{125}I Total Testosterone to every tube. Vortex.

Laboratories equipped with a reliable pipettor-diluter may handle steps 2 and 3 simultaneously, but care should be taken to avoid carryover from sample to sample. No more than 10 minutes should elapse during the dispensing of the tracer. Set the T tubes aside for counting (at step 6); they require no further processing.

- 4 Incubate for **3 hours at 37°C** .
- 5 Decant thoroughly.

Removing all visible moisture will greatly enhance precision. Using a foam decanting rack, decant or aspirate the contents of all tubes (except the T tubes) and allow them to drain for 2 or 3 minutes. Then strike the tubes sharply on absorbant paper to shake off all residual droplets.

- 6 Count for **1 minute** in a gamma counter.

Calculation and Quality Control

To calculate total testosterone concentrations from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the

Example Run: For illustration only, not for calculating results from another run. (See "Example Run" table.)

Expected Values

In a reference range study, 87 male serum samples and 81 female serum samples were assayed by the Coat-A-Count Total Testosterone procedure, with the following results in ng/dL.

	n	Median (ng/dL)	Central 95% Range	Absolute Range
Females				
Ovulating	41	24	ND–80	ND–81
Oral contraceptives	13	15	—	ND–28
Post-menopausal	27	20	4.0–62	4.0–74
Males				
20–49 yrs	68	630	262–1,593	245–1,836
> 50 years	19	427	181–758	181–772

ND: not detectable

Comparison of the Coat-A-Count 50 µL Total Testosterone procedure with its predecessor suggests the following urinary testosterone reference ranges: 25 to 125 µg/day (with a median of approximately 75 µg/day) for adult males, and 5 to 35 µg/day (with a median of approximately 15 µg/day) for adult females.

Laboratories should consider these results as *guidelines only*. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the Coat-A-Count Total Testosterone kit's performance. Total testosterone results in the sections below are expressed as ng/dL. Unless otherwise specified, the results in the following sections have been generated on serum samples.

Conversion Factor:

ng/dL × 0.03467 → nmol/L

Reportable Range: 4 – 1,600 ng/dL.

Calibration Range: 20 – 1,600 ng/dL (0.7 – 55 nmol/L).

Analytical Sensitivity: 4 ng/dL (0.14 nmol/L).

Intraassay Precision (Within-Run): A precision-dose profile is displayed, based on 17 to 21 degrees of freedom per point and depicting the CVs to be expected for samples assayed in duplicate. (See "Precision Profile" graph.)

Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated for each of seven samples from the results of pairs of tubes in 20 different assays. (See "Interassay Precision" table.)

Specificity: The Coat-A-Count Total Testosterone antiserum is highly specific for testosterone. Percent crossreactivity was calculated on a weight-per-weight basis at approximately 50% binding. (See "Specificity" table for representative data.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table for representative data.)

End-of-Run Effect: None up to approximately 300 tubes. (See "End-of-Run Effect" table.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three Testosterone solutions (5,000, 10,000 and 20,000 ng/dL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Bilirubin: Presence of bilirubin in concentrations up to 200 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

Hemolysis: Presence of packed red blood cells in concentrations up to 30 µL/mL has no effect on results, within the precision of the assay.

Lipemia: The high calibrator (1,600 ng/dL) was serially diluted with a lipemic serum pool. This causes the degree of lipemia to increase as the testosterone concentration (due primarily to the contribution of the calibrator) decreases. These dilutions were assayed along with the unspiked lipemic pool. The results show that even severe lipemia has no clinically significant effect on the assay.

Alternate Sample Type: To determine whether anticoagulants interfere with the assay, blood was collected from 23 volunteers into plain, heparinized and EDTA vacutainer tubes. All samples were assayed by the Coat-A-Count Total Testosterone procedure. By linear regression.

ANEXO 5

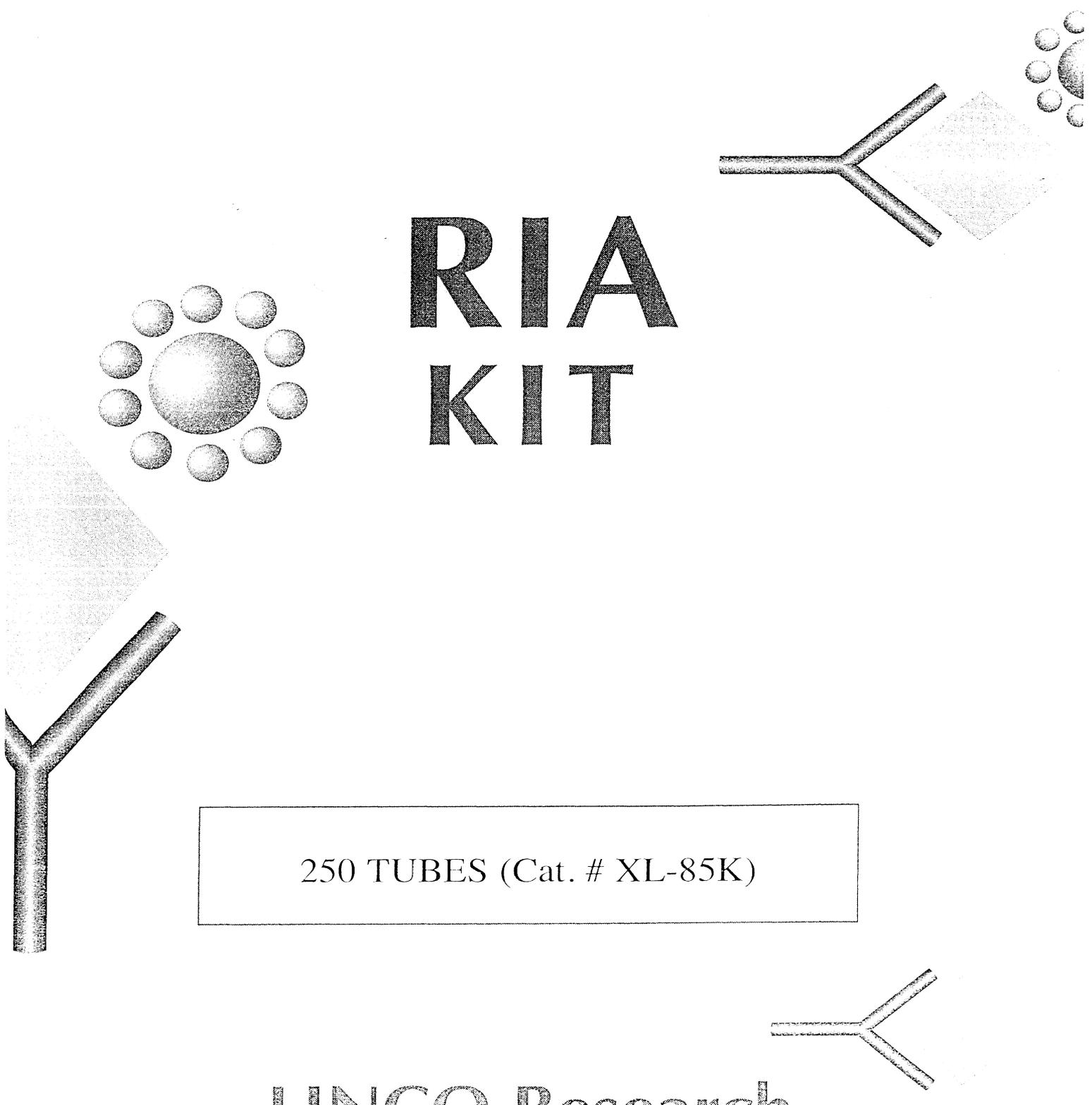


MULTI-SPECIES LEPTIN RIA KIT

**RIA
KIT**

250 TUBES (Cat. # XL-85K)

LINCO Research



VIII. ASSAY PROCEDURE

For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

A. Assay Set-Up, Day One

1. Pipet 300 μ l of Assay Buffer to the Non-Specific Binding (NSB) tubes (3-4), 200 μ l to the Reference (B_0) tubes (5-6), and 100 μ l to tubes 7 through the end of the assay.
2. Pipet 100 μ l of Standards and Quality Controls in duplicate (see Assay Procedure Flow Chart).
3. Pipet 100 μ l of each sample in duplicate. (NOTE: Smaller volumes of sample may be used when leptin concentrations are anticipated to be elevated or when sample size is limited. Additional Assay Buffer must be added to compensate for the difference so the volume is equivalent to 100 μ l, e.g., when using 50 μ l sample, add 50 μ l Assay Buffer.)
4. Pipet 100 μ l of Multi Species Leptin antibody to all tubes except Total Count tubes (1-2) and NSB tubes (3-4).
5. Vortex, cover, and incubate overnight (20-24 hours) at 4°C.

B. Day Two

6. Pipet 100 μ l of 125 I-Human Leptin to all tubes.
7. Vortex, cover, and incubate overnight (20-24 hours) at 4°C.

VIII. ASSAY PROCEDURE (continued)

C. Day Three

8. Add 1.0 ml of cold (4°C) Precipitating Reagent to all tubes except Total Count tubes (1-2).
9. Vortex and incubate 20 minutes at 4°C.
10. Centrifuge, 4°C, all tubes [except Total Count tubes (1-2)] for 20 minutes at 2,000-3,000 xg. NOTE: If less than 2,000 xg is used or if slipped pellets have been observed in previous runs, the time of centrifugation must be increased to obtain a firmer, more stable pellet (e.g., 40 minutes). A swing-bucket rotor is recommended. Conversion of rpm to xg:
$$\text{xg} = (1.11 \times 10^{-5}) (r) (\text{rpm})^2$$

r = radial distance in cm (from axis of rotation to the bottom of the tube)
rpm = rotational velocity of the rotor
11. Immediately decant the supernate from all tubes except Total Count tubes (1-2), drain tubes for 15-60 seconds (be consistent between racks), and blot excess liquid from lip of tubes. NOTE: Invert tubes only one time. Pellets are fragile and slipping may occur.
12. Count all tubes in a gamma counter for 1 minute. Calculate the ng/ml HE of leptin in unknown samples using automated data reduction procedures (see the following "Calculations" section).