

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Faculdade de Veterinária

Curso de Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes

**PERFIS SOROLÓGICOS DE PAG (PREGNANCY-
ASSOCIATED GLYCOPROTEIN) E PROGESTERONA
DURANTE A GESTAÇÃO E PERÍODO PÓS-PARTO
EM CABRAS MOXOTÓ E CANINDÉ**

Noelita Melo de Sousa

Fortaleza-CE

1997

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Faculdade de Veterinária

Curso de Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes

Perfis sorológicos de PAG (Pregnancy-Associated Glycoprotein) e progesterona durante a gestação e período pós-parto em cabras Moxotó e Canindé

Noelita Melo de Sousa

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: José Ricardo de Figueiredo.

Fortaleza-CE

1997

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Faculdade de Veterinária

Curso de Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes

**Perfis sorológicos de PAG (Pregnancy-Associated
Glycoprotein) e progesterona durante a gestação e período pós-
parto em
cabras Moxotó e Canindé**

Noelita Melo de Sousa

APROVADA EM 29/07/1997

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo
Orientador

Prof. Dr. Vicente José de F. Freitas
Co-orientador/Examinador

Prof. Dra. Lúcia D. Machado da Silva
Co-orientadora

Prof. Dr. Jean-François Beckers
Examinador

A Deus

A minha mãe, irmão e amigos.

Dedico

•
Não tireis de vosso aprendizado a conclusão de que sabeis de tudo, mas sim de que vos resta infinitamente a saber.

Pascal

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador Dr. José Ricardo de Figueiredo, pelo apoio incondicional, pelos valiosos conselhos e pela confiança em mim depositada na execução deste trabalho. Sua dedicação à pesquisa é para mim um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Jean-François Beckers, pela calorosa hospitalidade no Serviço de Fisiologia da Reprodução da Universidade de Liège, Bélgica, e sem o qual não teria sido possível a realização deste trabalho. A ele, minha mais profunda gratidão pelos conselhos e críticas que em muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

À Dra. Any Garbayo, amiga inestimável, pelo total apoio dado à realização deste trabalho, pelos valiosos conselhos em estatística e, sobretudo, por tornar agradáveis todos os momentos de minha estadia em Liège.

Ao Dr. Joseph Sulon, pelos ensinamentos das técnicas de dosagem rádio-imunológica, pela amizade e companheirismo a mim sempre dedicados.

A todos os amigos do Serviço de Obstetrícia da Universidade de Liège, pela contribuição dada à execução deste trabalho.

Ao Dr. José Ferreira Nunes, exemplo de pesquisador, pelo apoio e incentivo sempre constantes. Seus ensinamentos foram o alicerce sobre o qual construiu-se este trabalho.

Aos doutores Lúcia Daniel Machado da Silva e Vicente José de Figueirêdo Freitas, pelos valiosos conselhos que em muito contribuíram para a elaboração da tese.

Às amigas de mestrado Ana Paula Ribeiro Rodrigues e Christiani Andrade Amorim, pela amizade e colaboração que tornaram possível a execução deste trabalho.

Aos Médicos Veterinários Fátima Révia Granja Lima e Airton Alencar de Araújo, pela colaboração na execução do experimento.

Aos Médicos Veterinários Carolina Madeira Lucci, Frederico Martins Brito, Emerson Pinto Moreira e Marcelo Barbosa Bezerra, e ao estudante Abelardo R. Azevedo Júnior, pela valiosa contribuição na execução do experimento.

Aos colegas, professores e funcionários do Curso de Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes, pelos ensinamentos e companheirismo sempre presentes.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará (EPACE), pelo empréstimo das instalações e animais utilizados na realização desta pesquisa.

Aos funcionários da EPACE, Hildebrando Ferreira Lima (Técnico Agrícola) e Antônio Nunes de Oliveira (Diretor de Pesquisa do Sertão Central), pelo valioso apoio à execução do experimento.

À Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP), pela concessão da bolsa de estudo ao longo do curso.

A todos os que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho. É para mim um dever, mas sobretudo, uma honra poder agradecer-lhes sinceramente.

SUMÁRIO

ABREVIACÕES E SÍMBOLOS.....	01
RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	07
INTRODUÇÃO GERAL.....	09
PRIMEIRA PARTE: REVISÃO DE LITERATURA	
CAPÍTULO 1 - Aspectos gerais da fisiologia reprodutiva da cabra	
1.1. Origem e desenvolvimento dos folículos ovarianos.....	13
1.2. A ovulação.....	13
1.3. O corpo lúteo.....	14
A) Formação.....	14
B) Manutenção.....	15
C) Luteólise.....	15
D) Reconhecimento materno da gestação.....	16
1.4. Aspectos endócrinos relacionados à reprodução caprina.....	17
A) O estro e a ovulação.....	18
B) A fase luteínica.....	18
C) A gestação.....	20
D) A parturição.....	20
E) O período pós-parto.....	22
CAPÍTULO 2 - Formação da placenta	
2.1. Desenvolvimento embrionário.....	24
2.2. Formação dos anexos embr. a partir dos folhetos extra-embrion..	25
2.3. Implantação.....	26
2.4. Formação e estrutura da placenta de ruminantes.....	28
A) O placentoma.....	28
B) As células binucleadas.....	29

2.5. Estrutura placentária.....	32
A) Estrutura histológica.....	32
B) Estrutura anatômica.....	34
C) Perda de tecido por ocasião do parto.....	35
CAPÍTULO 3 - Endocrinologia da gestação	
3.1. Produção de esteróides durante a gestação.....	36
A) Síntese de progesterona nos ovários.....	36
B) Síntese de esteróides na placenta.....	38
C) Características dos perfis de progesterona.....	39
3.2. Produção de proteínas placentárias.....	40
A) Características da produção de proteínas placentárias.....	40
B) Especificidade das proteínas placentárias.....	41
C) Produção de proteínas placentárias por tumores.....	42
D) Função das proteínas placentárias.....	42
3.3. Principais proteínas produzidas pela placenta.....	43
A) Gonadotrofinas Coriônicas.....	43
B) Horm. Lactogênios Placentários ou Somatotrofinas Coriônicas.....	46
C) Proteínas Associadas com o Sinal Embrionário.....	50
I) Fator Precoce da Gestação (EPF).....	50
II) Interferon Tau (IFN τ).....	51
D) Proteína Específica da Gestação B (PSPB).....	53
E) Proteínas Associadas à Gestação (PAG).....	54
I) Características físico-químicas da PAG.....	55
II) Dosagem rádio-imunológica da PAG.....	58
III) Diagn. de gestação por dosagem radioimunológica de PAG...	59
IV) Conservação e degradação da PAG.....	62
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	65
SEGUNDA PARTE: TRABALHO EXPERIMENTAL	
RESUMO.....	69
INTRODUÇÃO.....	70
MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
RESULTADOS.....	77

DISCUSSÃO.....	85
CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	95
BIBLIOGRAFIA GERAL.....	97

ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ACAT	: acil colesterol acil transferase
ACTH	: hormônio adrenocorticotrófico
AFP	: alfafetoproteína
Ag ^o	: antígeno frio ou não-marcado
Ag*	: antígeno quente ou marcado
AMP	: adenosina monofosfato
b	: bovino(a)
BSA	: albumina sérica bovina
c	: caprino(a)
°C	: graus Celsius
CEH	: colesterol éster hidrolase
CG	: chorionic gonadotrophin, gonadotrofina coriônica ou hormônio coriônico somatotrófico
CS	: chorionic somatomammotrophin ou somatotrofina coriônica
CV	: coeficiente de variação
d	: dia
DASP	: double antibody solid phase
DNA	: ácido desoxirribonucléico
DP	: desvio padrão
e	: eqüino(a)
eCG	: equine chorionic gonadotrophin ou gonadotrofina coriônica eqüina
EP	: erro padrão
EPF	: early pregnancy factor ou fator precoce de gestação
FSH	: hormônio folículo estimulante
g	: grama, exceto quando se refere à aceleração
GLM	: general linear model
GH	: hormônio de crescimento ou hormônio somatotrófico
GnRH	: hormônio liberador de gonadotrofinas
h	: hora
h	: humano(a)
¹²⁵ I	: isótopo radioativo iodo 125
IA	: inseminação artificial

HDL	: high density lipoprotein ou lipoproteína de alta densidade
IFN	: interferon
Ig	: imunoglobulina
l	: litro
LDL	: low density lipoprotein ou lipoproteína de baixa densidade
LH	: hormônio luteinizante
M	: molar
mg	: miligrama
MHz	: megahertz
min ⁴	: minuto
ml	: mililitro
mm	: milímetro
µg	: micrograma
µl	: microlitro
n	: número
ng	: nanograma
OSA	: albumina sérica ovina
p	: porcino(a)
P	: probabilidade
P4	: progesterona
PAG	: pregnancy-associated glycoprotein ou proteína associada à gestação
PGE	: prostaglandina E
PGF _{2α}	: prostaglandina F _{2α}
pI	: ponto isoelétrico
PL	: placental lactogen ou hormônio lactogênio placentário
PMSG	: pregnant mare's serum gonadotrophin ou gonadotrofina sérica da égua prenhe
PRL	: prolactina
PSPA	: pregnancy-specific protein A ou proteína específica da gestação A
PSPB	: pregnancy-specific protein B ou proteína específica da gestação B
RNA	: ácido ribonucléico
SAS	: statistical analyse system
T ₃	: hormônio tireoideano

TP	: trophoblast protein ou proteína trofoblástica
TRIS	: tris-hidroximetil aminometano
UI	: unidade internacional
VS	: versus
#	: número

RESUMO

O objetivo deste estudo foi descrever os perfis sorológicos de PAG durante a gestação e período pós-parto, assim como os perfis de progesterona ao longo da gestação em cabras nativas do Nordeste do Brasil. Um total de 30 cabras (Canindé, n=11 e Moxotó, n=19) inseminadas artificialmente foi utilizado. Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos não-heparinizados nos dias 0 (dia da IA), 11, 16, 18, 20, 24 e 30 pós-inseminação. A seguir, amostras foram coletadas quinzenalmente até o dia 145, e semanalmente durante o primeiro mês pós-parto. As concentrações séricas de PAG e progesterona foram determinadas por meio de radioimunoensaio heterólogo. Os perfis de PAG não foram diferentes entre raças. Entretanto, foram observados efeitos significativos da semana de gestação ($P < 0,0001$) e da prolificidade ($P < 0,05$) sobre as concentrações de PAG. Durante a gestação, foram observadas baixas concentrações de PAG nas 1ª e 3ª semanas. Em seguida, houve um incremento significativo ($P < 0,05$) nas concentrações de PAG nas 5ª e 7ª semanas, e um decréscimo significativo ($P < 0,05$) na 9ª semana. Após, concentrações de PAG permaneceram relativamente constantes até a 17ª semana e, então, decresceram lentamente até o parto. Após o parto, concentrações de PAG decresceram rapidamente, alcançando os mais baixos níveis na 4ª semana pós-parto. Concentrações médias de P4 variaram significativamente entre animais ($P < 0,0001$) e com o período de gestação ($P < 0,0001$), não sendo, entretanto, afetadas pela raça ou número de fetos. Estes resultados indicaram que concentrações de PAG e progesterona foram similares para cabras Canindé e Moxotó. Em ambas as raças, concentrações de PAG foram significativamente afetadas pelo estágio de gestação e pela prolificidade.

Palavras chave: PAG, progesterona, cabra, gestação, pós-parto.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe PAG and P4 profiles throughout pregnancy and the first month postpartum in native goats from two different breeds of Northeast of Brazil. A total of 30 goats (Canindé, n=11 and Moxotó, n=19) were used in this study. All goats were artificially inseminated (day of AI) and peripheral blood was collected in non-heparinized tubes on days 0, 11, 16, 18, 20, 24 and 30 after AI. After that, samples were collected every two weeks until day 145, and weekly during the first month postpartum. Serum concentrations of PAG and P4 were measured by means of RIA. PAG profiles were not different between breeds over gestation. However, a significant effect of week of gestation ($P<0.0001$) and prolificacy level ($P<0.05$) on PAG concentrations were found. Lower concentrations of PAG were observed on weeks 1 and 3. Afterwards there was a significant ($P<0.05$) increase on PAG concentrations by weeks 5 to 7, and a significant decrease ($P<0.05$) by week 9. Then, PAG concentrations remained relatively constant until week 17, and finally decreased slowly until parturition. After parturition, PAG concentrations decreased rapidly, reaching the lowest concentrations on the week 4. Over gestation, mean weekly P4 concentrations varied significantly between animals ($P<0.0001$) and with the time of gestation ($P<0.0001$), but they were not affected by breed or prolificacy level. These results indicate that PAG and P4 concentrations were similar for Caninde and Moxoto goats. For both breeds, PAG was significantly affected by stage of gestation as well as by prolificacy level.

Key words: PAG, progesterone, goat, gestation, postpartum.

INTRODUÇÃO GERAL

A maior população de pequenos ruminantes do Brasil encontra-se na região Nordeste, a qual conta com 89,8% do rebanho caprino nacional (Anuário Estatístico do Brasil, 1994). Para os habitantes desta região, os caprinos constituem uma importante fonte de proteína animal, contribuindo significativamente com o suprimento alimentar e fornecendo leite e couro de excelentes qualidades (Souza Neto, 1987). Apesar de sua importância, a caprinocultura no Nordeste é caracterizada por uma baixa eficiência reprodutiva, com longos intervalos entre partos. Neste contexto, uma das principais alternativas para se aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos consiste na adoção de tecnologias que permitam a racionalização da produção (como por exemplo a inseminação artificial, o diagnóstico precoce de gestação, a transferência de embriões, etc). Dentre essas tecnologias, o diagnóstico de gestação assume um papel fundamental, facilitando o controle da fertilidade, o que permite a redução do intervalo entre partos e o manejo adequado das matrizes.

A busca de métodos cada vez mais precoces e precisos de diagnóstico de gestação levou à descoberta de diversas proteínas placentárias, dentre as quais merece destaque a PAG (Pregnancy-Associated Glycoprotein), uma glicoproteína detectável na circulação periférica materna de ruminantes a partir da 3ª semana de gestação (Benitez Ortiz, 1992; Zoli et al., 1992b).

A primeira parte deste trabalho será dedicada à apresentação de uma revisão de literatura sobre os principais aspectos referentes à fisiologia reprodutiva de fêmeas caprinas, com enfoque principal à endocrinologia placentária. Na segunda parte, serão descritos os perfis de PAG e de progesterona durante a gestação e período pós-parto em cabras Canindé e Moxotó, objeto principal deste trabalho de tese.

PRIMEIRA PARTE

REVISÃO DE LITERATURA

CAPÍTULO 1

Aspectos gerais da fisiologia reprodutiva da cabra

1.1. Origem e desenvolvimento dos folículos ovarianos.

Na fêmea, a produção de gametas é o resultado da associação de 2 fenômenos que se sucedem no interior do ovário: a ovogênese e a foliculogênese. A ovogênese é composta pelo conjunto de etapas nas quais passam as células germinais desde a aparição das ovogônias até a formação dos ovócitos, inclusos no interior dos folículos primordiais. A foliculogênese corresponde ao crescimento dos folículos desde o estado de folículos primordiais até o momento onde estes ovulam ou se tornam atrésicos (Saumande, 1991).

De acordo com o grau de evolução, pode-se dividir a população folicular de um ovário em folículos não-cavitários ou pré-antrais (folículos primordiais, primários e secundários) e folículos cavitários ou antrais (folículos terciários e folículos de De Graaf). Segundo descrito por Driancourt et al. (1991), o período inicial de crescimento folicular (até a formação do antro) não é estritamente dependente de gonadotrofinas. Por outro lado, a formação do antro e o crescimento final dos folículos são totalmente dependentes do FSH e do LH.

A grande maioria dos folículos ovarianos não chega até a ovulação, mas ao contrário, degenera-se por meio de um processo denominado atresia. A atresia reduz de maneira significativa o número de ovócitos potencialmente ovuláveis, reduzindo, conseqüentemente, a produção de ovócitos viáveis durante a vida útil de um animal. Em ruminantes, a ovulação pode ser considerada um evento raro. Em bovinos, isto foi demonstrado com a observação de que somente 1 folículo em 1000 chega ao estágio pré-ovulatório (Ireland, 1987).

1.2. A ovulação

A etapa final do desenvolvimento folicular é a ovulação. A ovulação consiste na liberação do óvulo do folículo ovariano (Hafez, 1995b). Nesta fase, as células da granulosa do folículo pré-ovulatório

hipertrofiam-se e separam-se, perdendo seu arranjo colunar, enquanto que as células da teca tornam-se vacuolizadas e muito vascularizadas, dando ao folículo uma aparência hiperêmica (Driancourt et al., 1991).

A ovulação em caprinos ocorre 30 a 36 horas após o início do cio, resultando de uma série de alterações na estrutura da parede folicular, causadas pelo aumento na secreção de FSH e LH pela hipófise (Hafez, 1995b). Essas alterações consistem basicamente na desintegração das células do ápice do folículo, o que conduz à ruptura de sua parede (Driancourt et al., 1991).

1.3. O corpo lúteo

O corpo lúteo é formado pela continuidade da maturação e desenvolvimento das células da granulosa e da teca foliculares (Smith, 1986). As células da teca interna e da granulosa remanescentes no folículo após a ovulação dão origem a células esteroidogênicas luteínicas (Fields & Fields, 1996). Logo após a ovulação, o corpo lúteo formado é denominado cíclico, podendo o mesmo sofrer regressão (luteólise), ou ser preservado ao longo da gestação, formando assim o corpo lúteo da gestação ou "corpus luteum verum" (Jainudeen & Hafez, 1995a).

Na maior parte dos mamíferos, a duração do corpo lúteo cíclico é breve, variando de 12 a 21 dias de acordo com a espécie (Leymarie & Martal, 1991). No caso do não estabelecimento de uma gestação viável, o corpo lúteo regride por ação de uma luteolisina ($PGF_{2\alpha}$), iniciando-se um novo ciclo estral. Caso seja estabelecida a gestação, um mecanismo de reconhecimento materno induz ao bloqueio da luteólise, com a manutenção de um ou de vários corpos lúteos funcionais ao longo da gestação (Bazer et al., 1995). A manutenção do corpo lúteo ao longo da gestação resulta da produção de fatores anti-luteolíticos e/ou luteotrópicos pelo próprio embrião. Entretanto, o mecanismo exato envolvido neste processo ainda não foi totalmente elucidado (Derivaux et al., 1988).

A) Mecanismos envolvidos na formação do corpo lúteo

O corpo lúteo é formado pela luteinização, ou seja, pela transformação morfológica e funcional das células da granulosa e da teca

interna do folículo ovariano, em grandes e pequenas células luteínicas (Leymarie & Martal, 1991). Na maioria das espécies, a luteinização ocorre em consequência direta da ação do hormônio luteinizante (LH) sobre o folículo pré-ovulatório (Baird, 1992).

Durante a luteinização, além de um aumento no diâmetro celular (Baird, 1992), são observadas também diversas modificações na síntese de esteróides (Wiltbank & Niswender, 1992). A produção de progesterona pode aumentar em até 10 vezes devido ao aumento na quantidade das enzimas que participam das primeiras etapas da síntese de esteróides, enquanto que a síntese de andrógenos e estrógenos diminui a níveis muito baixos devido à redução das enzimas que participam das etapas finais da síntese de esteróides (Rodgers et al., 1986).

B) Mecanismos envolvidos na manutenção do corpo lúteo

Enquanto a formação do corpo lúteo parece ser um processo similar nas diferentes espécies, os mecanismos envolvidos em sua manutenção possuem diferenças consideráveis entre as espécies (Baird, 1992).

O LH parece ser o principal responsável pela formação e manutenção da função luteínica em ruminantes, estimulando a síntese de progesterona pelas pequenas células luteínicas (Baird, 1992). Em ovinos, a prolactina também parece ser essencial à manutenção da gestação. Na ovelha, a hipofisectomia praticada ao 10º dia de gestação provoca a regressão do corpo lúteo, sendo o mesmo mantido somente com a administração simultânea de LH e prolactina ao animal (Leymarie & Martal, 1991).

C) Mecanismos envolvidos na luteólise

Em todas as espécies de animais domésticos, a luteólise é causada por uma luteolisina produzida a nível de endométrio uterino (Leymarie & Martal, 1991). Esta luteolisina foi identificada como sendo a $\text{PGF}_{2\alpha}$. A secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na veia uterina de ovelhas no momento da luteólise é pulsátil, na proporção aproximada de 4 a 5 pulsos em 24 horas (Zarco et al., 1988). Estes dados são similares aos obtidos por McCracken et al. (1984), os quais demonstraram a necessidade de ao menos 5 pulsos sucessivos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em 25 horas para a indução da luteólise completa. A

$\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada pelo útero chega ao ovário por um mecanismo de transferência contra-corrente entre a veia útero-ovariana e a artéria ovariana à qual esta encontra-se ligada (Leymarie & Martal, 1991).

O modo exato pelo qual a $\text{PGF}_{2\alpha}$ causa luteólise ainda não foi completamente elucidado. Dois mecanismos principais podem estar envolvidos (Leymarie & Martal, 1991). O primeiro consistiria na redução do débito sanguíneo no corpo lúteo, causado pelas propriedades vasoconstrictoras da $\text{PGF}_{2\alpha}$. O segundo resultaria de uma ação direta sobre a célula luteínica. Esta ação direta resultaria em uma diminuição da síntese de AMP cíclico induzida pelo LH e de uma inibição da ação esteroidogênica do AMP cíclico a nível de pequenas células luteínicas (Silvia et al., 1984).

D) Reconhecimento materno da gestação

A observação de que é possível prolongar a vida do corpo lúteo em fêmeas não-gestantes com a administração intrauterina de homogenatos de embriões foi feita inicialmente por Martal et al. (1979), os quais descobriram a existência de uma proteína trofoblástica com atividade anti-luteolítica, denominada inicialmente trofoblastina. Esta proteína, hoje conhecida como Interferon tau ($\text{IFN}\tau$), consiste em um hormônio anti-luteolítico parácrino que age no epitélio uterino para inibir a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, assegurando, desta forma, a manutenção de um corpo lúteo funcional (Bazer et al., 1994). Além de diminuir a atividade das enzimas implicadas na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, o $\text{IFN}\tau$ também inibe a estimulação pela ocitocina, da síntese e secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Bazer, 1989). O $\text{IFN}\tau$ é secretado pelo trofotoderme de conceptos bovinos, ovinos e caprinos, sendo considerado o sinal do reconhecimento da gestação nestas espécies (Bazer et al., 1995).

O mecanismo de transformação do corpo lúteo cíclico em gestacional pode ser descrito da seguinte maneira: o $\text{IFN}\tau$ (secretado do 11º ao 21º dias na ovelha e do 15º ao 25º dias na vaca) age diretamente sobre o endométrio onde provoca o aparecimento de um inibidor da prostaglandina sintetase, prevenindo também a ação da ocitocina. Isto resulta em uma diminuição do número e da amplitude de descargas sincrônicas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e de ocitocina no início da gestação (Leymarie & Martal, 1991).

1.4. Aspectos endócrinos relacionados à reprodução caprina

O ciclo estral nos ruminantes pode ser caracterizado como um conjunto de alterações comportamentais e de modificações morfológicas e fisiológicas do aparelho genital, que se produzem sempre na mesma ordem, com um ritmo regular e contínuo, na ausência de gestação. Estas modificações estão diretamente relacionadas ao funcionamento cíclico do ovário, sendo reguladas por mecanismos endócrinos e neuro-endócrinos, principalmente pelos hormônios hipotalâmicos, gonadotrofinas e esteróides ovarianos (Hafez, 1995c).

Em regiões de clima temperado (latitudes superiores a 35°), as fêmeas caprinas comportam-se como animais poliéstricos estacionais. Nestas regiões, a estacionalidade é governada pelo fotoperiodismo, com a atividade estral começando durante o período em que a duração de luz diária começa a diminuir. Em regiões de latitude inferior (regiões equatoriais, tropicais e subtropicais), onde há menor variação na quantidade de luz diária, as cabras tendem a se reproduzir durante todo o ano (Jainudeen & Hafez, 1995b). Especificamente a nível de Nordeste do Brasil, as cabras podem ser consideradas animais poliéstricos contínuos (Simplício, 1980), podendo apresentar ciclos éstrais regulares ao longo de todo o ano (Simplício, 1985), o que depende basicamente da disponibilidade de alimentos e da temperatura ambiental (Garcia & Garcia, 1993).

O início da atividade cíclica ovariana em cabras (início da puberdade) é observado aproximadamente do 5º ao 7º mês de idade em caprinos de regiões temperadas (Jainudeen & Hafez, 1995b) e do 7º a 12º mês em cabras nativas do Nordeste do Brasil (Foote et al., 1986). A idade à puberdade pode ser influenciada por diversos fatores, dentre os quais, o principal parece ser o peso corporal. Isto é evidenciado pela observação de que animais melhor alimentados atingem a puberdade mais precocemente que animais subalimentados (Hafez, 1995a).

O ciclo estral em cabras tem uma duração média de 21 dias (Chemineau et al., 1991), podendo haver, entretanto, variações para mais (ciclos longos) ou para menos (ciclos curtos; Medeiros et al., 1994). O ciclo estral pode ser dividido em duas fases: a fase folicular e a fase luteínica. A fase folicular corresponde ao período de recrutamento,

seleção, dominância e final do crescimento folicular, indo até a ovulação. A fase luteínica inicia-se com a ovulação e estende-se até a regressão funcional do corpo lúteo (Stabenfeldt & Edquist, 1988).

A) O estro e a ovulação

O comportamento de estro reflete a época da receptividade sexual da fêmea pelo macho. O estro dura 24 a 48 horas em cabras (Jainudeen & Hafez, 1995b), já tendo sido descritos, entretanto, estros com duração tão curta quanto 22 horas (Van Rensburg, 1971) e tão longa quanto 96 horas (Jarosz et al., 1971). Ele resulta do aumento da secreção de 17β -estradiol pelos folículos ovarianos em estágios finais de crescimento (Stabenfeldt & Edquist, 1988).

A elevação das concentrações de 17β -estradiol na circulação periférica, além de desencadear o comportamento de estro, induz igualmente, por retro-controle positivo (Dial et al., 1985), a liberação de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) pelo hipotálamo, resultando em uma descarga maciça das gonadotrofinas FSH e LH pela adenohipófise (Chemineau et al., 1982). A onda pré-ovulatória destas gonadotrofinas ocorre aproximadamente 3 horas após a secreção máxima de 17β -estradiol pelos folículos ovarianos (Chemineau et al., 1982), durando de 6 a 12 horas (Hafez, 1995c). O aumento na secreção de FSH e de LH ocorre de maneira quase simultânea (Figura 1), podendo ou não ser seguido de um segundo pique de FSH, caracterizado por possuir concentrações inferiores, porém tendo maior duração do que o primeiro pique (Chemineau et al., 1982). A ovulação em caprinos ocorre aproximadamente 20 horas após o pico pré-ovulatório de LH (Stabenfeldt & Edquist, 1988).

B) A fase luteínica

A descarga pré-ovulatória de gonadotrofinas hipofisárias provoca a luteinização do folículo após a ovulação, formando desta forma o corpo lúteo. Com a formação do corpo lúteo, observa-se o aumento na síntese de progesterona e a redução da secreção de 17β -estradiol (Chemineau & Delgadillo, 1994).

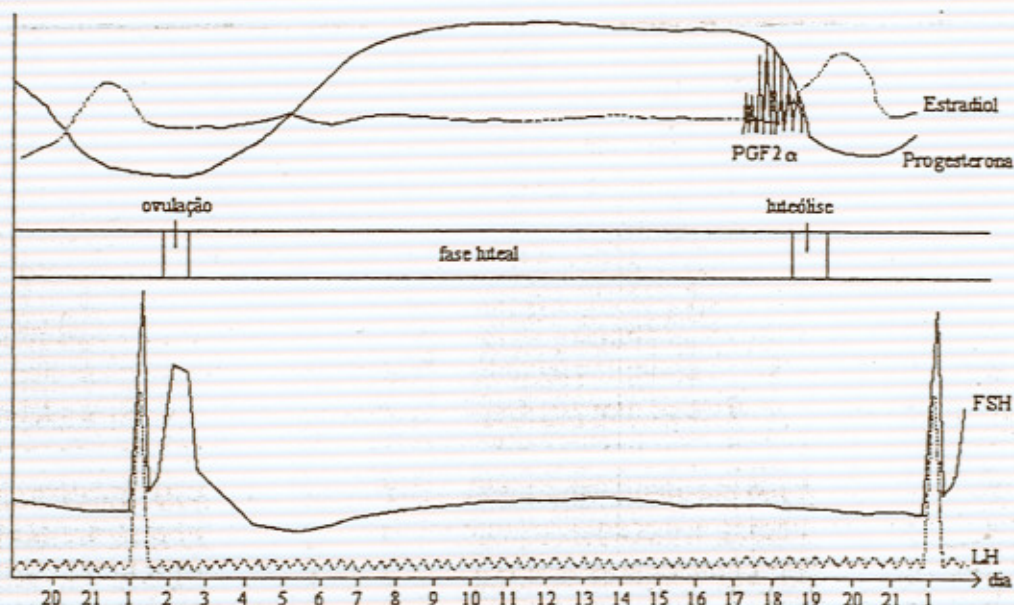


Figura 1. Representação esquemática dos diferentes eventos fisiológicos durante um ciclo estral em cabras (Adaptado de Chemineau et al., 1991).

Em caprinos, a fase lútea dura em média 16 dias (Chemineau et al., 1991). Apesar do crescimento dos folículos ovarianos continuar a ocorrer durante esta fase, um mecanismo de retro-controle negativo impede a ovulação. O bloqueio da ovulação resulta de um efeito negativo das altas concentrações de progesterona, produzidas pelo corpo lúteo funcional, sobre a liberação de GnRH pelo hipotálamo (Baril et al., 1993), o que reduz as descargas pulsáteis de LH pela hipófise, necessárias à ovulação (Stabenfeldt & Edquist, 1988). Este bloqueio continua até que as concentrações de progesterona retornem a níveis mais baixos, o que somente ocorre com a regressão do corpo lúteo, causada por um processo chamado luteólise. A luteólise ocorre normalmente em torno do 16^o a 17^o dias do ciclo estral em caprinos (Chemineau et al., 1991), resultando da ação da PGF_{2α} produzida pelo útero, sobre o corpo lúteo cíclico (Homeida & Cooke, 1982).

O mecanismo endócrino responsável pela regressão do corpo lúteo em caprinos, em caso de não-gestação, é desencadeado inicialmente pelos folículos em crescimento. No final da fase lútea, o estradiol

secretado pelos folículos em crescimento, estimula a síntese de receptores para ocitocina no endométrio uterino (McCracken et al., 1984). A ocitocina produzida pelas células luteínicas liga-se, então, a receptores endometriais, desencadeando a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio uterino (Cooke & Homeida, 1983).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ exerce dois principais efeitos na luteólise: inibe a secreção de progesterona pelo corpo lúteo e aumenta a secreção de ocitocina, o que amplifica o processo até que a luteólise se complete (Flint & Sheldrick, 1983). Imediatamente após a queda dos níveis de progesterona, verifica-se um forte aumento na frequência e nos pulsos de LH (Mori & Kano, 1984), o qual estimula o crescimento dos folículos de diâmetro superior a 1,0 mm (Akasu et al., 1986) e a síntese de 17β -estradiol, o que desencadeia novamente o comportamento de estro.

C) A gestação

O período médio de gestação em caprinos é bastante variável, podendo ser influenciado por fatores individuais, pela raça, idade da mãe e pelo número de fetos (Medeiros et al., 1994). Em média, a duração da gestação nesta espécie é de 150 dias, sendo a maior frequência das parturições (90%) observada entre o 146º e o 154º dias de gestação (Peaker, 1978).

Aparentemente, a produção ovariana de progesterona é fundamental à manutenção da gestação em caprinos (Thorburn & Schneider, 1972). Os níveis de progesterona permanecem relativamente constantes durante toda a gestação (Delpino & González-Stagnaro, 1993), sendo observado um significativo declínio em suas concentrações aproximadamente 24 horas antes do parto (Umo et al., 1976).

D) A parturição

O parto pode ser definido como o processo fisiológico pelo qual o útero gestante libera o feto e a placenta do organismo materno (Jainudeen & Hafez, 1995a). Em caprinos, a maior frequência de parturições (91%) durante o dia é verificada entre às 6:00 h e às 21:00 h (Bosc et al., 1988).

O parto pode ser dividido em três principais fases. A primeira corresponde à retomada da atividade contrátil do miométrio. A segunda fase inicia-se com a dilatação do colo uterino, terminando com a expulsão rápida do feto. Por fim, observa-se a expulsão dos anexos fetais (Maltier et al., 1991).

O mecanismo que estimula o início do parto, na maioria das espécies mamíferas, é desencadeado pelo feto. O aumento na demanda nutricional do feto no final da gestação estimula, por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, a ativação do eixo hipófise-hipotálamo fetal, o que estimula a produção de ACTH. O ACTH, por sua vez, por seu efeito estimulatório sobre as adrenais fetais (Currie & Thoburn, 1977), induz ao aumento nos níveis de cortisol fetal, tendo, como consequência, o aumento na síntese endometrial de prostaglandinas (Bazer & First, 1983).

Em caprinos, a $PGF_{2\alpha}$ exerce dois principais efeitos no mecanismo do parto: contribui com o processo luteolítico (Cooke & Knifton, 1980) e amplifica a sensibilidade uterina à ocitocina (Maltier et al., 1991). O aumento brusco na secreção de prostaglandinas por ocasião do parto (Umo et al., 1976; Currie & Thoburn, 1977) resulta na regressão do corpo lúteo e, conseqüentemente, na redução das concentrações periféricas maternas de progesterona (Currie & Thoburn, 1973). Com a diminuição na proporção entre as concentrações plasmáticas de progesterona/estradiol, o miométrio passa do estado de dominância progesterônica, responsável pela quiescência, para um estado de forte impregnação estrogênica, mais favorável a contratilidade miometrial (Maltier et al., 1991). O favorecimento à contratilidade resulta principalmente da facilitação da ação de agentes estimuladores da contratilidade sobre a musculatura uterina (Maltier et al., 1991).

A ocitocina é a mais importante substância estimuladora da contratilidade uterina na fase de expulsão rápida do feto. Ela é liberada pela hipófise materna após a dilatação do colo uterino pela presença do feto (Reflexo de Ferguson), aumentando a força e a frequência das contrações fásicas do útero, o que resulta na expulsão do feto (Jainudeen & Hafez, 1995a).

Assim como a ocitocina, a relaxina também tem papel fundamental na parturição. Ela é produzida pelo corpo lúteo ovariano, tendo como principais efeitos o relaxamento do ligamento sinfisário e o amadurecimento do colo uterino materno, necessários à passagem do feto (Maltier et al., 1991).

E) O período pós-parto

Em caprinos, assim como nas demais espécies ruminantes, o parto é seguido de um período de repouso sexual (anestro pós-parto), no qual o organismo materno passa por uma série de transformações até retornar ao seu estado normal não-gestante (Jainudeen & Hafez, 1995a).

Entre as principais modificações observadas durante o período pós-parto estão a involução uterina, a retomada da atividade ovariana e o restabelecimento do sincronismo do eixo hipotálamo-hipófise-ovário-útero (Hafez, 1995a). Na cabra, o processo de involução uterina é rápido durante as duas primeiras semanas pós-parto, sendo gradual nas duas semanas seguintes (Tielgy et al., 1982; Fasanya et al., 1987). No que diz respeito à retomada da atividade ovariana, esta depende basicamente do restabelecimento da liberação de GnRH pelo hipotálamo, o que desencadeia a secreção pulsátil das gonadotrofinas necessárias à maturação final dos folículos ovarianos e à ovulação (Jainudeen & Hafez, 1995a).

A duração do anestro pós-parto em caprinos também está sujeita à influência de fatores como a intensidade da amamentação (Bellaver & Nunes, 1982; Lawson et al., 1984) e o nível nutricional das cabras (Sachdeva et al., 1973; Guimarães Filho et al., 1982; Guimarães Filho, 1983). O mecanismo pelo qual a amamentação retarda o início da atividade ovariana pós-parto parece estar relacionado a uma inibição da descarga de LH, causada pela prolactina (Delouis & Richard, 1991). No tocante ao nível nutricional, supõe-se que o mecanismo envolvido relaciona-se a um efeito negativo de baixos níveis nutricionais sobre a secreção de gonadotrofinas pela adenohipófise (Guimarães Filho, 1983).

No caso particular dos caprinos criados a nível de Nordeste do Brasil, os longos períodos de anestro pós-parto (93,2 a 170,3 dias; EMBRAPA, 1981) estão mais estreitamente relacionados com o nível de

nutrição, caracterizando, desta forma, um fenômeno ecofisiológico (Guimarães Filho, 1983).

CAPÍTULO 2

Formação da placenta

A placenta é um órgão transitório próprio aos mamíferos euterianos. Ela é uma estrutura única e especializada, podendo ser definida como a justaposição e ou fusão, das membranas fetais ao endométrio, permitindo a realização das trocas fisiológicas necessárias entre mãe e feto (Jainudeen & Hafez, 1995a). Sua formação inicia-se no período embrionário, sendo observado, entretanto, um processo contínuo de remodelação ao longo da gestação, o que assegura uma perfeita adaptação das estruturas materna e fetal.

2.1. Desenvolvimento embrionário inicial

A fertilização pode ser definida como a união entre os gametas de origem materna e paterna, dando origem ao zigoto (Crozet, 1991). O zigoto constitui-se em uma célula única e diplóide, possuindo uma grande proporção de citoplasma em relação ao seu material nuclear (Bazer et al., 1995). Ele inicia sua segmentação (clivagem), em qualquer que seja a espécie, entre 11 e 20 horas após a fecundação (Ménézo & Renard, 1991). A primeira divisão de segmentação (início do estado de duas células) divide o zigoto em 2 blastômeros de tamanhos equivalentes. A segunda segmentação ocorre em ângulos retos à primeira, originando um embrião de 4 células. Nas etapas seguintes, os blastômeros continuam a se segmentar, originando um embrião com 8 e 16 blastômeros, os quais formam uma pequena e esférica massa celular chamada mórula (Gordon, 1994). A partir do estágio de 32 células na vaca, junções compactas se formam entre os blastômeros, aumentando o contato íntimo entre eles (Prather & First, 1988; Bondioli et al., 1990). Neste estágio, o embrião passa a ser denominado mórula compacta, a qual caracteriza-se pelo acúmulo dos blastômeros em um grupo celular compacto dentro da zona pelúcida (Bazer et al., 1995). Dando continuidade ao processo de segmentação, o embrião chega ao estágio de blastocisto, o que ocorre aproximadamente ao 7º ou 8º dias de gestação na vaca (Gordon, 1994). Este estágio caracteriza-se pelo desenvolvimento da blastocele, uma cavidade central formada pelo acúmulo de líquido nos espaços

intercelulares do embrião. Uma única camada de células passa então a circundar a blastocele, sendo esta camada denominada trofoblasto ou trofoectoderma. Os demais blastômeros formam a massa celular interna, localizada em um dos pólos da cavidade central (Bazer et al., 1995).

O trofoblasto pode ser caracterizado como um epitélio achatado, no qual as membranas celulares encontram-se intimamente interdigitadas, sendo ligadas também por desmossomos e junções compactas, características dos tecidos epiteliais. As células do trofoblasto contribuem para a formação dos folhetos extra-embriônicos, especialmente daqueles envolvidos na formação da placenta (Guillomot et al., 1991). A massa celular interna, também chamada botão embrionário ou embrioblasto, é formada por células apostas umas as outras. Ela se projeta dentro da blastocele, formando o disco embrionário, a partir do qual se diferenciam os folhetos embrionários endoderma, mesoderma e ectoderma, que darão origem aos diversos tecidos e órgãos do organismo (Guillomot et al., 1991; Bazer et al., 1995; Figura 2).

O blastocisto se liberta da zona pelúcida aproximadamente ao 8º ou 9º dias de gestação na ovelha, e ao 9º ou 10º dias de gestação na vaca. A ruptura da zona pelúcida pode ocorrer devido à expansão do blastocisto ou após lise enzimática, causada por proteases uterinas e/ou embrionárias (Guillomot et al., 1991). Em bovinos, a expansão e a contração do blastocisto parecem desempenhar os principais papéis na liberação do blastocisto de sua zona pelúcida (Fléchon & Renard, 1978).

2.2. *Formação dos anexos embrionários a partir dos folhetos extra-embriônicos*

Os anexos embrionários ficam situados entre o tecido materno e o embrião, ao qual estão ligados pelo cordão umbilical. Em ruminantes, caracterizados por possuir embriões com fase de vida livre muito longa, o início da formação dos anexos embrionários ocorre antes da implantação. Nestes animais é observado um alongamento do blastocisto até que este ocupe inteiramente a luz do corno uterino (Guillomot et al., 1991). O alongamento do blastocisto inicia-se aproximadamente ao 12º ou 13º dias de gestação em bovinos e ao 11º ou 12º dias de gestação em ovinos

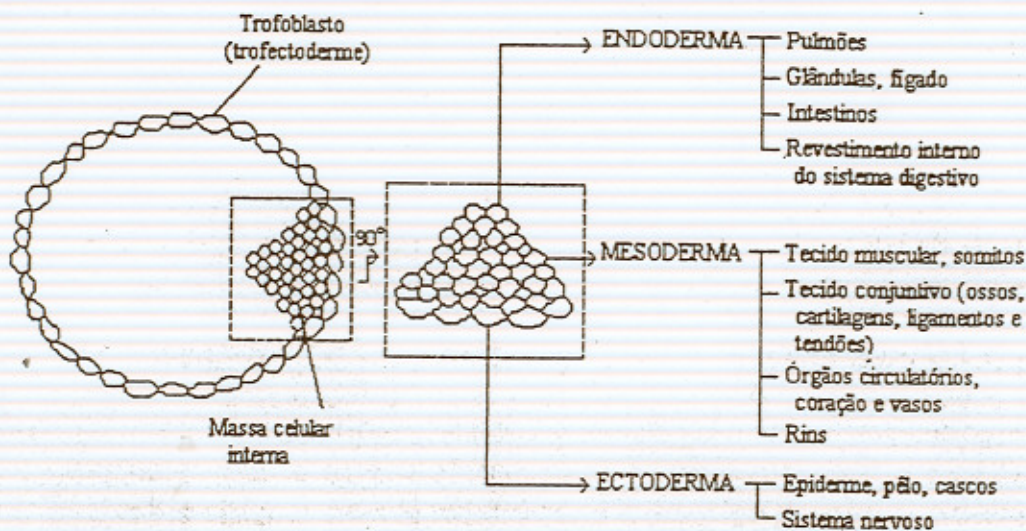


Figura 2 - Origem dos folhetos embrionários (Adaptado de Jainudeen & Hafez 1995a).

(Godkin et al., 1982; Godkin et al., 1984b). Nesta fase, o disco embrionário, inicialmente de forma circular, torna-se de contorno ovalado, alongando-se logo em seguida. O trofoblasto prolifera para formar um saco em forma de funo, estendido dentro do corno grávido, alcançando o corno não-grávido aproximadamente aos 20 dias de gestação. O âmnion circunda completamente o feto; o saco vitelino atrofia rapidamente e o alantóide se estende sob o córion em um dos lados do feto (Derivaux et al., 1988).

2.3. Implantação

A implantação tem como objetivo o estabelecimento de relações diretas entre o tecido materno (endométrio) e o fetal (trofoblasto). Ela pode ser superficial, como no caso de espécies que apresentam placentas do tipo epiteliocorial, ou profunda, como observado nas espécies que apresentam placentas dos tipos endoteliocorial ou hemocorial.

Ainda não foi possível se determinar com precisão o momento do primeiro contato útero-fetal. Sabe-se apenas que o mesmo encontra-se diretamente relacionado com a espécie, não sendo, entretanto, dependente da duração da gestação (Guillomot et al., 1991).

A implantação inicia-se após a perda da zona pelúcida pelo embrião, podendo ser dividida nas fases de aproximação, aposição, adesão e invasão do endométrio (Figura 3). Na fase de aproximação, o blastocisto se aproxima do epitélio uterino, não havendo, entretanto, contato algum entre o blastocisto e o endométrio. Na fase de aposição ocorre o contato entre o blastocisto e o endométrio, sendo possível se observar a impressão de células uterinas sobre a membrana plasmática das células do trofoblasto. Na fase de adesão ocorre o desenvolvimento de um sistema de interdigitação das microvilosidades uterinas com a membrana plasmática das células do trofoblasto, a qual assegura a ancoragem definitiva do blastocisto ao endométrio. Em espécies que apresentam placentas do tipo endoteliocorial ou hemocorial, uma fase adicional de invasão do endométrio é observada (Guillomot et al., 1991).

Em ruminantes, uma invasão do endométrio no sentido estrito do termo não ocorre. O que ocorre é a penetração do epitélio uterino pelo trofoblasto, com a fusão de células binucleadas do trofoblasto, com algumas células uterinas uninucleadas, formando desta forma o tecido sincicial, característico da placenta sindesmocorial parcial (Wooding, 1982).

O início e a duração das diferentes fases de implantação são muito variáveis entre as espécies. Em bovinos, a fase de aposição começa em torno do 17º a 18º dias de gestação, ocorrendo a adesão entre o 18º e 19º dias (King et al., 1982). A união definitiva entre o epitélio materno e o fetal ocorre a partir do 19º dia. Em ovinos, a aposição ocorre a partir do 13º dia de gestação (Wooding, 1984) e a adesão entre o 16º e 18º dias (Guillomot et al., 1981). Sinais de fixação somente são observados a partir do 18º dia de gestação. Em caprinos, a implantação é um processo mais tardio que em bovinos e ovinos. A aposição ocorre a partir do 18º dia, enquanto a adesão ocorre no 21º dia e a fixação entre o 25º e 28º dias de gestação (Dent, 1973).

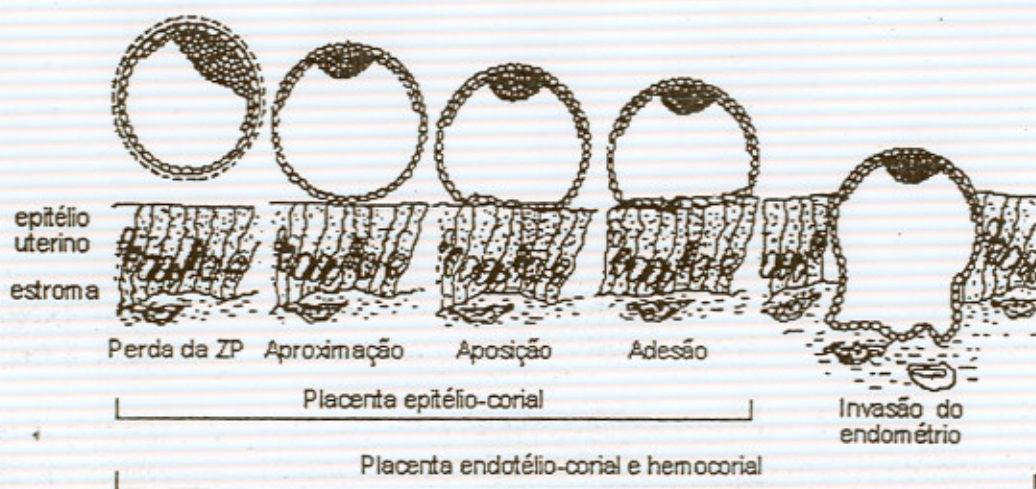


Figura 3 - Fases da implantação em mamíferos domésticos (Guillomot et al., 1991).

2.4. Formação da placenta de ruminantes

A) O placentoma

O placentoma, estrutura de ligação materno-fetal de ruminantes, é formado pela inserção das vilosidades coriônicas nas criptas das carúnculas maternas. As vilosidades coriônicas consistem em cones mesenquimatosos vasculares, circundados por células trofoblásticas cubóides e por células gigantes binucleadas (Jainudeen & Hafez, 1995a). Elas aumentam a área da junção materno-fetal ao penetrarem profundamente nas criptas carunculares. As carúnculas, verdadeiras projeções da mucosa uterina, constituem-se em pedículos centrais de tecido conjuntivo uterino, os quais ramificam-se progressivamente, dando à estrutura uma aparência areolar (Björkman, 1982).

Os placentomas de ruminantes encontram-se distribuídos em toda a superfície corial, em linhas paralelas entre si. O número de placentomas varia segundo a espécie. Na vaca, são observados entre 70 e 150 placentomas; na ovelha, entre 80 e 100 e, na cabra, entre 160 e 180 (Derivaux et al., 1988). Quanto à sua forma, em bovinos, estes são convexos, ligeiramente alongados e pedunculados. Em ovinos, são côncavos, possuindo vilosidades mais irregulares. Em caprinos, os

placentomas são mais planos que em ovinos, possuindo, entretanto, uma estrutura interna semelhante (Björkman, 1982).

O tamanho, formato e estrutura dos placentomas sofre uma série de modificações no decorrer da gestação, sendo seu desenvolvimento normalmente caracterizado pelo aumento em seu comprimento e diâmetro, e do grau de ramificação das vilosidades coriônicas (King et al., 1979).

O desenvolvimento dos primeiros placentomas no útero de fêmeas gestantes ocorre na curvatura dorsal uterina, próximo à fixação ao mesométrio. Estes placentomas são os maiores observados durante todo o decorrer da gestação. Os menores e mais jovens placentomas situam-se nas extremidades dos cornos uterinos (Hradecky et al., 1988).

Na fase inicial de formação dos placentomas, a membrana coriônica em expansão se coloca muito próximo à parede uterina. O tecido caruncular forma um sistema de criptas que se abre em direção ao córion. As criptas se expandem gradualmente em toda a espessura da massa caruncular, desenvolvendo uma extensa cadeia com diferentes graus de ramificação. As vilosidades coriônicas penetram nos canais pré-formados das criptas carunculares, expandindo-se em toda a sua extensão até que suas extremidades alcancem a base das carúnculas, onde uma densa camada separa a massa caruncular do endométrio glandular ruminantes (Hradecky et al., 1988).

Em ruminantes, é observada a degenerescência das células uterinas, seguida de uma transformação sincicial, em consequência à intensa migração de células binucleadas. A degenerescência ocorre até que o epitélio materno esteja totalmente desnudado em alguns locais, sendo estas áreas cobertas por grandes placas sinciciais (Wooding & Wathes, 1980). As células epiteliais mortas são fagocitadas por células do epitélio coriônico (Wango et al., 1990).

B) As células binucleadas

Uma das singularidades da placenta de ruminantes é a presença de células binucleadas a nível de trofotoderme. Estas células migram através da placenta, fusionando-se com células epiteliais uterinas para

formar o sincício materno-fetal, essencial ao sucesso da implantação e ao subsequente desenvolvimento dos placentomas (Wooding, 1992).

As células binucleadas derivam-se das células precursoras do trofoblasto por cariocinese sem citocinese subsequente (Björkman, 1982), surgindo aproximadamente ao 14º dia de gestação na ovelha (Wooding, 1984) e ao 20º dia na vaca (King et al., 1980). As células binucleadas possuem inicialmente um citoplasma denso e pouco volumoso, contendo algumas mitocôndrias e muitos polirribossomos. Em seguida, desenvolvem-se nestas células redes de retículo endoplasmático liso e do aparelho de Golgi. Este último produz grande quantidade de grânulos característicos, os quais ocupam mais de 50% do volume de uma célula binucleada madura (Wooding, 1992).

As células binucleadas jovens localizam-se profundamente no trofotoderme. Sua maturação vai ocorrendo progressivamente quando elas vão alcançando a superfície materna (Wooding, 1992). Seu número no trofoblasto é de aproximadamente 20% do total de células, permanecendo constante até próximo à parturição (Boshier, 1969; Wooding & Wathes, 1980; Wooding, 1984), quando observa-se um rápido decréscimo (Wooding et al., 1986). A manutenção do número relativamente constante de células binucleadas durante a gestação é devida à contínua transformação de células uninucleadas em binucleadas (Wooding, 1992).

Aproximadamente 20% das células binucleadas migram através das vilosidades coriônicas (Wooding et al., 1986; Wooding & Beckers, 1987). Em caprinos (Wango et al., 1990), assim como em bovinos (Figura 4), parte das células binucleadas migram para a interfase materno-fetal, onde fusionam com células individuais do epitélio das criptas, formando células trinucleadas de vida curta. Estas células se degeneram logo após liberarem os seus grânulos (Wooding & Wathes, 1980).

Em ovinos, as células binucleadas que migram chegam ao sincício localizado na superfície do tecido materno, fusionando-se com as células epiteliais descamativas e entrando em contato com o tecido conjuntivo materno, onde liberam seus grânulos por exocitose (Wooding, 1981).

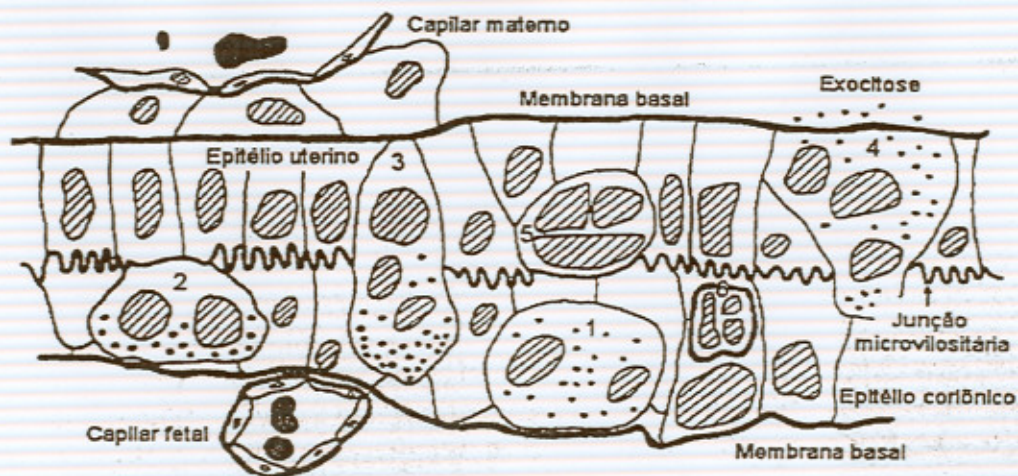


Figura 4 - Diagrama esquemático da migração das células binucleadas em caprinos. 1) Células binucleadas no lado fetal; 2) Contato com a junção microvilositária; 3) Fusão com células maternas, dando origem a células trinucleadas de vida curta; 4) Exocitose dos grânulos; 5) Células após exocitose, com citoplasma reduzido e núcleo denso e 6) Células reabsorvidas pelo trofotoderme (Adaptado de Wooding & Wathes, 1980).

Diversas funções têm sido atribuídas à migração das células trofoblásticas binucleadas. Em bovinos, o transporte dos produtos de secreção parece ser a principal finalidade de sua migração (Wooding & Wathes, 1980). Entretanto, deve-se salientar que a presença destas células na superfície materno-fetal também auxilia na imobilização dos dois epitélios, permitindo o desenvolvimento das interdigitações entre as microvilosidades coriônicas e criptas carunculares, que vão culminar com a formação dos placentomas. Em caprinos e ovinos, assim como em bovinos, a migração das células binucleadas, além de permitir o transporte dos produtos de secreção, tem o papel de manter o trofoblasto aderido ao tecido materno (Wooding, 1982).

Quanto aos produtos de secreção das células binucleadas, os mais conhecidos são a progesterona (Reimers et al., 1985b; Gross & Williams, 1988), prostaglandinas (Reimers et al., 1985b), hormônio lactogênio

placentário (PL; Verstegen et al., 1985; Wooding & Beckers, 1987, Morgan et al., 1989), proteínas específicas da gestação (PSPB; Reimers et al., 1985a; Eckblad et al., 1985) e glicoproteínas associadas à gestação (PAG; Zoli et al., 1992a).

2.5. *Estrutura placentária*

A placenta é um órgão altamente especializado, responsável pela proteção e pela realização das trocas fisiológicas que asseguram a respiração, nutrição e excreção dos produtos do feto (Martal & Cédart, 1991). Apesar das circulações uterina e fetal nunca estarem em contato direto, elas estão suficientemente próximas para garantir a passagem de nutrientes da mãe para o feto e a passagem dos produtos de secreção na direção oposta (Derivaux et al., 1988).

A topografia e estrutura da placenta variam de acordo com a espécie, dependendo diretamente do mecanismo pelo qual o embrião, por ocasião de seu desenvolvimento, permaneça na luz ou se implante intersticialmente na mucosa uterina (Martal & Cédart, 1991).

As placentas podem ser classificadas de acordo com diferentes critérios, dentre os quais, os mais importantes relacionam-se com as características da barreira materno-fetal (estrutura histológica), com o padrão das vilosidades coriônicas (estrutura anatômica) e com o grau de perda de tecido por ocasião do parto (Tabela 1).

A) Estrutura histológica

Em 1909, Grosser, citado por Björkman (1982), estabeleceu um sistema para a classificação de placentas de acordo com o número de camadas histológicas que separam a circulação materna da fetal, sendo esta atualmente a classificação mais empregada. De acordo com este tipo de classificação, quatro tipos de placenta podem ser distintos: placenta epiteliocorial, sindesmocorial, endoteliocorial e hemocorial (Figura 5).

A placenta epiteliocorial é o tipo de placenta encontrada nos eqüídeos, suínos e em alguns ruminantes (bovinos e caprinos). Este tipo caracteriza-se pela presença de 6 camadas histológicas interpostas entre as circulações materna e fetal. Os componentes fetais encontrados neste

Tabela 1 - Classificação das placentas em diferentes espécies mamíferas.

Espécies	Classificação		
	Barreiras materno-fetais	Padrão das vilosid. Coriônicas	Perda de tec. materno à parturição
Porca	Epiteliocorial	Difusa	Nenhuma (Não-deciduada)
Égua	Epiteliocorial	Difusa e microcotiledonária	Nenhuma (Não-deciduada)
Vaca, cabra	Epiteliocorial	Cotiledonária	Nenhuma (Não-deciduada)
Ovelha	Sindesmocorial	Cotiledonária	Nenhuma (Não-deciduada)
Gata, cadela	Endoteliocorial	Zonária	Moderada (Deciduada)
Mulher, macaca	Hemocorial	Discóide	Extensa (Deciduada)

Fonte: Jainudeen & Hafez, 1995a.

tipo de placenta são o endotélio dos capilares coriônicos, o tecido conjuntivo fetal e o trofoblasto. Os componentes maternos consistem basicamente em três camadas correspondentes na ordem inversa: epitélio uterino, tecido conjuntivo uterino e endotélio dos capilares maternos' (Björkman, 1982).

A placenta sindesmocorial é considerada por diversos autores como o tipo de placenta característico de ovinos e de algumas espécies de ruminantes selvagens (Björkman, 1982; Derivaux et al., 1988). Ela diferencia-se da placenta epiteliocorial pela inexistência do contato direto entre o epitélio coriônico e o epitélio uterino, sendo observado o contato apenas entre o epitélio coriônico e o tecido conjuntivo materno (Björkman, 1982; Jainudeen & Hafez, 1995a). Entretanto, mais recentemente, com a utilização de técnicas mais precisas de microscopia, evidenciou-se que neste tipo de placenta, o que ocorre realmente é a formação de um sincício materno pela migração de células coriônicas fetais. Por esta razão, o termo escolhido que melhor define este tipo específico de ligação materno-fetal passou a ser placenta sinepiteliocorial.

Classificação Histológica de Grosser

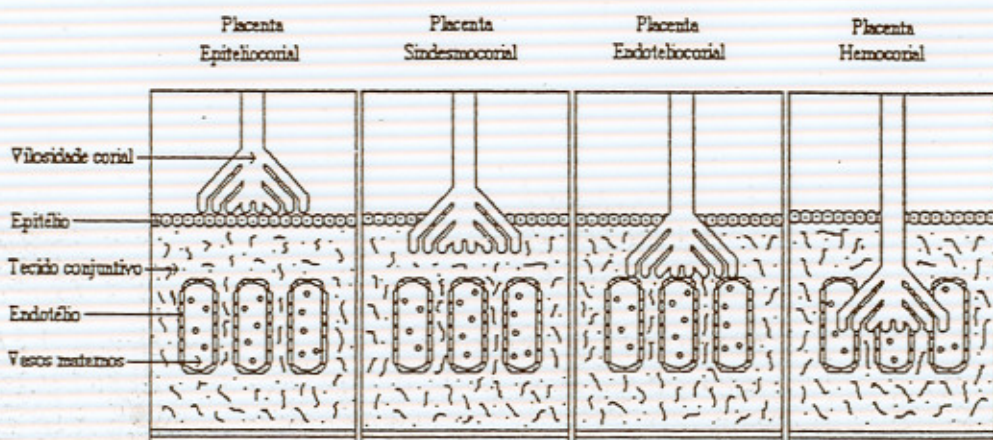


Figura 5 - Classificação da placenta de acordo com o número de camadas histológicas que separam as circulações materna e fetal.

A escolha deste termo tanto dá continuidade ao termo mais comumente empregado (sindesmocorial), como também engloba uma descrição anatômica mais precisa, eliminando a implicação da direta aposição do córion ao tecido conjuntivo materno (Wooding, 1992).

Por fim, quanto à classificação histológica, existem ainda dois tipos de placenta: endoteliocorial e hemocorial. A placenta endoteliocorial é o tipo de placenta encontrada nos carnívoros. Caracteriza-se pela exposição direta dos capilares maternos ao trofoblasto. A placenta hemocorial é o tipo de placenta característico da mulher, primatas e roedores. Ela caracteriza-se pelo contato direto entre o sangue materno e o trofoblasto (Jainudeen & Hafez, 1995a).

B) Estrutura anatômica

Anatomicamente as placentas são classificadas de acordo com a distribuição de vilosidades coriônicas na superfície do córion (Bazer et al., 1995). De acordo com essa classificação, as placentas podem ser difusas ou localizadas. A placenta difusa é caracterizada pela distribuição uniforme de vilosidades na superfície do córion. As placentas localizadas podem ser cotiledonárias (ruminantes), zonárias (carnívoros) ou discóides (primatas e roedores).

A placenta dos ruminantes é do tipo cotiledonário. A fixação do embrião ocorre ao nível de um restrito número de regiões arredondadas ou ovais. As vilosidades coriônicas fetais se interpõem em profundidade com a mucosidade uterina, sendo esta região denominada carúncula. Apesar de pouco visíveis, as carúnculas podem ser identificadas em fêmeas nulíparas por ocasião da puberdade, sendo entretanto muito mais visíveis em múltiparas. As áreas intercarunculares (áreas de aposição) permanecem glandulares durante toda a gestação, sendo também chamadas paraplacenta (Derivaux et al., 1988).

C) Perda de tecido por ocasião do parto

O tecido uterino encontra-se modificado em espécies que possuem placentas endoteliocorial e hemocorial, ocorrendo o descolamento de tecidos e hemorragia durante a parturição. As regiões uterinas desprendidas durante este processo são chamadas decídua, sendo as espécies que possuem estes tipos de placenta chamadas deciduadas (Bazer et al., 1995).

Em espécies que possuem placenta epiteliocorial, ao contrário, a parturição é facilmente completada devido à estrutura histológica envolvida. Nestas espécies, a parturição envolve simplesmente a separação das duas partes apostas da placenta, não havendo, portanto, perda de tecido materno. Como o tecido uterino é preservado, às espécies que possuem este tipo de placenta denomina-se adeciduadas (Derivaux. et al., 1988).

CAPÍTULO 3

Endocrinologia da gestação

3.1. Produção de esteróides durante a gestação

A progesterona tem um papel essencial ao estabelecimento e manutenção da gestação em mamíferos domésticos (Baird, 1992). Ela é necessária à manutenção do estado quiescente do miométrio ao longo da gestação (Cooke & Knifton, 1980), podendo também ter um papel relacionado à tolerância imunológica do embrião pela mãe ao estimular a síntese de fatores imunossuppressores (Hansen & Skopets, 1992).

A progesterona é produzida pelo corpo lúteo, pela placenta ou por ambos. Os ovários são as principais fontes de progesterona durante toda a gestação em suínos e caprinos (espécies corpo lúteo-dependentes). Em outras espécies, como em ovinos, eqüinos e bovinos, a produção de progesterona pela placenta torna-se cada vez maior, sendo a gestação mantida mesmo após ovariectomia a partir do 50º dia de gestação na ovelha e do 70º dia na égua (Martal & Cédart, 1991).

A síntese de estrógenos pela placenta durante a gestação também é verificada em determinados estágios de gestação (Gadsby et al., 1980).

A) Síntese de progesterona nos ovários

A síntese de progesterona nos ovários ocorre em uma estrutura altamente especializada chamada corpo lúteo. O corpo lúteo é composto por dois tipos celulares esteroideogênicos distintos: as pequenas e as grandes células luteínicas (Hafez, 1995b). Em bovinos, pequenas e grandes células luteínicas constituem aproximadamente 70% do volume do corpo lúteo, o qual comporta também células vasculares e células conjuntivas. As pequenas células luteínicas representam 26% do total de células encontradas no corpo lúteo, o que compreende aproximadamente 28% do seu volume total. As grandes células luteínicas, apesar de representarem apenas 3% do total das células encontradas no corpo lúteo, compreendem cerca de 40% do seu volume total (O'Shea et al., 1989).

Microscopicamente, ambos os tipos celulares se caracterizam por possuir um abundante retículo endoplasmático liso e um grande número de mitocôndrias, características comuns às células esteroidogênicas (Leymarie & Martal, 1991). A presença de um grande número de grânulos secretórios densos, contendo oxitocina em seu interior, também é observada a nível de grandes células luteínicas (Rodgers et al., 1983).

Um dos principais hormônios envolvidos no mecanismo de síntese de progesterona pelas células luteínicas ovarianas é o LH. O LH estimula a síntese de progesterona pelas pequenas células luteínicas, não tendo, entretanto, efeito direto sobre a produção deste hormônio pelas grandes células luteínicas (Baird, 1992).

O mecanismo de ação do LH resulta provavelmente da ativação da adenilato ciclase, uma enzima que aumenta o nível de AMP cíclico no citoplasma (Ollivier & Gall, 1991). A estimulação da síntese de progesterona pelo AMP cíclico intervém em alguns minutos, resultando em uma conversão acelerada do colesterol em pregnenolona ao nível de membrana interna das mitocôndrias (Leymarie & Martal, 1991).

⇒ *Mecanismo de síntese de progesterona a nível de ovário*

A progesterona, como todo hormônio esteróide, provém essencialmente do colesterol sangüíneo, livre ou esterificado, presente nas lipoproteínas de baixa (LDL) e de alta (HDL) densidade do plasma. Segundo descrito por Robel (1991), as principais lipoproteínas que penetram nas células luteais, ligando-se a receptores específicos situados na face externa da membrana plasmática, são as LDL. A fixação da LDL a seus receptores é seguida da internalização do conjunto em uma vesícula de paredes espessas, a qual dá origem ao endossoma. No interior do endossoma, onde o pH é ácido, ocorre a dissociação completa do complexo LDL-receptor, sendo o receptor reciclado (Ollivier & Gall, 1991). A separação entre o colesterol e a parte peptídica das lipoproteínas ocorre a nível de lisossoma, por ação da enzima colesterol ester hidrolase (CEH). O colesterol livre pode seguir dois caminhos: 1) ser esterificado a ácido graxo pela ação da acil colesterol acil transferase (ACAT), e armazenado em gotículas lipídicas no citoplasma, ou 2) ser transportado até a membrana interna das mitocôndrias, para ser convertido em

pregnenolona e, posteriormente, em progesterona (Robel, 1991; Figura 6).

B) Síntese de esteróides na placenta

A placenta é um órgão altamente especializado, podendo ser considerada como uma volumosa glândula endócrina, fonte de hormônios esteróides e de diversas proteínas, responsáveis, pelo menos em parte, pelo equilíbrio hormonal da gestação (Martal & Cédart, 1991). Dentre os principais hormônios esteróides produzidos pela placenta, podemos citar a progesterona e os estrógenos.

⇒ Produção placentária de progesterona

A placenta ovina secreta quantidades apreciáveis de progesterona a partir do 50º dia de gestação, assegurando, desta forma, a manutenção da gestação nesta espécie. Ela é produzida por cotilédones fetais ovinos de 45 a 55 dias (Koligian & Stormshak, 1976), a partir da pregnenolona. Em bovinos também observa-se a síntese "in vitro" de progesterona a partir de células binucleadas fetais (Reimers et al., 1985b; Gross & Williams, 1988). O mecanismo de síntese placentária de progesterona em bovinos parece ser diferente do verificado a nível de ovário, não havendo a síntese a partir do colesterol (Ulmann & Reimers, 1989).

⇒ Produção placentária de estrógenos

A placenta também é um local de síntese de estrógenos (Eley et al., 1979). A síntese de estrógenos começa no estágio de blastocisto (Gadsby et al., 1980), porém a importância de sua secreção varia com a espécie. Ela é apreciável na mulher e na porca (Perry et al., 1973; Gadsby et al., 1980), sendo reduzida durante a primeira metade da gestação em ruminantes. Durante este período, a taxa periférica permanece inferior a 1 ng/ml (Eley et al., 1979).

Em bovinos, os estrógenos são detectados desde o 33º dia no líquido fetal e ao 50º dia no líquido alantoideano. Durante a segunda metade da gestação, as taxas plasmáticas aumentam regularmente para alcançar um pique pouco antes do parto (Guilbault et al., 1985).

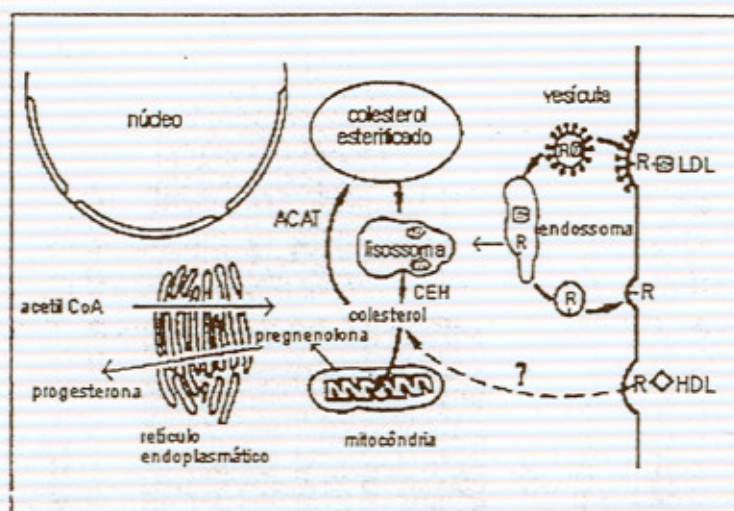


Figura 6 - Síntese de progesterona a nível de célula luteínica (Adaptado de Robel, 1991).

A biossíntese de estrógenos na placenta de ruminantes parece ser semelhante a que ocorre nos ovários. Isto foi verificado em experimentos realizados “in vitro” por Gross & Williams (1988), nos quais foi comprovada a síntese placentária de esteróides a partir da pregnenolona e androstenediona.

Quanto à sua função, tem sido suposto que os estrógenos de origem trofoblástica favoreceriam a irrigação local no momento da implantação (Fleet & Heap, 1982; Ford & Chenault, 1981).

C) Características dos perfis de progesterona

Em espécies corpo lúteo dependentes, as concentrações de progesterona observadas ao longo da gestação são mantidas em níveis semelhantes aos observados ao longo da fase luteal (Bazer et al., 1995).

Em caprinos, apesar das concentrações de progesterona tenderem a ser mais altas em gestações gemelares que em gestações simples, diferenças significativas entre ambos os grupos não foram verificadas (Thorburn & Schneider, 1972; Bosu et al., 1978). Isto foi comprovado pelos estudos de Jarrel & Dziuk (1991), nos quais foi observado que uma vez estabelecida a gestação, as concentrações de progesterona são

mantidas a um mesmo nível, independentemente do número de fetos ou do número de corpos lúteos presentes no ovário.

Em espécies onde a placenta assume a produção de progesterona, ao contrário do observado em caprinos, as concentrações de progesterona tendem a crescer ao longo da gestação, sendo as concentrações máximas observadas próximo ao parto (Delpino & González-Stagnaro, 1993). Isto foi comprovado por Ranilla et al. (1994), os quais observaram um aumento progressivo das concentrações de progesterona ao longo da gestação em ovinos das raças Churra e Merino.

3.2. Produção de proteínas placentárias

A placenta realiza uma série de funções, sendo responsável pela respiração, nutrição, excreção e defesa do feto (Martal & Cédart, 1991). Como órgão endócrino, a placenta sintetiza uma grande variedade de substâncias biologicamente ativas, das quais a maior parte de origem protéica (Bohn, 1985). As substâncias produzidas pela placenta, na maioria dos casos, são idênticas a produtos sintetizados por tecidos normais de indivíduos adultos. Em outros casos, entretanto, estes compostos são considerados substâncias específicas à gestação, não possuindo similares detectáveis em indivíduos não-gestantes (Gordon & Chard, 1979).

O estudo das substâncias produzidas pela placenta é de grande interesse tanto do ponto de vista da pesquisa fundamental, quanto da pesquisa aplicada. Do ponto de vista fundamental, o estudo das substâncias produzidas pela placenta constitui um excelente modelo para o estudo de uma grande variedade de tumores (Gordon & Chard, 1979). No que diz respeito à pesquisa aplicada, a mensuração dos hormônios e proteínas produzidos pela placenta tem possibilitado o desenvolvimento de métodos cada vez mais precoces e precisos de diagnóstico de gestação e de estudo da mortalidade embrionária.

A) Características da produção de proteínas placentárias

A proximidade entre o sangue materno e o trofoblasto, associada ao aumento da massa total do trofoblasto e do fluxo sanguíneo ao longo da gestação são fatores que estimulam a produção e a liberação de moléculas de proteína pela placenta (Chard & Grudzinskas, 1985). Em

algumas espécies, como nas que possuem placenta hemocorial, os níveis de proteínas placentárias específicas chegam a ser 100 a 1000 vezes maiores na circulação materna que na fetal. A hipótese mais provável para este fenômeno é a existência das barreiras representadas pela membrana basal e pelo endotélio capilar fetal entre o trofoblasto e o sangue fetal, enquanto nenhuma barreira é observada do lado materno (Figura 7).

Baseado nestas evidências e na possível existência de um transporte específico em direção à circulação materna, supõe-se que as proteínas placentárias poderiam ser produzidas e secretadas igualmente em qualquer parte do trofoblasto, sendo as suas concentrações reguladas por diversos fatores, dentre os quais um dos mais importantes consiste no número de barreiras interpostas entre a circulação materna e a fetal (Gordon & Chard, 1979).

B) Especificidade das proteínas placentárias

Estudos relacionados à especificidade das proteínas placentárias têm demonstrado uma grande analogia entre proteínas consideradas específicas e produtos normais da secreção de indivíduos adultos. Segundo Gordon & Chard (1979), apesar de, em alguns casos, estas proteínas não serem identificadas na circulação materna, existem diversas evidências que reforçam a hipótese de que todas as proteínas placentárias são produzidas em pequena quantidade em algum outro tipo de tecido não-placentário. A primeira é a observação da existência de síntese de proteínas placentárias por tumores, o que indica que o potencial para sua produção continua na vida adulta. Esta teoria, também chamada teoria da célula-tronco, baseia-se no fato de que, mesmo em indivíduos adultos, algumas linhagens de células indiferenciadas mantêm-se preservadas, sendo desta forma também conservado seu potencial para a produção de proteínas placentárias. A segunda evidência é a de que, com o desenvolvimento de dosagens radioimunológicas mais sensíveis, níveis detectáveis de proteínas placentárias têm sido encontrados em números cada vez maiores de indivíduos não-gestantes. Isto poderia representar a detecção do limite superior da concentração destas proteínas na circulação periférica de indivíduos normais não-gestantes (Gordon & Chard, 1979; Figura 8).

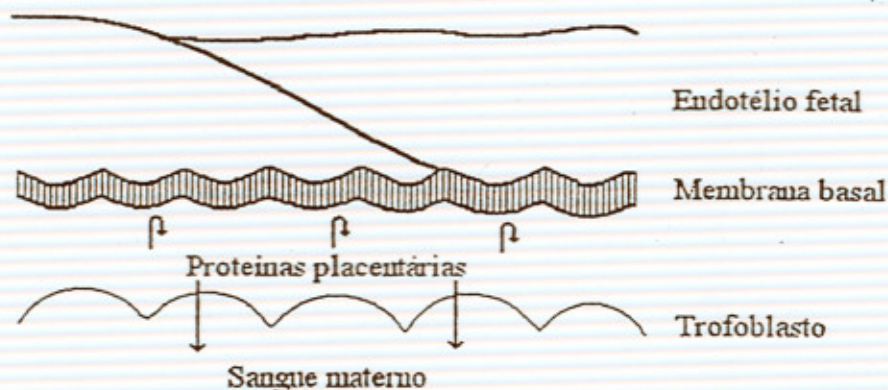


Figura 7 - A membrana basal constitui uma barreira à entrada de proteínas placentárias na circulação fetal. Em espécies com placenta hemocorial, não há barreiras entre o trofoblasto e o sangue materno, sendo as proteínas placentárias secretadas exclusivamente do lado materno (Gordon & Chard, 1979).

C) Produção de proteínas placentárias por tumores

Análises laboratoriais sensíveis têm revelado a produção de proteínas placentárias por um grande número de tumores não trofoblásticos. Estes achados têm contribuído para a elaboração da hipótese de que qualquer tipo de tumor poderia produzir um ou mais tipos de proteínas placentárias, sendo que o fato de uma proteína individual ser ou não encontrada dependeria somente do tipo de análise laboratorial empregada. Também é interessante observar que além de possuir a capacidade de sintetizar proteínas placentárias, as células tumorais também possuem características proliferativas semelhantes às das células trofoblásticas invasivas (Gordon & Chard, 1979).

D) Função das proteínas placentárias

Existem diversas hipóteses sobre a função das proteínas placentárias. Uma delas é a de que estas poderiam ter funções endócrinas, metabólicas e imunológicas (Gordon & Chard, 1979). Uma função endócrina relacionada à manutenção da gestação já foi bem demonstrada para o Interferon τ (IFN τ), uma proteína produzida pelo trofoblasto de bovinos, ovinos e caprinos (Bazer et al., 1994). Entretanto, para a grande

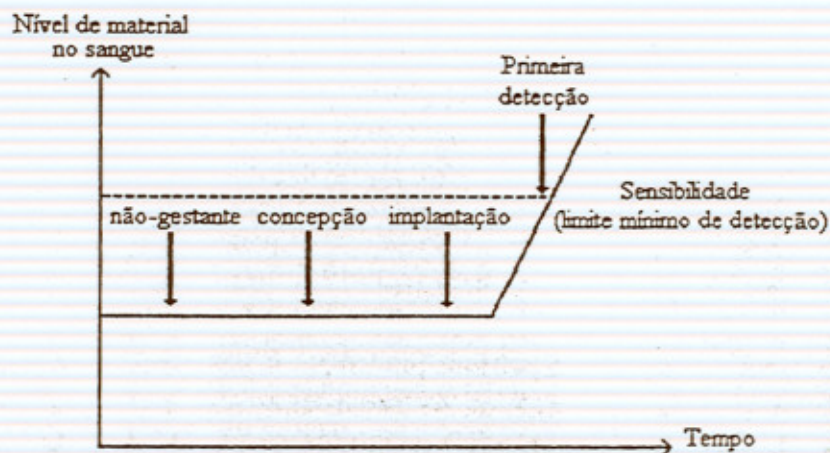


Figura 8 - Todas as proteínas placentárias estão presentes em baixas concentrações no sangue de indivíduos normais, não sendo, entretanto, detectáveis por dosagens comuns. Os níveis aumentam no momento da implantação, tornando-se detectáveis de acordo com a sensibilidade do método de dosagem empregada (Gordon & Chard, 1979).

maioria das proteínas placentárias, ainda não foi possível se demonstrar nenhuma atividade biológica essencial à mãe ou ao feto (Gordon & Chard, 1979).

3.3. Principais proteínas produzidas pela placenta

A) Gonadotrofinas Coriônicas:

A Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) foi um dos primeiros hormônios protéicos descobertos na placenta humana (Bohn, 1985). Como o nome indica, o hCG tem atividade gonadotrófica, estimulando a secreção de progesterona pelo corpo lúteo gravídico e, desta forma, contribuindo para a manutenção da gestação (Martal & Cédart, 1991).

Em éguas prenhes, um outro hormônio gonadotrófico foi identificado no soro. Este hormônio foi chamado Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) ou Gonadotrofina Sérica da Égua Prenhe (PMSG). O eCG representa o principal fator luteotrófico da égua, sendo

também responsável pela secreção inicial de progesterona pelo ovário (Derivaux et al., 1988).

A atividade biológica do hCG e do eCG apresenta analogia, respectivamente, com àquela dos hormônios hipofisários LH e FSH, sendo, por isso, mais usados comercialmente devido a seu baixo custo em relação ao das gonadotrofinas hipofisárias (Derivaux et al., 1988).

⇒ *Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)*

O hCG é uma glicoproteína placentária, produzida pelo sinciciotrofoblasto. Ele possui peso molecular de 38.400 daltons e pl entre 3,8 e 5,1, sendo composto de duas subunidades (α e β) não-covalentemente ligadas. A subunidade α é similar às subunidades α do LH porcino, ovino e humano. A subunidade β também é bastante similar à subunidade β do LH humano, possuindo 115 aminoácidos idênticos e 30 aminoácidos adicionais, localizados na extremidade carboxiterminal da seqüência (Bohn, 1985). Sua meia vida é de cerca de 8 horas, sendo consideravelmente maior que a do LH que é de 12 a 50 minutos (Derivaux et al., 1988). Na mulher, a síntese do hCG inicia-se aproximadamente no 8º dia após o pique pré-ovulatório de LH, aumentando continuamente durante os três primeiros meses de gestação para, em seguida, decrescer e manter-se a baixos níveis até a parturição (Martal & Cédart, 1991).

A imunização contra a subunidade β do hCG tem sido bastante utilizada para a produção de vacinas contraceptivas em mulheres (Stevens, 1979). Entretanto, ainda não se sabe se seu efeito se deve à inativação específica da molécula de hCG biologicamente ativa, ou a um efeito inespecífico do tipo complemento a nível do próprio trofoblasto (Bohn, 1985).

Quanto a seu uso em métodos de diagnóstico de gestação, pode-se afirmar que o desenvolvimento de métodos imunoquímicos específicos já foi extensivamente utilizada para o diagnóstico precoce da gestação em mulheres (Bohn, 1985).

⇒ *Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) ou Gonadotrofina Sérica da Égua Prenhe (PMSG)*

O eCG ou PMSG é a gonadotrofina coriônica específica da égua. Ele consiste em uma glicoproteína com um peso molecular de 64.000 daltons. Como o hCG, o eCG é composto por 2 subunidades (α e β), sendo a associação destas subunidades essencial para a sua atividade biológica. Sua meia-vida plasmática é de 4 a 6 dias, o que se deve provavelmente ao alto conteúdo de ácido siálico (10 a 13,5%) e ao comprimento da cadeia deste elemento (Derivaux et al., 1988).

O eCG é secretado pelas células trofoblásticas eqüinas (Allen & Moor, 1972) a partir do 40º dia de gestação, sendo seu pique alcançado entre o 50º e 70º dias. Ao contrário do observado para o hCG, a secreção de eCG ocorre somente até aproximadamente o 120º dia de gestação, não sendo mais detectável próximo à parturição (Derivaux et al., 1988).

⇒ *Gonadotrofina Coriônica Bovina (bCG)*

A Gonadotrofina Coriônica bovina (bCG) foi isolada inicialmente por Ailenberg & Shemesh (1983) a partir de cotilédones fetais bovinos, como sendo uma substância termolábil, com peso molecular de 60.000 daltons e com uma atividade biológica relacionada a do bLH. O bCG tem uma atividade biológica gonadotrófica, sendo de fundamental importância em espécies como a bovina, na qual o corpo lúteo é requerido para a manutenção da gestação.

Em estudos posteriores, Beckers et al. (1987) isolaram uma substância com atividade cerca de 400 vezes superior à daquela obtida por Ailenberg & Shemesh (1983). A substância purificada por estes autores possuía um peso molecular de 30.000 daltons, diferenciando-se do LH hipofisário por não possuir reação cruzada com o antisoro anti-bLH, apesar de uma reação cruzada entre o LH bovino e anticorpos anti-bCG ter sido verificada.

Entretanto, mais recentemente, chegou-se à conclusão de que esta substância, até então denominada bCG, constitui-se, na verdade, em uma nova glicoproteína conhecida atualmente como proteína bovina associada à gestação 2 (bPAG-2; Beckers, comunicação pessoal, 1997).

⇒ *Gonadotrofina Coriônica Ovina (oCG)*

Em ovinos, assim como em bovinos, foram observados que homogenatos de embriões ovinos de 13 a 15 dias prolongam a vida do corpo lúteo (Godkin et al., 1978). Estes autores demonstraram que estes homogenatos estimulam a produção de progesterona pelas células luteínicas cultivadas, tendo, portanto, uma atividade luteotrófica semelhantemente às demais gonadotrofinas coriônicas.

B) Hormônios Lactogênicos Placentários ou Somatotrofinas Coriônicas

O hormônio lactogênio placentário (PL), também chamado Somatotrofina Coriônica (CS), tem a função de manter a gestação, através de sua ação luteotrófica; de alterar o metabolismo materno, fornecendo os nutrientes necessários ao desenvolvimento fetal e, de ajudar no início da lactação (Bohn, 1985). Ele já foi identificado em diversas espécies, possuindo atividades lactogênica e somatotrófica, sendo, portanto, capaz de se ligar tanto aos receptores específicos da prolactina, quanto aos do hormônio de crescimento (Figura 9). Devido a estas características, o PL é considerado como pertencente a uma família híbrida entre ambos os hormônios (Martal & Cédart, 1991). A relação entre as atividades lactogênica ou somatotrófica do PL em diferentes espécies é mostrada na Figura 10.

⇒ *Hormônio Lactogênio Placentário Humano (hPL) ou Somatotrofina Coriônica Humana (hCS)*

O hPL é a mais abundante proteína solúvel produzida pela placenta, compreendendo aproximadamente 10% do total das proteínas produzidas (Derivaux et al., 1988). O hPL é uma proteína não-glicosilada, composta por 191 aminoácidos, assim como o hormônio de crescimento humano (hGH), e contendo duas pontes dissulfeto dentro da mesma cadeia. Seu peso molecular é de 22.300 daltons, existindo também formas poliméricas com altos pesos moleculares. Sua síntese pelas células do trofoblasto pode ser estimulada por diversas substâncias, dentre as quais podem ser citadas o ácido retinóico e o hormônio da tireóide (T₃; Stephanou & Handwerker, 1995).

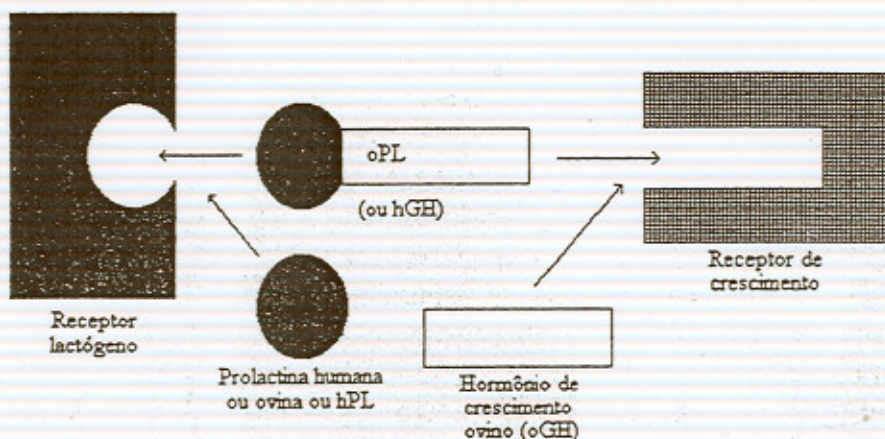


Figura 9 - Caráter bifuncional do hormônio lactogênio placentário ovino (oPL) e do hormônio do crescimento hipofisário humano (hGH) e caráter monofuncional (ligação a um só receptor do hormônio lactogênio placentário humano (hPL), das prolactinas (humana e ovina) ou do hormônio de crescimento humano (Martal & Cédart, 1991).

A estrutura primária do hPL é muito semelhante à do hGH, com o qual apresenta 96% de homologia e 85% dos aminoácidos idênticos. Quando comparado à família das prolactinas, entretanto, o hCG apresenta somente 67% de homologia, possuindo duas pontes de dissulfeto, em lugar das três pontes, observadas na prolactina (Martal & Cédart, 1991). *

A atividade mamotrófica e lactogênica do hPL é, em termos médios, equivalente àquela da prolactina (Shiu et al., 1973). O hPL tem atividade no metabolismo de lipídios, carboidratos e nitrogênio. Ele aumenta o metabolismo geral do tecido adiposo, provocando tanto lipólise quanto lipogênese, dependendo da circunstância. Na mulher gestante, ele age como um antagonista da insulina podendo ser responsável pela acidose diabética observada durante a gestação (Derivaux et al., 1988).

⇒ *Hormônio Lactogênio Placentário Bovino (bPL) ou Somatotrofina Coriônica Bovina (bCS)*

A constatação da existência de um hormônio com atividade lactogênica em cotilédones de vacas gestantes foi feita pela primeira vez

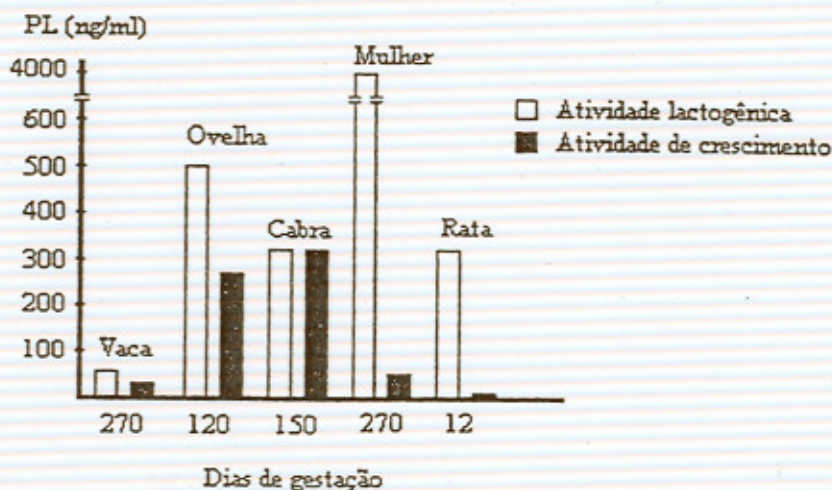


Figura 10 - Níveis séricos comparados dos hormônio Lactogênio Placentário em diferentes espécies (Adaptado de Martal & Cédart, 1991).

por Buttle & Forsyth (1976), através da co-cultura de tecido mamário de camundongos e tecido cotiledonário de vacas em diferentes estágios de gestação.

O isolamento e a identificação do hormônio lactogênio placentário bovino (bPL) ou somatotrofina coriônica bovina (bCS) foi feito pela primeira vez por Bolander & Fellows (1976). O hormônio purificado possuía atividade mamotrófica e somatotrófica, consistindo em uma proteína com peso molecular de 22.150 daltons e ponto isoelétrico de 5,9.

Beckers (1983) isolou um hormônio lactogênio placentário com peso molecular de 33.000 daltons e ponto isoelétrico de 5,2. Este hormônio mostrou-se perfeitamente homogêneo por eletroforese em gel de poliácridamida, sendo bem mais homogêneo que o purificado por Bolander & Fellows (1976).

O radioimunoensaio desenvolvido para o bPL por Beckers et al. (1982) demonstrou que não há reação cruzada entre bPL, prolactina e hormônio do crescimento. Este achado confirma que na espécie bovina, o hormônio placentário tem uma estrutura muito diferente daquela dos hormônios hipofisários (bPRL e bGH).

O bPL é secretado pelos grânulos e sacos do aparelho de Golgi das células binucleadas (Duello et al., 1985; Wooding & Beckers, 1987), sendo detectado no sangue materno a partir do 26º dia de gestação. Os níveis maternos de bPL aumentam progressivamente, alcançando valores de 1 a 2 ng/ml próximo ao parto (Beckers, 1983).

As concentrações plasmáticas maternas de bPL durante a gestação são influenciadas por diversos fatores, dentre os quais podem ser citadas a raça do feto e a raça das fêmeas doadoras e receptoras de embriões (Guilbault et al., 1988).

As concentrações plasmáticas fetais de bPL são muito superiores às maternas (Beckers, 1983), o que indica sua secreção essencialmente no sangue fetal. A concentração plasmática fetal de bPL é relativamente alta (20 a 30 ng/ml) da 8ª a 10ª semanas de gestação. Ela cai progressivamente com o aumento da idade chegando a aproximadamente 5 ng/ml antes do nascimento (Beckers, 1983).

⇒ *Hormônio Lactogênio Placentário Ovino (oPL) ou Somatotrofina Coriônica Ovina (oCS)*

A presença de um hormônio com atividade lactogênica e somatotrófica foi detectada pela primeira vez no sangue de ovelhas gestantes por Kelly et al. (1974).

O oPL é uma haloproteína com peso molecular de 22.000 daltons e um ponto isoelétrico entre 6,8 e 8,8 (Chan et al., 1976), secretada pelas células binucleadas de ovelhas gestantes (Reddy & Watkins, 1978). Assim como o bPL, o oPL também foi identificado nos grânulos e aparelho de Golgi das células binucleadas do epitélio feto-coriônico e nos grânulos do sincício materno (Wooding, 1981). A presença constante destes grânulos no sincício e o fato de que não há divisão celular a este nível mostra, como sugerido por Wooding & Wathes (1980), que o sincício é formado pela migração e fusão das células binucleadas.

O oPL é demonstrado nos extratos placentários a partir do 20º dia de gestação (Chan et al., 1978), podendo ser detectável na circulação materna a partir do 48º dia de gestação. Os níveis séricos de oPL aumentam gradativamente para alcançar um pique entre o 131º e 141º dias de gestação. Após este pique, os níveis de oPL caem

progressivamente, não sendo mais detectável no período próximo ao parto.

A secreção do oPL é proporcional ao número de fetos (Martal & Djiane, 1977), podendo ser utilizada para identificar gestações gemelares e, desta forma, prevenir casos de toxemia da gestação em ovinos.

⇒ *Hormônio Lactogênio Placentário Caprino (cPL) ou Somatotrofina Coriônica Caprina (cCS)*

A presença de uma substância com atividade somatotrófica e lactogênica no soro de cabras gestantes foi identificada inicialmente por Buttle et al. (1972).

O cPL é uma proteína com peso molecular de 22.500 daltons e ponto isoelétrico de 8,35. Ele é secretado pelas células trofoblásticas de caprinos na circulação materna, sendo detectado também no fluido amniótico (Currie et al., 1990).

O desenvolvimento de um radioimunoensaio sensível permitiu a detecção do cPL a partir do 44º dia de gestação (Currie et al., 1990), sendo observado um aumento contínuo com o avançar da gestação e um decréscimo 1 semana antes do parto (Card et al., 1988). Após o parto, concentrações de cPL tornam-se indetectáveis em aproximadamente 18 horas (Currie et al., 1990). Uma correlação positiva entre o número de fetos e a concentração plasmática de cPL também foi observada no terço final da gestação (Hayden et al., 1979; Hayden et al., 1980; Card et al., 1988).

Assim como outros hormônios lactogênio placentários, o cPL não apresentou reação cruzada com extratos de hipófise, com prolactina ou com o hormônio do crescimento parcialmente purificado (Currie et al., 1990).

C) Proteínas Associadas com o Sinal Embrionário

1) Fator Precoce da Gestação (EPF)

O EPF é um fator precoce de gestação detectado no sangue materno de diversas espécies, dentre as quais ovinos (Morton et al., 1979;

Nancarrow et al., 1981), camundongos (Cavanagh, 1984) e suínos (Morton et al., 1983). Ele foi identificado em ovinos por Morton et al. (1979), sendo detectado no sangue materno desta espécie apenas 1 hora após a fecundação (Nancarrow et al., 1981).

O papel fisiológico do EPF ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se apenas que ele não impede a luteólise, não sendo responsável pela manutenção do corpo lúteo e da gestação (Nancarrow et al., 1981). Seu efeito parece estar mais associado a propriedades imunossupressoras que permitem a tolerância imunológica do embrião por sua mãe (Morton et al., 1979).

O aparecimento do EPF é anterior ao de proteínas placentárias trofoblásticas como o Interferon τ (Martal et al., 1979; Godkin et al., 1982; Helmer et al., 1987), a PSPB (Sasser et al., 1986) e a PAG (Zoli et al., 1992b). Seu uso no diagnóstico de gestação pelo teste de inibição de rosetas constitui-se no mais precoce método diagnóstico, permitindo a diferenciação entre casos de não fecundação e mortalidade embrionária precoce (Morton et al., 1979). Entretanto, apesar das altas sensibilidade e especificidade do teste, a dificuldade em sua execução não permite seu uso como método de rotina (Koch et al., 1983).

II) *Interferon Tau (IFN τ)*

A existência de uma proteína com atividade antiluteolítica, produzida pelo trofoblasto de ruminantes foi descrita pela primeira vez por Martal et al. (1979). Esta proteína foi isolada a partir de células do trofoblasto, sendo por isto inicialmente chamada trofoblastina ou proteína trofoblástica (Godkin et al., 1984a; Godkin et al., 1988). Entretanto, com a comprovação de que esta proteína apresentava grande homologia com algumas classes de interferons (Stewart et al., 1987; Imakawa et al., 1987), o termo escolhido para descrever este grupo de proteínas passou a ser interferon τ (IFN τ ; Roberts et al., 1992).

O IFN τ secretado pelo trofocotoderme de conceptos bovinos, ovinos e caprinos é um sinal de reconhecimento da gestação. Ele consiste em um hormônio antiluteolítico parácrino que age no epitélio uterino para inibir a liberação de PGF_{2 α} , assegurando desta forma a manutenção de um corpo lúteo funcional (Bazer et al., 1994).

⇒ *Interferon Tau ovino (oIFN τ)*

O Interferon τ ovino (oIFN τ) foi purificado inicialmente por Godkin et al. (1982) a partir de blastocistos ovinos de 13 a 21 dias. Ele possui um peso molecular de 17.000 daltons e um ponto isoelétrico de 5,5 (Godkin et al., 1982), sendo produzido por células trofoblásticas do 12^o ao 21^o dias de gestação (Martal et al., 1979; Godkin et al., 1982). Sua secreção máxima ocorre entre o 15^o e o 16^o dias de gestação, período que corresponde ao início da implantação (Roberts et al., 1992).

A administração de oIFN τ no útero de ovelhas do 10^o ao 12^o dia do ciclo estral prolonga a vida do corpo lúteo em dias e até meses (Martal et al., 1979; Ellinwood et al., 1979; Heyman et al., 1984; Godkin et al., 1984b; Haridon et al., 1995). Como descrito por Bazer (1989), o oIFN τ age provavelmente por intermédio de receptores situados entre as células do epitélio e do estroma do endométrio, diminuindo a atividade das enzimas implicadas na síntese de PGF_{2 α} (Salamonsen et al., 1994).

⇒ *Interferons Tau bovinos (bIFN τ)*

A existência de uma proteína produzida pelo trofoblasto de conceptos bovinos de 17 a 19 dias, capaz de prolongar a vida do corpo lúteo bovino, foi descrita pela primeira vez por Northey & French (1980). Esta proteína demonstrou ter atividade luteotrófica, sendo capaz de estimular a síntese de progesterona por células luteínicas bovinas (Beal et al., 1981; Hickey & Hansel, 1987). Posteriormente, duas formas desta proteína foram isoladas e purificadas a partir de cultura de células trofoblásticas provenientes de conceptos bovinos de 17 a 18 dias de idade. Estas duas proteínas possuíam pesos moleculares de 20.000 e 22.000 daltons e pontos isoelétricos de 6,5 e 6,7, respectivamente, sendo inicialmente chamadas proteínas trofoblásticas bovinas I e II (bTPI e bTPII; Helmer et al., 1987).

Este grupo de proteínas purificadas a partir do trofoblasto bovino, assim como o oIFN τ , mostrou ter atividade antiviral semelhante a dos interferons (Godkin et al., 1988), sendo por isso chamadas IFN τ bovino (bIFN τ).

O bIFN τ é imunologicamente semelhante ao oIFN τ , sendo a principal proteína produzida por conceptos bovinos entre os dias 16 e 24 de gestação (Helmer et al., 1985). Ele inibe a secreção de prostaglandina F (PGF) e aumenta a secreção de prostaglandina E (PGE), de maneira a prevenir a luteólise e assegurar o estabelecimento da gestação (Helmer et al., 1988).

⇒ *Interferon Tau caprino (cIFN τ)*

A existência de uma proteína de peso molecular 17.000 daltons, capaz de prolongar a vida do corpo lúteo caprino foi verificada inicialmente por Gnatek et al. (1989). Esta proteína foi isolada a partir de conceptos caprinos de 16 a 18 dias de idade, mostrando, assim como outras classes de interferons, ser capaz de inibir a proliferação de linfócitos, possuindo ainda reação cruzada com anticorpos policlonais anti-oIFN τ (Newton et al., 1996).

D) *Proteína Específica da Gestação B (PSPB)*

Estudos iniciais sobre glicoproteínas específicas ou associadas à gestação foram realizados por Butler et al. (1982), com o isolamento a partir de extratos de membrana de fetos bovinos, de duas proteínas denominadas Pregnancy Specific Protein A e B (PSPA e PSPB). A PSPA foi identificada como uma α -fetoproteína e a PSPB como uma proteína específica da placenta.

A PSPB é uma glicoproteína ácida, com peso molecular de aproximadamente 78.000 daltons e um ponto isoelétrico entre 4 e 4,4 (Sasser et al., 1989). Ela possui um certo grau de reação cruzada com o LH e o FSH, não possuindo, entretanto, reações cruzadas com as gonadotrofinas coriônicas humana (hCG) e equina (eCG), prolactina, tireotrofina ou hormônio do crescimento (Sasser et al., 1986).

A PSPB possui uma meia-vida de aproximadamente 7,3 dias (Ruder & Sasser, 1986; Kirakofe et al., 1993), apresentando propriedades imunossupressoras, o que poderia indicar uma possível contribuição desta proteína na manutenção da gestação (Dumbar et al., 1990).

Antígenos imunologicamente relacionados à PSPB foram identificados em animais domésticos como bovinos (Ivani et al., 1984;

Sasser et al., 1986; Beckers et al., 1988), ovinos (Ruder et al., 1984) e caprinos (Humblot et al., 1990), assim como em animais silvestres como o cabrito montês (*Oreamnos americanus*; Houston et al., 1986), o boi almiscarado (*Ovibos moschatus*; Rowell et al., 1989), o bisão (*Bison bison*; Haigh et al., 1991), o alce (*Alces alces*; Haigh et al., 1993) e o gamo (*Dama dama*; Wilker et al., 1993).

Pouco se sabe sobre a seqüência de aminoácidos da PSPB. Apesar disso, o desenvolvimento de uma dosagem radioimunológica específica (Sasser et al., 1986) tem permitido sua utilização em métodos de diagnóstico de gestação (Ruder et al., 1984; Ivani et al., 1984; Maurer et al., 1985; Ruder et al., 1988; Humblot et al., 1988a) e de estudo da mortalidade embrionária em ruminantes (Humblot et al., 1988b; Dobson et al., 1993).

Em bovinos, concentrações periféricas de PSPB podem ser detectadas em alguns animais a partir do 15º dia de gestação e em todos os animais somente a partir do 24º dia (Sasser et al., 1986). Nesta espécie, os níveis séricos de PSPB aumentam gradativamente durante a gestação (Sasser et al., 1986), sendo o mais rápido aumento verificado imediatamente antes do parto, quando as concentrações atingem seu nível máximo (495 ± 87 ng/ml). Em caprinos, ao contrário, concentrações máximas de PSPB foram verificadas entre o 107º e 121º dias de gestação, caindo lentamente até a parturição (Humblot et al., 1990).

Quanto aos fatores que influenciam as concentrações periféricas de PSPB, os principais são o período de gestação (Sasser et al., 1986), o número (Humblot et al., 1990; Patel et al., 1995) e a raça dos fetos (Willard et al., 1995).

E) Proteínas Associadas à Gestação (PAG)

A PAG foi inicialmente identificada como sendo um antígeno placentário presente nos extratos cotiledonários bovinos e detectável no soro de vacas gestantes (Zoli et al., 1991). Posteriormente, antígenos sorologicamente semelhantes também foram encontrados no soro de ovinos (Ranilla et al., 1994) e caprinos (Benitez Ortiz, 1992), sendo seu estudo de grande interesse pela possibilidade de sua utilização como método alternativo de diagnóstico de gestação em espécies ruminantes.

As principais características físico-químicas da PAG, assim como os aspectos referentes à sua utilização em métodos de diagnóstico de gestação e de estudo da mortalidade embrionária serão descritos a seguir.

1) Características físico-químicas da PAG

As PAGs são um grupo de glicoproteínas pertencentes à família das proteases aspárticas, secretadas pelo epitélio coriônico de ungulados (Xie et al., 1996). Elas apresentam uma grande homologia com as proteases aspárticas, no que concerne tanto à sua seqüência de aminoácidos, quanto, mais particularmente, à sua estrutura ao nível de região do sítio ativo (Xie et al., 1991a).

Diversas formas de PAG foram identificadas e caracterizadas nas espécies bovina (Zoli et al., 1991; Xie et al., 1994), ovina (Zoli et al., 1995) e suína (Szafranska et al., 1995), sendo possível verificar a existência desta proteína também em caprinos (Benitez Ortiz, 1992) e cervos (*Odocoileus virginianus*; Osburn et al., 1996), apesar da inexistência de dados a cerca de suas características físico-químicas. As principais formas de PAG conhecidas atualmente serão descritas a seguir.

⇒ PAG bovina (bPAG)

Atualmente são reconhecidas duas formas de PAG em bovinos: a PAG-1 bovina (bPAG-1; Zoli et al., 1991), e a PAG-2 bovina (bPAG-2; Xie et al., 1994).

→ bPAG-1

A bPAG-1 foi purificada e caracterizada em todos os seus aminoácidos constituintes por Zoli et al. (1991), sendo identificada por Xie et al. (1991a) como um antígeno específico à gestação. Trata-se de uma glicoproteína ácida, enzimaticamente inativa (Xie et al., 1991a), constituída por 380 aminoácidos, contendo aproximadamente 10% de carboidratos e 1% de ácido siálico (Zoli et al., 1992b).

Como mostrado na Tabela 2, a bPAG-1 apresenta-se sob quatro isoformas diferentes, com pontos isoelétricos distintos e imunorreatividades decrescentes da forma mais básica à mais ácida (Zoli et al., 1991). Uma possível explicação para a redução da

Tabela 2 - Características físico-químicas e imunorreatividade das 4 isoformas da bPAG.

Isoforma	PM	PI	Concentração (Média ± DP)		Imuno-reatividade (%)
			Carboidratos (%)	Ácidos siálicos (%)	
I	67.000	5.4	10,02 ± 1,09	0,29 ± 0,06	100
II	67.000	5.2	10,02 ± 1,09	0,64 ± 0,08	40
III	67.000	4.8	10,02 ± 1,09	0,83 ± 0,08	20
IV	67.000	4.4	10,02 ± 1,09	2,12 ± 0,31	9

Fonte: Zoli (1992a)

imunorreatividade seria a de que a presença de ácido siálico na molécula influenciaria desfavoravelmente seu reconhecimento por anticorpos, reduzindo desta forma sua imunorreatividade (Zoli, 1992a).

Quanto à possível reação cruzada com outros hormônios, nenhuma reação foi observada entre a bPAG-1 e os hormônios gonadotrópicos e placentários bLH, pFSH, bPL, hCG e eCG. Reações cruzadas também não foram observadas com a alfa-fetoproteína (AFP) ou com a albumina séricas bovina (BSA) e ovina (OSA; Zoli et al., 1991).

A bPAG-1 é sintetizada pelas células trofoblásticas binucleadas (Zoli et al., 1992a), estocada em grânulos amorfos presentes no citoplasma e liberada na circulação materna por exocitose ou por degenerescência das células, após sua migração e fusão com uma célula epitelial uterina (Wooding, 1992). Fontes extra-placentárias de PAG também foram descritas, tendo sido encontradas no soro e em extratos ovarianos de fêmeas não-gestantes, nos extratos testiculares de carneiros e de touros (Zoli, 1992b).

→ bPAG-2

A bPAG-2, identificada por Xie et al. (1994), é produzida tanto por células mononucleadas do trofoblasto, quanto por células binucleadas. A expressão da bPAG-2 foi detectada inicialmente no 17^º

dia de gestação (início da implantação), continuando ao longo de toda a gestação (Xie et al., 1992). A bPAG-2 é sintetizada em cultura de tecidos placentários sob uma forma de peso molecular de 70.000 daltons, sendo progressivamente convertida em formas de menor peso molecular (Xie et al., 1994).

Ambas as bPAGs (bPAG-1 e bPAG-2) diferem consideravelmente em sua seqüência de aminoácidos (58% de identidade; Xie et al., 1992), exibindo entretanto diversas características físicas e químicas semelhantes (Xie et al., 1994). Aparentemente, ambas as bPAGs são sintetizadas sob a forma de grandes moléculas precursoras, que, em seguida, são convertidas em formas de baixo peso molecular (Xie et al., 1994), assim como observado para a PAG ovina (Xie & Nagel, 1993). Entretanto, o significado desta diferença entre o peso molecular da forma precursora e o da forma final permanece desconhecido.

⇒ *PAG ovina (oPAG)*

A PAG ovina (oPAG-1), constitui um outro subtipo de protease aspártica, possuindo aparentemente um centro catalítico inativo, tal como a bPAG-1 (Xie et al., 1991b). Ela foi isolada e parcialmente caracterizada por Zoli et al. (1995), sendo constituída por 382 aminoácidos e possuindo um peso molecular de 43.000 a 67.000 daltons. A oPAG-1 é detectada inicialmente sob a forma de 67.000 daltons, sendo gradualmente convertida em formas de menor peso molecular (47.000 daltons; Xie & Nagel, 1993; Xie et al., 1996).

A oPAG-1 possui aproximadamente 73% de identidade em sua seqüência de aminoácidos com a bPAG-1 (Xie et al., 1991b), localizando-se, assim como a bPAG-1, nas células binucleadas do trofoblasto (Xie et al., 1991a). Nenhuma reação cruzada foi observada entre a oPAG-1 e as proteínas OSA, AFP, oPL e oIFN τ (Zoli et al., 1995).

⇒ *PAG porcina (pPAG)*

Recentemente, foram descritas mais duas formas de PAG: a PAG-1 e a PAG-2 porcinas (pPAG-1 e pPAG-2). Ambas as proteínas possuem 63,9% de homologia em suas seqüências de aminoácidos

(Tabela 3), sendo expressas a nível de genoma do trofocitoderme de suínos no período inicial de gestação (Szafranska et al., 1995).

As cadeias de DNA da pPAG-1 e pPAG-2 codificam polipeptídeos de 389 e 387 aminoácidos, respectivamente. Assim como as demais PAGs, a pPAG-1 apresenta-se como uma forma enzimaticamente inativa, enquanto a pPAG-2 conserva uma seqüência de aminoácidos idêntica a da pepsina em seu sítio ativo (Szafranska et al., 1995).

II) Dosagem radioimunológica da PAG

A produção de anticorpos específicos contra frações altamente purificadas de bPAG permitiram o desenvolvimento de uma dosagem radioimunológica sensível e específica para bovinos (Zoli et al., 1992b). Neste tipo de dosagem (homóloga), todos os reagentes foram preparados a partir da bPAG purificada, resultando em uma sensibilidade de 0,2 ng de PAG/ml. Posteriormente, a obtenção de uma proteína semi-purificada em ovinos (Zoli, 1992a) possibilitou a produção de um anti-soro mais específico ao desenvolvimento de uma dosagem para pequenos ruminantes. Neste tipo de dosagem (heteróloga), parte dos reagentes eram provenientes da bPAG purificada, e a outra parte da oPAG parcialmente purificada. A sensibilidade obtida para a dosagem heteróloga foi de aproximadamente 4,0 ng de PAG/ml (Ranilla et al., 1994).

Os sistemas de dosagem descritos na literatura também mostraram-se bastante específicos e precoces (Zoli et al., 1992b), permitindo a identificação da PAG na circulação periférica de fêmeas gestantes a partir do 22º dia de gestação na vaca (Zoli, 1992a) e do 20º - 24º dias em cabras e ovelhas (Benitez Ortiz, 1992). As concentrações periféricas maternas de PAG, além de influenciadas pelo ambiente materno (espécie e raça), são controladas também pelo genótipo fetal (sexo e raça do feto; Guilbault et al., 1991).

Concentrações de PAG também foram detectadas no soro de fetos bovinos, tendo sido observada uma acentuada influência da idade sobre estas concentrações (fetos jovens apresentaram concentrações superiores a de fetos mais velhos). Essas concentrações mais elevadas nos fetos jovens poderiam ser devidas tanto a uma migração mais intensa das células binucleadas, quanto à diluição da proteína em um volume

Tabela 3 - Percentagem de identidade na seqüência de aminoácidos entre a pPAG-1, pPAG-2 e outros membros da família das proteases aspárticas.

Protease aspártica	PPAG-1	pPAG-2	Referência
pPAG-1	100,0	63,0	Szafranska et al., 1995
pPAG-2	63,9	100,0	Szafranska et al., 1995
bPAG-1	48,6	54,0	Xie et al., 1991a
bPAG-2	50,0	57,0	Xie et al., 1992
oPAG-1	47,8	53,0	Xie et al., 1991a

sangüíneo fetal menor. Após o nascimento, as concentrações neonatais de PAG desaparecem rapidamente da circulação (Zoli, 1992a).

No que diz respeito a perfis plasmáticos ou sorológicos de PAG durante toda a gestação, estes já foram descritos em bovinos de corte e de leite (Zoli et al., 1992b; Figura 11), em caprinos da raça Blanca-Celtibérica (Benitez Ortiz, 1992; Figura 12) e em ovinos das raças Assaf (Ranilla et al., 1997), Churra e Merino (Ranilla et al., 1994; Figuras 13A e 13B).

Em bovinos, concentrações sorológicas de PAG aumentam progressivamente ao longo da gestação, sendo as maiores concentrações, ($2462,42 \pm 1017,88$ ng/ml) observadas 1 a 5 dias antes do parto. Após o parto, os níveis decrescem regularmente, sendo indetectáveis somente aos 100 ± 20 dias pós-parto (Zoli et al., 1992b). Em caprinos (Benitez Ortiz, 1992) e ovinos das raças Churra e Merino (Ranilla et al., 1994), entretanto, não foi observada nenhuma tendência a um aumento contínuo das concentrações de PAG ao longo da gestação.

III) Diagnóstico de gestação por dosagem radioimunológica de PAG

O diagnóstico de gestação por dosagem de PAG baseia-se na sua identificação na circulação periférica materna (Zoli et al., 1992b), sendo recomendável a partir do 34º dia de gestação na vaca e, do 26º a 28º dias em cabras e ovelhas (Benitez Ortiz, 1992).

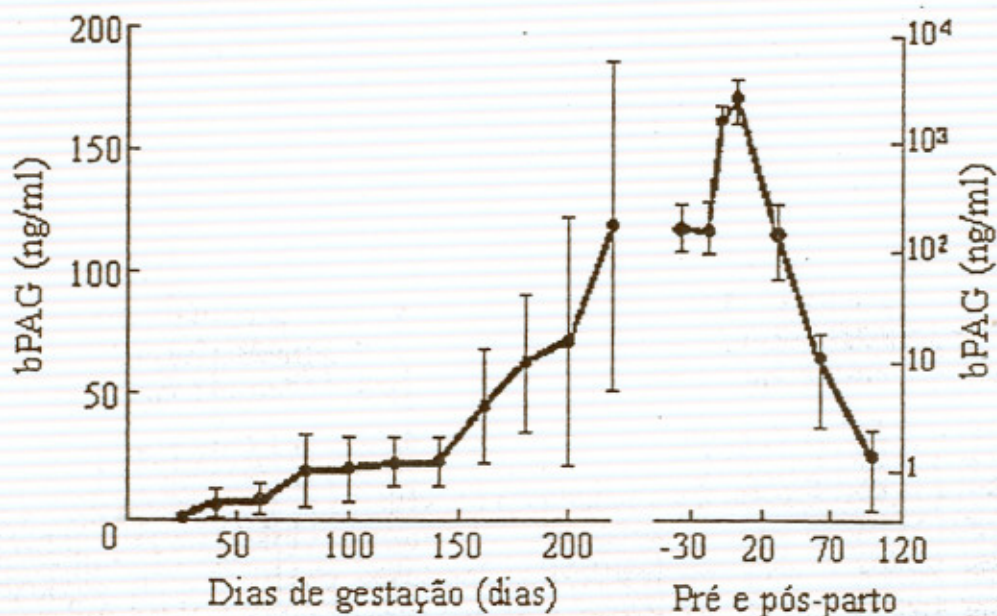


Figura 11 - Perfil de PAG ao longo da gestação e no período pós-parto em bovinos (média \pm DP; Zoli et al., 1992b).

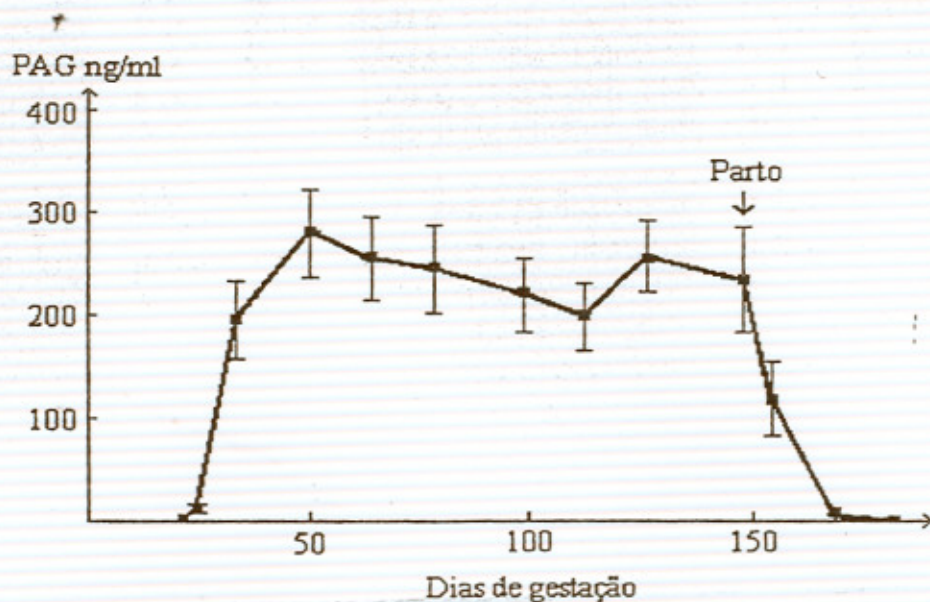


Figura 12 - Perfil de PAG em caprinos da raça Blanca Celtibérica (média \pm EP; Benitez Ortiz, 1992).

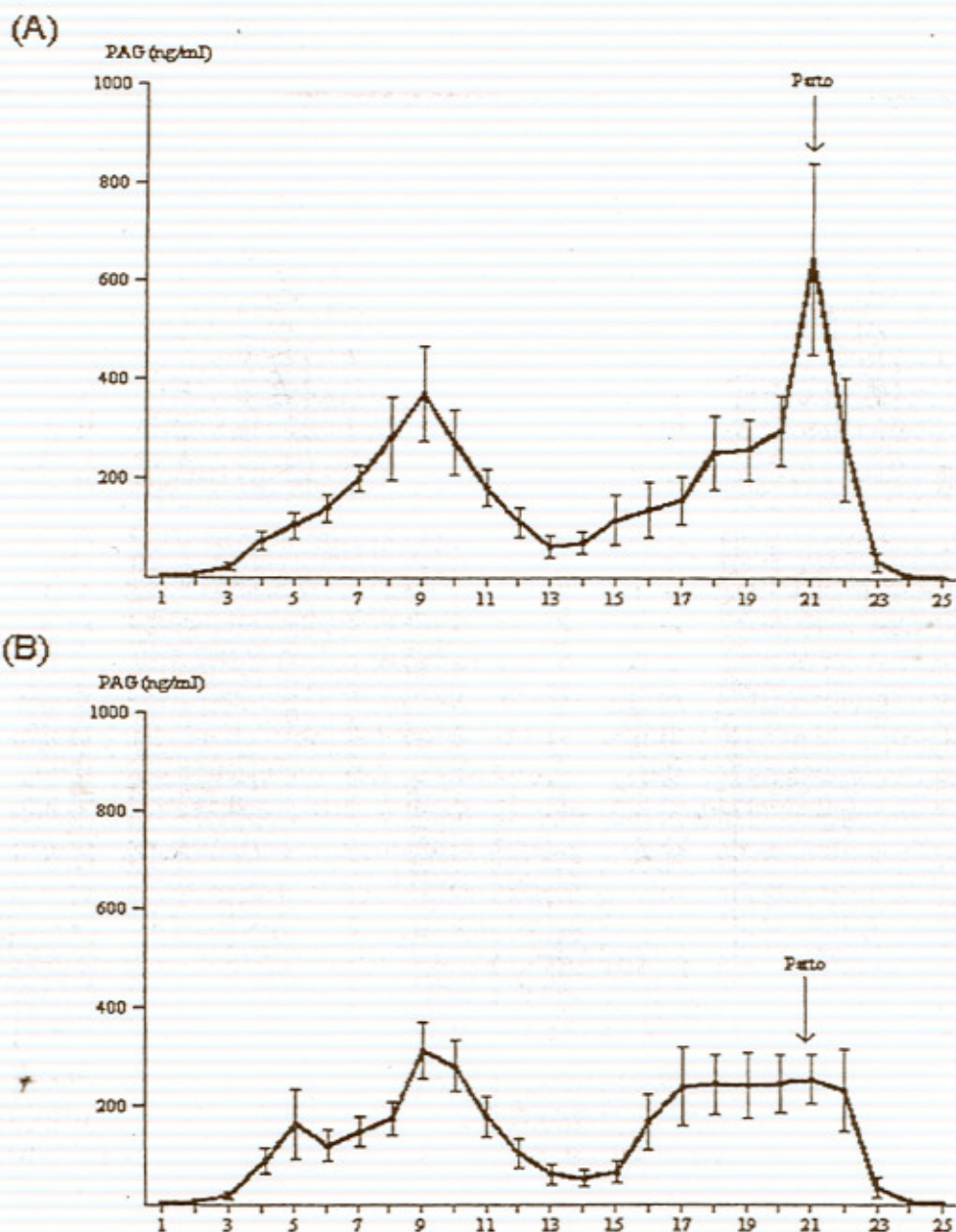


Figura 13 - Perfil de PAG (média \pm DP) ao longo da gestação em ovinos das raças Churra (A) e Merino (B; Ranilla et al., 1994).

A Tabela 4 mostra a precisão da dosagem de PAG como método de diagnóstico de gestação em bovinos, ovinos e caprinos. Apesar de em caprinos e ovinos o sistema de dosagem utilizado ser heterólogo, foram observados excelentes resultados em termos da detecção de animais com diagnóstico positivo e negativo, sendo, entretanto, necessária a realização de dosagens em maior número de animais para confirmar os resultados obtidos em ambas as espécies.

IV) Conservação da PAG no soro ou plasma e sua degradação “in vitro”

Estudos comparativos sobre a conservação da PAG em amostras de soro ou plasma refrigeradas e centrifugadas no período de 0 a 5 dias após a coleta do sangue, mostraram que as concentrações plasmáticas obtidas nos dias 0, 1, 2, 4 e 5 foram ligeiramente diferentes. Para ambas as amostras (soro ou plasma) foi observado que a taxa de bPAG aumenta de maneira significativa nos 2 primeiros dias pós-coleta, começando a cair no 3º dia. No 4º dia, a queda das concentrações de PAG acelera-se, sendo os valores encontrados inferiores ao do dia da coleta. No 5º dia, apesar de um discreto aumento nas concentrações de PAG, observa-se que a mesma mantém-se ainda inferior ao valor inicialmente encontrado (Figura 14; Bisson, 1992). Uma possível explicação para este aumento nas concentrações de PAG nos 2 primeiros dias pós-coleta seria a redução na quantidade de ácido siálico entre diferentes isoformas de PAG, uma vez que quanto menor o conteúdo em ácido siálico, maior a imunorreatividade da PAG (Zoli, 1992a).

No que se refere à conservação à temperatura ambiente, foi observado que a PAG pode conservar-se em níveis detectáveis por até 10 dias após a coleta de sangue em tubo não-heparinizado, sem prévia centrifugação (Benitez Ortiz, 1992). Isto abre boas perspectivas em termos de seu uso no diagnóstico de gestação a nível de campo.

Tabela 4 - Precisão da dosagem de PAG como método de diagnóstico de gestação (DG+) e de não-gestação (DG-) em ruminantes domésticos.

Esp.	Nº de anim.	Nº de Parições	Dia da dosag.	Precisão (DG+)	Precisão (DG-)	Precisão total	Fonte
Bov.	430	267	35	98,89% (267/270)	87,50% (140/160)	94,65% (407/430)	Zoli et al., 1992b
	78	53	35	100,00% (53/53)	76,00% (19/25)	92,31% (72/78)	Bisson, 1992
Ov.	115	87	25	97,75% (87/89)	93,33% (28/30)	98,29% (115/117)	Benitez Ortiz, 1992
Cap.	40	33	25	100,00% (33/33)	100,00% (7/7)	100,00% (40/40)	Benitez Ortiz, 1992

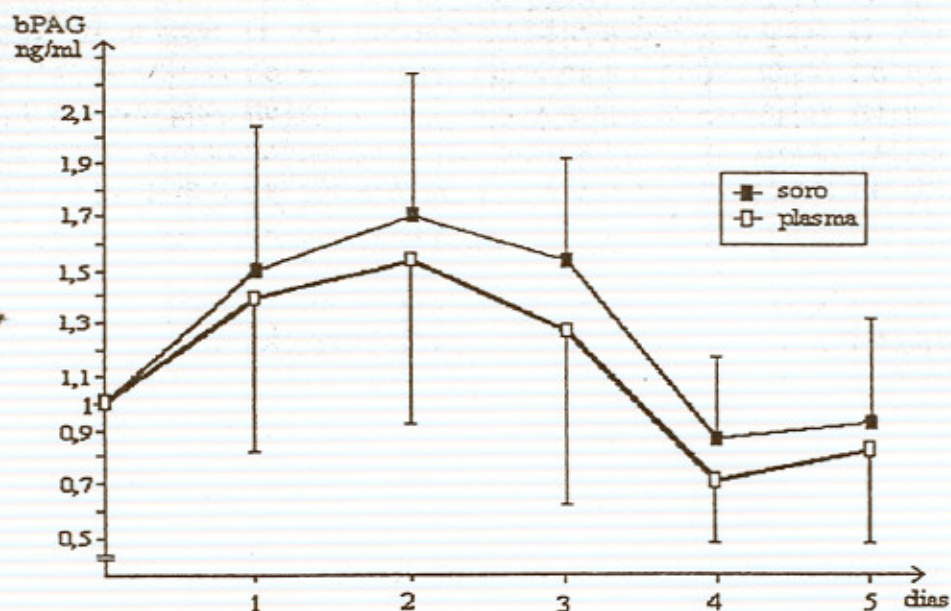


Figura 14 - Degradação da PAG no soro e no plasma bovino em diferentes períodos de incubação (média \pm EP; Adaptado de Bisson, 1992).

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Como discutido na revisão de literatura, perfis de PAG durante a gestação e período pós-parto já foram descritos em algumas raças de bovinos (Zoli et al., 1992), ovinos (Ranilla et al., 1994) e caprinos (Benitez Ortiz, 1992). Nestas espécies, concentrações periféricas desta proteína foram afetadas por diversos fatores, dentre os quais podem ser citados o período de gestação (Benitez Ortiz, 1992; Zoli et al., 1992b; Ranilla et al., 1994), a raça materna (Guilbault et al., 1991) e o número de fetos (Benitez Ortiz, 1992).

Apesar de perfis de PAG já terem sido descritos em raças caprinas de origem européia, até o momento nada se conhecia sobre o comportamento destes perfis ao longo da gestação e período pós-parto em caprinos nativos de regiões tropicais. Tendo em vista a importância do estudo específico destes perfis, assim como dos perfis de progesterona, para uma futura aplicação prática destas dosagens como método de diagnóstico de gestação e de estudo da mortalidade embrionária em criatórios caprinos locais, foram objetivos deste estudo:

- ⇒ Descrever os perfis sorológicos de PAG durante a gestação e o período pós-parto em cabras nativas do Nordeste do Brasil.
- ⇒ Descrever os perfis de progesterona durante a gestação em cabras, nativas do Nordeste do Brasil.
- ⇒ Determinar a sensibilidade e a precisão do sistema de dosagem radioimunológica heteróloga utilizado para a determinação das concentrações periféricas de PAG em cabras gestantes.

SEGUNDA PARTE

TRABALHO EXPERIMENTAL

PERFIS SOROLÓGICOS DE PAG (PREGNANCY-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN) DURANTE A GESTAÇÃO E PERÍODO PÓS-PARTO E PERFIS DE PROGESTERONA DURANTE A GESTAÇÃO EM CABRAS NATIVAS DO NORDESTE DO BRASIL.

Sousa N.M.,¹ Garbayo J.M.,² Figueiredo J.R.,¹ Sulon J.,² Gonçalves P.B.D.¹ e Beckers J.F.²

¹ Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dedé Brasil, 1700. CEP 60740-000, Fortaleza-CE, Brasil

² Departamento de Endocrinologia Animal e Reprodução Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Liège. B-4000 Liège, Bélgica

RESUMO

Este estudo descreve os perfis sorológicos da Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) durante a gestação e período pós-parto, assim como os perfis de progesterona ao longo da gestação em cabras nativas do Nordeste do Brasil. Um total de 30 cabras (Caniné, n=11 e Moxotó, n=19) foi utilizado. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0 (IA=dia 0), 11, 16, 18, 20, 24 e 30 pós-inseminação. A seguir, amostras foram coletadas quinzenalmente até o dia 145 e, semanalmente, durante o primeiro mês pós-parto. As concentrações de PAG e progesterona foram determinadas por meio de radioimunoensaio. Os perfis de PAG não foram diferentes entre raças. Entretanto, foram observados efeitos significativos da semana de gestação ($P<0,0001$) e da prolificidade ($P<0,05$) sobre as concentrações de PAG. Durante a gestação, foram observadas concentrações baixas de PAG nas 1ª e 3ª semanas. Em seguida, houve um incremento significativo ($P<0,05$) nas concentrações de PAG nas 5ª e 7ª semanas e um decréscimo significativo ($P<0,05$) na 9ª semana. Após, concentrações de PAG permaneceram relativamente constantes até a 17ª semana e, então, decresceram lentamente até o parto. Após o parto, as concentrações de PAG decresceram rapidamente, alcançando os mais baixos níveis na 4ª semana pós-parto. Concentrações médias de progesterona (P4) variaram significativamente entre animais ($P<0,0001$) e com o período de gestação

($P < 0,0001$), não sendo, entretanto, afetadas pelo número de fetos. Perfis de P4 durante a gestação foram semelhantes para ambas as raças. Na 1ª semana de gestação foram observadas baixas concentrações de P4. Em seguida, as concentrações de P4 aumentaram significativamente ($P < 0,05$) até a 3ª semana de gestação, permaneceram elevadas até a 19ª semana e, então, decresceram significativamente ($P < 0,05$) imediatamente antes do parto. Estes resultados indicaram que concentrações de PAG e progesterona foram similares para cabras Canindé e Moxotó. Em ambas as raças, concentrações de PAG foram significativamente afetadas pelo estágio de gestação e pela prolificidade.

Palavras chave: PAG, progesterona, cabra, gestação, pós-parto.

Agradecimentos

Este trabalho foi patrocinado pelas seguintes instituições: IRSIA; Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Liège, Bélgica; FNRS/Bélgica, EPACE e FUNCAP/Brasil.

INTRODUÇÃO

A maior população de caprinos do Brasil encontra-se na região Nordeste, a qual conta com 89,8% do rebanho nacional (Anuário Estatístico do Brasil, 1994). Para os habitantes desta região, os caprinos são uma importante fonte de proteína animal, contribuindo significativamente com o suprimento alimentar e fornecendo leite e couro de excelente qualidades (Souza Neto, 1987). Apesar da sua importância, a caprinocultura no Nordeste é caracterizada por uma baixa eficiência reprodutiva, com baixas taxas de natalidade e longos intervalos entre partos (Oliveira & Lima, 1994). Neste contexto, uma das principais alternativas para se aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos caprinos consiste na adoção de tecnologias que permitam a racionalização da produção. Dentre estas tecnologias, o diagnóstico de gestação assume um papel fundamental, facilitando o controle da fertilidade, o que permite a redução do intervalo entre partos e o manejo adequado das matrizes gestantes. Diversos métodos têm sido utilizados para o diagnóstico de gestação em ruminantes. Dentre os principais, podemos citar os métodos clínicos, físicos, biológicos e radioimunológicos. Este último possui

inúmeras vantagens, tais como alta especificidade, sensibilidade e precisão (Benítez Ortiz, 1992).

O uso da dosagem radioimunológica para detecção de esteróides como a progesterona (P4) ou proteínas de origem placentária e fetal oferece praticidade e precocidade no diagnóstico de gestação e monitoramento da gestação em ruminantes domésticos. A dosagem plasmática de P4 pode detectar fêmeas não-gestantes precocemente após o acasalamento ou IA (Murray & Newstead, 1988). Entretanto, a utilização da dosagem de P4 é restrita a um curto período de tempo após a inseminação e requer conhecimento preciso da data do acasalamento (González-Stagnaro, 1993), o que dificulta a sua aplicação em condições de campo. Dentre as proteínas de origem placentária detectadas por dosagem radioimunológica, deve ser destacada a PAG (Pregnancy-Associated Glycoprotein), uma glicoproteína associada à gestação detectável na circulação periférica de animais gestantes (Benítez Ortiz, 1992; Bisson, 1992; Zoli et al., 1992b). A PAG é produzida por células binucleadas trofoblásticas de ruminantes (Zoli et al., 1992a), sendo encontrada na circulação periférica de bovinos (Bisson, 1992; Zoli et al., 1992b), ovinos (Ranilla et al., 1994) e caprinos (Benítez Ortiz, 1992).

Perfis de PAG durante a gestação e período pós-parto já foram descritos em vacas leiteiras e de corte (Zoli et al., 1992b), em ovelhas das raças Churra e Merino (Ranilla et al., 1994) e em cabras da raça Blanca Centibérica (Benítez Ortiz, 1992). As concentrações periféricas desta proteína podem ser afetadas por diversos fatores. Dentre estes, podem ser citados a raça materna (Guilbault et al., 1991), o número de fetos (Benítez Ortiz, 1992) e a duração da cultura "in vitro" dos conceptos (Ectors et al., 1996).

Embora os perfis plasmáticos ou sorológicos de PAG e P4 tenham sido descritos para raças européias, não há informações a respeito destes perfis durante a gestação em cabras nativas de regiões tropicais como o Nordeste do Brasil. Tendo em vista os diversos fatores que podem influenciar as concentrações periféricas maternas de PAG, o estudo específico destes perfis em cabras nativas torna-se de fundamental importância para uma futura aplicação prática destas dosagens como diagnóstico de gestação em condições locais. No sentido de suprir esta deficiência, os objetivos deste estudo foram descrever os perfis

sorológicos de PAG durante a gestação e o primeiro mês pós-parto, bem como descrever os perfis sorológicos de P4 durante a gestação em cabras Moxotó e Canindé, nativas do Nordeste do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Local do experimento

A primeira parte do experimento foi realizada na fazenda Iracema, pertencente a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará (EPACE), localizada a 23 km do município de Quixadá-CE, 5° de latitude Sul e 39° de longitude Oeste. Esta fase foi realizada de março a agosto de 1995, consistindo na coleta de sangue ao longo da gestação e período pós-parto em cabras nativas do Nordeste do Brasil.

A segunda parte do experimento foi realizada no Laboratório de Fisiologia da Reprodução da Universidade de Liège, Bélgica. Esta fase consistiu na realização das dosagens radioimunológicas de PAG e P4 no soro caprino obtido durante a primeira parte do experimento.

2. Animais

Um total de 30 cabras nativas da região Nordeste do Brasil (Moxotó, n=19 e Canindé, n=11), oriundas de um mesmo rebanho, foram utilizadas neste estudo. As cabras tinham $44,0 \pm 1,26$ (média \pm EP) meses de idade na época da inseminação e eram criadas em um sistema extensivo, alimentando-se de pastagem nativa e tendo livre acesso à água e à suplementação mineral.

Todas as cabras foram inseminadas artificialmente com sêmen refrigerado, 24 horas após o estro. A detecção do estro foi feita utilizando-se macho vasectomizado. O ciclo estral foi previamente sincronizado pela aplicação de esponja vaginal impregnada com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (Promone E, Rhodia-Mérieux Veterinária) durante 11 dias e injeção intramuscular de 200 UI de PMSG (Chrono-Gest, Intervet S.A.) e 50 µg de cloprostenol (Ciosin, Pitman-Moore, Brasil) 2 dias antes da retirada das esponjas.

O diagnóstico de gestação foi feito por ecografia (Scanner linear B-mode. Shinasonic, 3,5 MHz) 60 dias após IA. O número de crias de cada fêmea foi registrado ao nascimento.

3. Coleta de soro para as dosagens de PAG e P4

Amostras de sangue (5 ml) foram coletadas da veia jugular utilizando-se tubos Vacutainers (Becton Dickson, New Jersey, USA) não-heparinizados, nos dias 0, 10, 16, 18, 20, 24 e 30 após IA (dia 0). A partir do primeiro mês, as coletas foram feitas quinzenalmente até o 145º dia pós-inseminação e, semanalmente, durante o primeiro mês pós-parto.

O soro foi obtido por centrifugação (1500g/15 min) imediata das amostras de sangue, transvasado e estocado a -20°C até o momento das dosagens de PAG e P4.

4. Dosagem de PAG

a) Reagentes

Os reagentes utilizados foram preparados a partir da bPAG purificada (Zoli et al., 1992b) e da oPAG parcialmente purificada (Zoli et al., 1995). A bPAG foi utilizada como solução padrão (Antígeno frio ou não marcado - Ag°) e como marcador (Antígeno quente ou marcado - ¹²⁵I-bPAG - Ag*). A bPAG foi marcada com o isótopo radioativo ¹²⁵I, pelo método da lactoperoxidase (Thorell & Johansson, 1971). A oPAG foi utilizada para preparação de anti-soro anti-oPAG em coelhos (# 497, Zoli et al., 1992b).

Todos os reagentes foram dissolvidos em tampão TRIS-BSA, utilizado durante o procedimento radioimunológico (0,025 M TRIS pH 7,5, contendo 0,01M MgCl₂, 0,1% BSA e 0,01% de sulfato de Neomicina).

Imunoglobulinas anti-IgG de coelhos, produzidas em ovinos e acopladas à celulose (DASP System - Double Antibody Solid Phase) foram utilizadas para precipitar o anti-soro. Um soro comprovadamente sem PAG foi utilizado para a elaboração da curva padrão, visando diminuir a interferência devida às proteínas do plasma.

b) Procedimentos

As amostras de soro foram analisadas por dosagem radioimunológica heterolôga, de acordo com o método descrito por Ranilla et al. (1994), modificado pela adição de uma etapa de pré-incubação para aumentar a sensibilidade das dosagens referentes aos primeiros meses pós-inseminação e pós-parto. As proporções de reagentes adicionados para a realização de cada dosagem são mostrados na Tabela 1.

As curvas padrão foram preparadas a partir de diluições decrescentes de uma solução padronizada de bPAG (solução estoque de 1000 ng/ml).

No processo de dosagem de PAG sem passo de pré-incubação, as diluições da curva padrão variaram de 3,12 a 1000 ng de PAG/ml. Neste processo, todos os reagentes foram adicionados e incubados à temperatura ambiente durante uma noite (\pm 16 horas). Após este período de incubação, as frações livre e ligada foram separadas por adição de 1 ml de DASP (2,5 mg/ml). Após 2 horas adicionais de incubação à temperatura ambiente, a solução obtida foi diluída pela adição de 3 ml de solução tampão, centrifugada a 1500g por 15 min e o sobrenadante removido por aspiração. A radioatividade do precipitado foi determinada por contador gama (Model 1272 CliniGamma, Rockville, MD).

No intuito de aumentar a sensibilidade da dosagem, as amostras do primeiro mês de gestação e do período pós-parto foram submetidas a um passo de pré-incubação. Resumidamente, todos os reagentes mencionados na Tabela 1, exceto os 100 μ l de 125 I-bPAG, foram pré-incubados durante uma noite à temperatura ambiente. No dia seguinte, o 125 I-bPAG foi adicionado e somente após 4 horas de incubação o DASP foi adicionado. A partir de então, o procedimento de dosagem radioimunológica foi similar ao descrito acima para a dosagem de PAG sem pré-incubação. Na curva padrão para dosagem de PAG com passo de pré-incubação as diluições variaram de 0,4 a 100 ng/ml.

Tabela 1 - Quantidades de reagentes utilizados por ponto da curva padrão ou por amostra para realizar uma dosagem radioimunológica de PAG.

Reagentes	Tubos				
	Atividade total	Atividade não-específica	Amost. padrão sem Ag°	Curva padrão	Amostra a ser dosada
Ag*	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Ag°	-	-	-	100µl	100µl
Soro sem PAG	-	100µl	100µl	100µl	-
Anti-soro	-	-	100µl	100µl	100µl
Tampão	-	300µl	200µl	100µl	200µl
Total	100µl	500µl	500µl	500µl	500µl

5. Características da dosagem de PAG

A sensibilidade (menor quantidade detectável da substância a ser dosada) para cada tipo de dosagem (com ou sem passo de pré-incubação) foi calculada pelo método descrito por Baud et al. (1989).

Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram calculados em três amostras de soro sanguíneo.

A precisão do teste foi demonstrada por meio do cálculo dos coeficientes de variação (CV) intra-ensaio e inter-ensaio, conforme descrito por Rodbard (1974). Na determinação do CV intra-ensaio, uma mesma amostra, foi dosada 10 vezes na mesma série de dosagens. Na determinação do coeficiente de variação inter-ensaio, cada amostra era dosada em duplicata em 10 séries de dosagens consecutivas.

6. Dosagem de P4

Para dosagem de P4, foi utilizado o procedimento radioimunológico descrito por Ranilla et al. (1994), com uma etapa de extração em éter de petróleo.

a) Reagentes e procedimentos

Uma solução padrão de 0,2 g de P4/l de etanol foi utilizada para preparação de uma curva padrão, com diluições variando de 0,2 a 50 ng P4/ml.

Para a extração da P4, 200µl de cada uma das diferentes diluições da curva padrão e de cada amostra de soro sanguíneo a ser testado foram adicionadas a tubos de polipropileno (75 x 12 mm) contendo 3 ml de éter de petróleo (60-80°C, grau analítico, UCB, Braine-L'Alleud, Bélgica). Os tubos foram agitados durante 5 minutos e, em seguida, centrifugados a 500 g/5 min. A fase aquosa foi então congelada em nitrogênio líquido, e o sobrenadante transvasado para tubos de vidro (10 x 55 mm). O éter de petróleo foi removido sob pressão reduzida em um evaporador, e o resíduo redissolvido em 300µl de tampão fosfato-gelatina (Tampão fosfato 0,1M, pH 7, contendo NaCl 0,15 M e gelatina 1g/l). Em seguida, 100µl de Ag* (P4 11-hemisuccinato-2[¹²⁵I]-iodo-histamina) e 100µl de anti-soro diluído foram adicionados a cada tubo, sendo feita uma incubação de 2 horas à temperatura ambiente.

Após incubação, as frações livre e ligada foram separadas por adição de 100µl (25 ng/ml) de DASP a todos os tubos. O conteúdo dos tubos foi agitado com o auxílio de um vortex e, em seguida, incubado por 30 minutos. Após este período, 3 ml de tampão fosfato-gelatina foram adicionados aos tubos, e estes foram novamente centrifugados (1500 g/15 min). O sobrenadante foi removido por decantação e a radioatividade do precipitado determinada por contador gama (Model 1272 CliniGamma, Rockville, MD).

7. Análise estatística

Os dados são apresentados como média ± EP. Concentrações de PAG e P4 durante a gestação foram analisadas pelo procedimento GLM do SAS (User's Guide, 1988). As médias foram analisadas pelo teste de DUNCAN, a 5% de probabilidade. As opções RANDON e TEST também foram utilizadas.

RESULTADOS

1. Duração da gestação

Dezoito cabras (10 Moxotó e 8 Canindé) pariram 1, 2 ou 3 ($1,61 \pm 0,16$) crias, após $145,80 \pm 1,01$ dias de gestação. Para ambas as raças, 50% das cabras tiveram gestação simples.

Quanto ao período de gestação, foi verificado que cabras que tiveram gestação múltipla ($145,80 \pm 0,45$ e $144,75 \pm 0,51$ dias para cabras Moxotó e Canindé, respectivamente) pariram antes das que tiveram gestação simples ($146,00 \pm 0,45$ dias e $146,75 \pm 0,51$ dias para cabras Moxotó e Canindé, respectivamente). Entretanto, somente para as cabras da raça Canindé foi observado um efeito significativo ($P < 0,05$) da prolificidade sobre a duração da gestação.

2. Características da dosagem de PAG

A sensibilidade das dosagens de PAG foi $0,76 \pm 0,26$ ng/ml e $4,92 \pm 2,14$ ng/ml para dosagens com e sem passo de pré-incubação, respectivamente.

Os coeficientes de variação calculados para as dosagens de PAG com e sem passo de pré-incubação, obtidos de diferentes amostras de soro são mostrados na Tabela 2. Como pode ser visto, os coeficientes de variação obtidos foram relativamente baixos (3,28 a 13,27%) o que indica a precisão do sistema de dosagem heteróloga utilizado.

3. Determinação das concentrações de PAG e P4 em animais gestantes e não-gestantes

No 60º dia de gestação, 82% (9/11) das cabras Canindé e 53% (10/19) das cabras Moxotó foram consideradas gestantes com base no exame ecográfico. Entretanto, uma das 9 cabras Canindé não chegou a parir, mostrando um rápido decréscimo nas concentrações de PAG (Figura 1) chegando a níveis indetectáveis entre a 5ª e a 9ª semanas após IA, a despeito de uma concentração de P4 normal até a 21ª semana. Este animal não foi incluído nos cálculos dos perfis de PAG e P4 durante a gestação.

Tabela 2. Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio para dosagens de PAG com e sem passo de pré-incubação.

	Coeficientes de variação			
	Intra-ensaio		Inter-ensaio	
<u>Com pré-incubação</u>	<u>CV</u>	<u>Média ± EP</u>	<u>CV</u>	<u>Média ± EP</u>
Amostra 1	3,91 %	3,45 ± 0,13 ng/ml	13,13 %	4,80 ± 0,63 ng/ml
Amostra 2	4,91 %	14,92 ± 0,73 ng/ml	12,59 %	14,38 ± 1,81 ng/ml
Amostra 3	5,93 %	39,42 ± 2,34 ng/ml	13,27 %	32,49 ± 4,31 ng/ml
<u>Sem pré-incubação</u>	<u>CV</u>	<u>Média ± EP</u>	<u>CV</u>	<u>Média ± EP</u>
Amostra 4	6,77 %	21,16 ± 1,43 ng/ml	12,15 %	18,92 ± 2,42 ng/ml
Amostra 5	3,28 %	42,93 ± 1,41 ng/ml	12,03 %	36,41 ± 4,38 ng/ml
Amostra 6	5,93 %	303,14 ± 2,34 ng/ml	6,39 %	291,49 ± 18,62 ng/ml

As concentrações de PAG foram significativamente ($P < 0,05$) mais altas nos animais gestantes ($n=18$) do que nos não-gestantes ($n=11$). Nos dias 20, 24 e 30 após IA, respectivamente, cabras gestantes tiveram concentrações de PAG médias de $1,76 \pm 0,43$; $10,00 \pm 1,79$ e $86,45 \pm 16,84$ ng/ml, enquanto que cabras não-gestantes tiveram concentrações de PAG médias mais baixas do que a sensibilidade da dosagem ($< 0,76$ ng/ml). É importante notar também que, a partir do 24º dia de gestação, cabras gestantes e não-gestantes puderam ser distinguidas. Respectivamente para o 24º e 30º dias após IA, todos os animais não-gestantes apresentaram concentrações de PAG mais baixas que 0,90 ng/ml e 1,20 ng/ml, enquanto todos os animais gestantes apresentaram concentrações mais altas que 1,80 ng/ml e 5,80 ng/ml.

A Tabela 3 mostra as concentrações médias de P4 em animais gestantes e não-gestantes nos dias 18, 20 e 24 pós-inseminação. Comparadas às cabras não-gestantes, as cabras gestantes possuíram concentrações de P4 significativamente mais altas ($P < 0,05$).

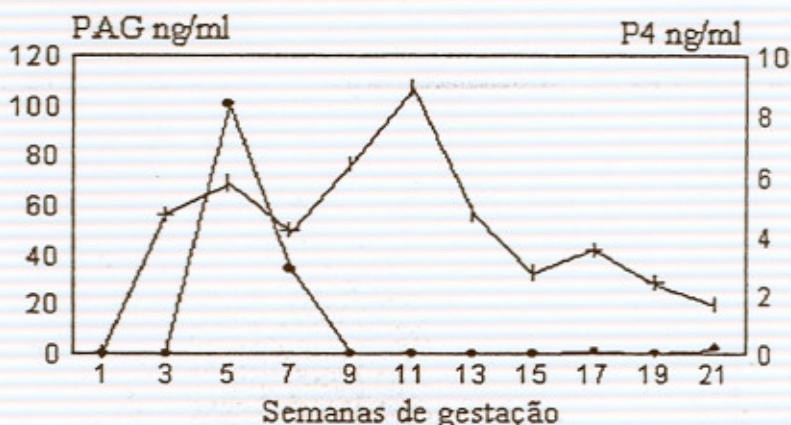


Figura 1 - Perfis de PAG (-●-●-) e P4 (-+-+-) em uma cabra Canindé que apresentou mortalidade embrionária com atividade luteal prolongada.

4. Concentrações de PAG durante a gestação

Durante a gestação, concentrações médias semanais de PAG até o parto variaram significativamente entre animais ($P < 0,0001$) e com o tempo de gestação ($P < 0,0001$), mas não foram afetadas pela raça das cabras ($96,52 \pm 7,12$ ng/ml e $78,91 \pm 7,73$ ng/ml para cabras Moxotó e Canindé, respectivamente). Um efeito significativo ($P < 0,05$) da prolificidade nas concentrações de PAG foi também observado, com concentrações mais elevadas em cabras gestando múltiplos fetos que em cabras gestando um único feto ($106,34 \pm 7,94$ ng/ml vs. $71,18 \pm 6,50$ ng/ml).

A Figura 2 mostra os perfis de PAG de cabras Moxotó (Figura 2A) e Canindé (Figura 2B), com gestação simples e múltipla, da 1ª semana após IA até o parto (21ª semana). Em cabras Moxotó, os perfis de PAG foram muito similares para animais que pariram um ou múltiplos fetos. Cabras Moxotó, respectivamente com gestação simples e múltipla, tiveram concentrações de PAG mais baixas na 1ª ($1,88 \pm 0,43$ ng/ml e $1,64 \pm 0,54$ ng/ml) e na 3ª ($1,05 \pm 0,24$ ng/ml e $1,70 \pm 0,39$ ng/ml) semanas de gestação. Depois, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) das concentrações de PAG na 5ª semana ($120,06 \pm 46,17$ ng/ml e $98,47 \pm 17,20$ ng/ml) e da 5ª à 7ª semanas ($180,67 \pm 39,66$ ng/ml e

Tabela 3. Concentrações de P4 em cabras gestantes e não gestantes nos dias 18, 20 e 24 após IA (média \pm EP).

	n	Dias após IA		
		18 ^o Dia	20 ^o Dia	24 ^o Dia
Cabras gestantes	18	5,86 \pm 0,79 ng/ml ^a	4,81 \pm 0,56 ng/ml ^a	4,34 \pm 0,61 ng/ml ^a
Cabras não-gestantes	11	2,00 \pm 0,86 ng/ml ^b	2,14 \pm 0,83 ng/ml ^b	1,73 \pm 0,64 ng/ml ^b

^{a,b} Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

207,64 \pm 43,46 ng/ml). Posteriormente, foi observado um decréscimo significativo ($P < 0,05$) na 9^a semana (91,05 \pm 22,80 ng/ml e 160,12 \pm 22,91 ng/ml). Finalmente, respectivamente para gestações simples e múltiplas, foi observado que as concentrações de PAG permaneceram relativamente constantes da 9^a a 21^a semanas (66,70 \pm 17,60 ng/ml e 88,77 \pm 10,54 ng/ml).

Como pode ser visto na Figura 2A, durante a gestação, as cabras Moxotó que apresentavam gestação múltipla tiveram concentrações de PAG mais altas que aquelas que apresentavam gestação simples (111,73 \pm 10,15 ng/ml vs. 81,32 \pm 9,65 ng/ml, respectivamente). Entretanto, respectivamente para cabras gestando um e múltiplos fetos, diferenças nas concentrações de PAG foram significativas ($P < 0,05$) apenas na 15^a (63,31 \pm 9,17 ng/ml vs. 130,84 \pm 19,84 ng/ml), 17^a (75,87 \pm 8,07 ng/ml vs. 122,30 \pm 14,41 ng/ml) e 19^a (60,43 \pm 6,76 ng/ml vs. 105,24 \pm 8,92 ng/ml) semanas.

No que diz respeito a cabras Canindé com gestação simples e múltipla respectivamente, também foi observado um incremento significativo ($P < 0,05$) nas concentrações de PAG da 3^a à 5^a semanas (55,60 \pm 21,38 ng/ml e 58,28 \pm 19,17 ng/ml) e da 5^a à 7^a semanas (123,84 \pm 43,10 ng/ml e 168,75 \pm 51,01 ng/ml). Como descrito para as cabras Moxotó, um decréscimo significativo ($P < 0,05$) foi observado na 9^a semana (45,45 \pm 11,73 ng/ml e 101,59 \pm 36,70 ng/ml). Em contraste com as cabras Moxotó, as concentrações de PAG nas cabras Canindé

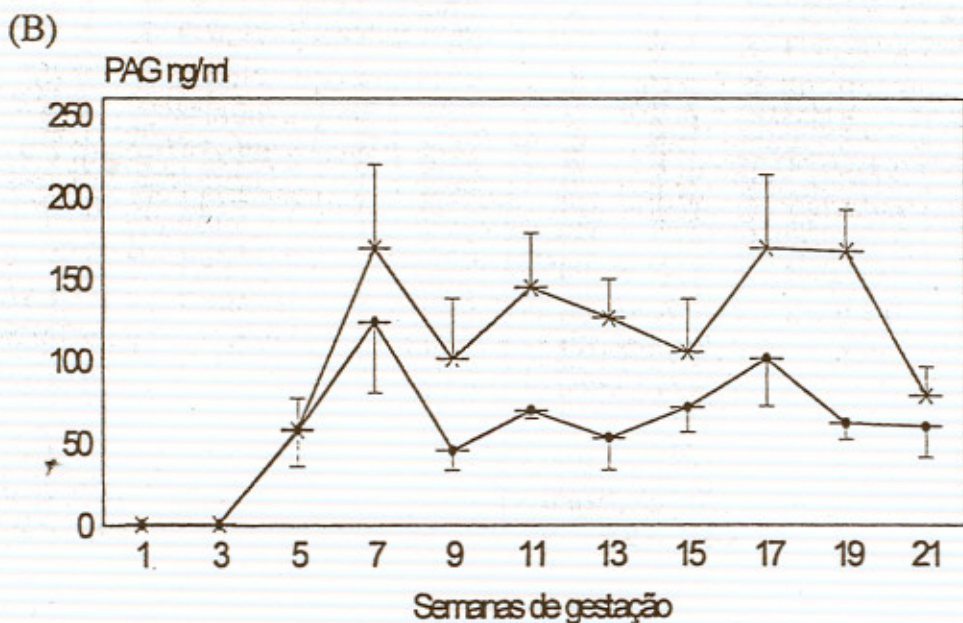
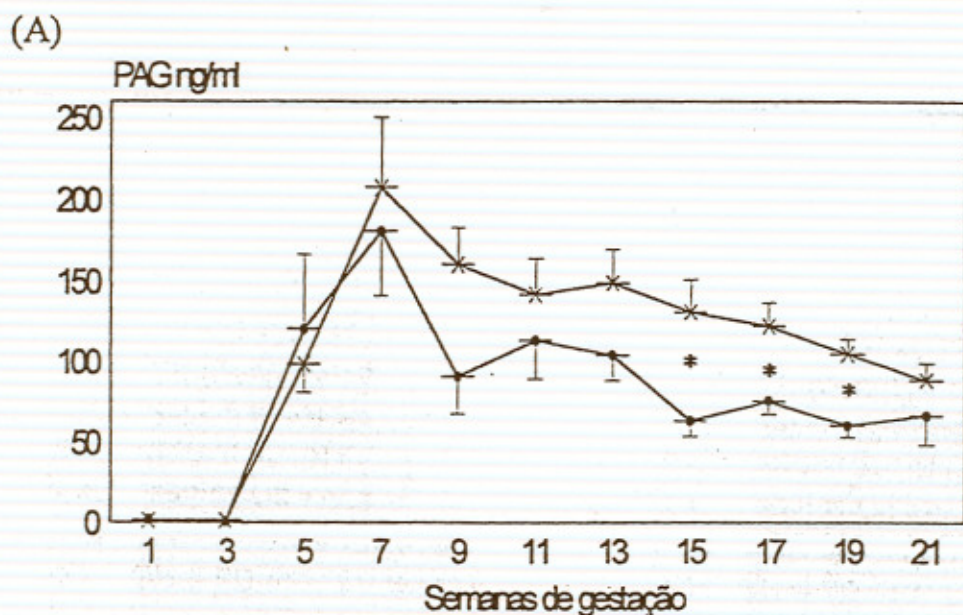


Figura 2. Perfis de PAG em cabras Moxotó (A) e Canindé (B) durante a gestação em animais com gestação simples (-●-●-) e múltipla (-x-x-). Diferenças significativas ($P < 0,05$) nas concentrações de PAG entre os níveis de prolificidade são indicados por asterisco (*).

permaneceram relativamente constantes somente até a 15ª semana ($71,64 \pm 15,04$ ng/ml e $105,19 \pm 32,32$ ng/ml). Depois, as concentrações de PAG aumentaram na 17ª semana ($101,38 \pm 28,58$ ng/ml e $168,73 \pm 44,74$ ng/ml) e decresceram na 21ª semana ($60,04 \pm 18,24$ ng/ml e $78,95 \pm 18,03$ ng/ml), mas estas diferenças não foram significativas.

Durante a gestação, cabras Canindé (Figura 2B) gestando múltiplos fetos apresentaram concentrações de PAG mais altas que aquelas gestando um único feto ($53,83 \pm 8,05$ ng/ml vs. $99,57 \pm 12,62$ ng/ml), entretanto esta diferença não foi significativa em nenhum momento da gestação.

5. Concentrações de PAG durante o primeiro mês pós-parto

A Figura 3 mostra as concentrações de PAG durante as primeiras quatro semanas pós-parto em cabras Moxotó (Figura 3A) e Canindé (Figura 3B) com gestação simples e múltipla.

Para ambas as raças, respectivamente para cabras gestando um ou múltiplos fetos, as maiores concentrações de PAG foram observadas na 1ª semana pós-parto ($10,75 \pm 4,86$ ng/ml e $16,01 \pm 2,35$ ng/ml para cabras Moxotó, $9,44 \pm 2,93$ ng/ml e $19,34 \pm 8,49$ ng/ml para cabras Canindé). Após esta semana, as concentrações de PAG decresceram rapidamente em ambas as raças, alcançando as menores concentrações na 4ª semana ($1,10 \pm 0,20$ ng/ml e $1,10 \pm 0,30$ ng/ml respectivamente para cabras Moxotó que pariram um e múltiplos fetos, e $<0,76$ ng/ml para cabras Canindé apresentando ambos os níveis de prolificidade).

6. Concentrações de P4 durante a gestação

No tocante às concentrações de P4, as Figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, perfis normais e anormais de P4 em cabras Moxotó (A) e Canindé (B) ao longo da gestação.

Nos animais que apresentaram perfis normais de P4, as concentrações médias semanais variaram significativamente entre animais ($P < 0,0001$) e com o tempo de gestação ($P < 0,0001$), porém não foram afetadas pela raça ($5,07 \pm 0,33$ ng/ml vs. $5,60 \pm 0,37$ ng/ml para cabras Canindé e Moxotó, respectivamente) ou níveis de prolificidade

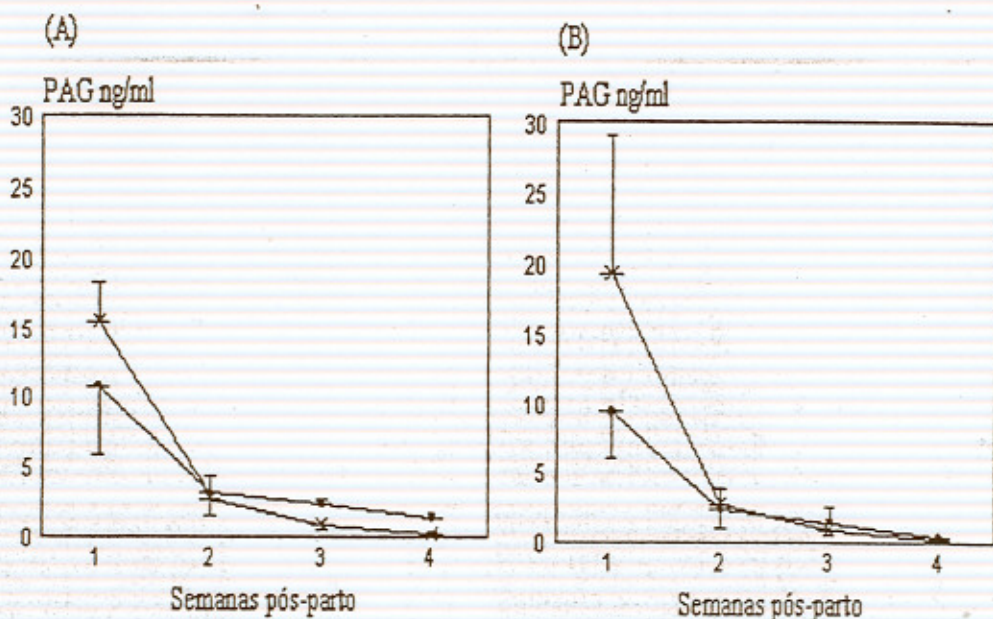


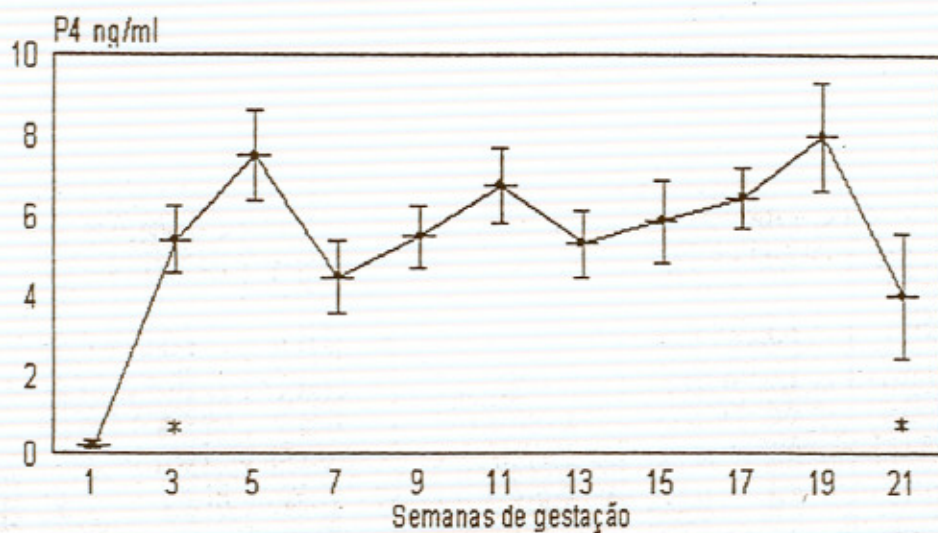
Figura 3. Perfis de PAG em cabras Moxotó (A) e Canindé (B) nas primeiras 4 semanas pós-parto em animais com gestação simples (-●-●-) e múltipla (-x-x-).

($5,10 \pm 0,33$ ng/ml vs. $5,67 \pm 0,37$ ng/ml para cabras com gestação simples e múltipla, respectivamente).

Como pode ser visto nas Figuras 4A e 4B, na 1ª semana de gestação as concentrações de P4 foram baixas ($0,23 \pm 0,07$ ng/ml e $0,13 \pm 0,03$ ng/ml, respectivamente para cabras Moxotó e Canindé). Após, respectivamente para cabras Moxotó e Canindé, as concentrações de P4 aumentaram significativamente ($P < 0,05$) na 3ª semana ($5,35 \pm 0,85$ ng/ml e $4,36 \pm 0,63$ ng/ml), permaneceram altas até a 19ª semana ($7,96 \pm 1,33$ ng/ml e $5,94 \pm 0,90$ ng/ml) e decresceram significativamente ($P < 0,05$) imediatamente antes do parto ($3,98 \pm 1,59$ ng/ml e $3,45 \pm 0,36$ ng/ml).

A Figura 5 mostra as concentrações de P4 e PAG durante a gestação em 3 cabras Moxotó (Figuras 5A, 5B e 5C) que apresentaram perfis anormais de P4. Como pode ser observado nestas figuras, as concentrações de PAG mantiveram-se nos níveis normais observados

(A)



(B)

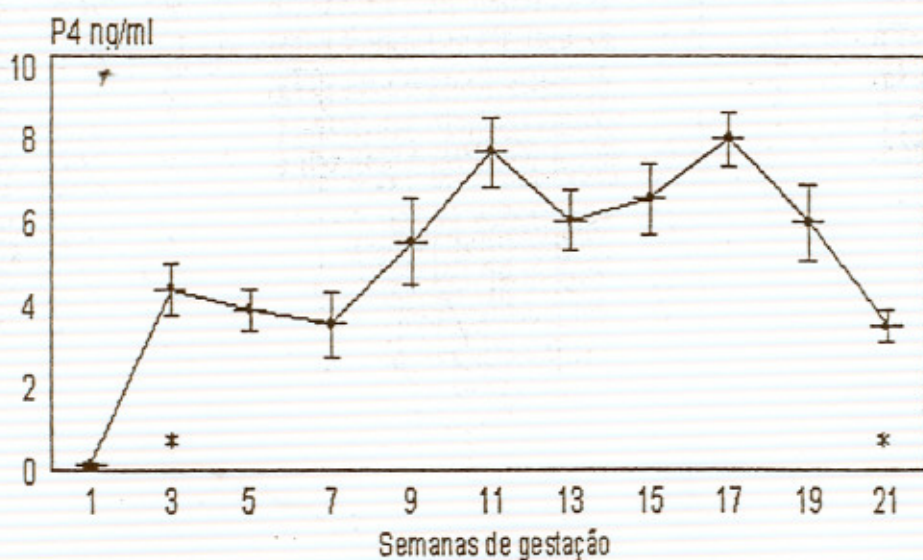


Figura 4. Perfis de P4 em 7 cabras Moxotó (A) e 8 cabras Canindé (B) durante a gestação. Diferenças significativas ($P < 0,05$) nas concentrações de P4 entre as semanas de gestação são indicadas por asterisco (*).

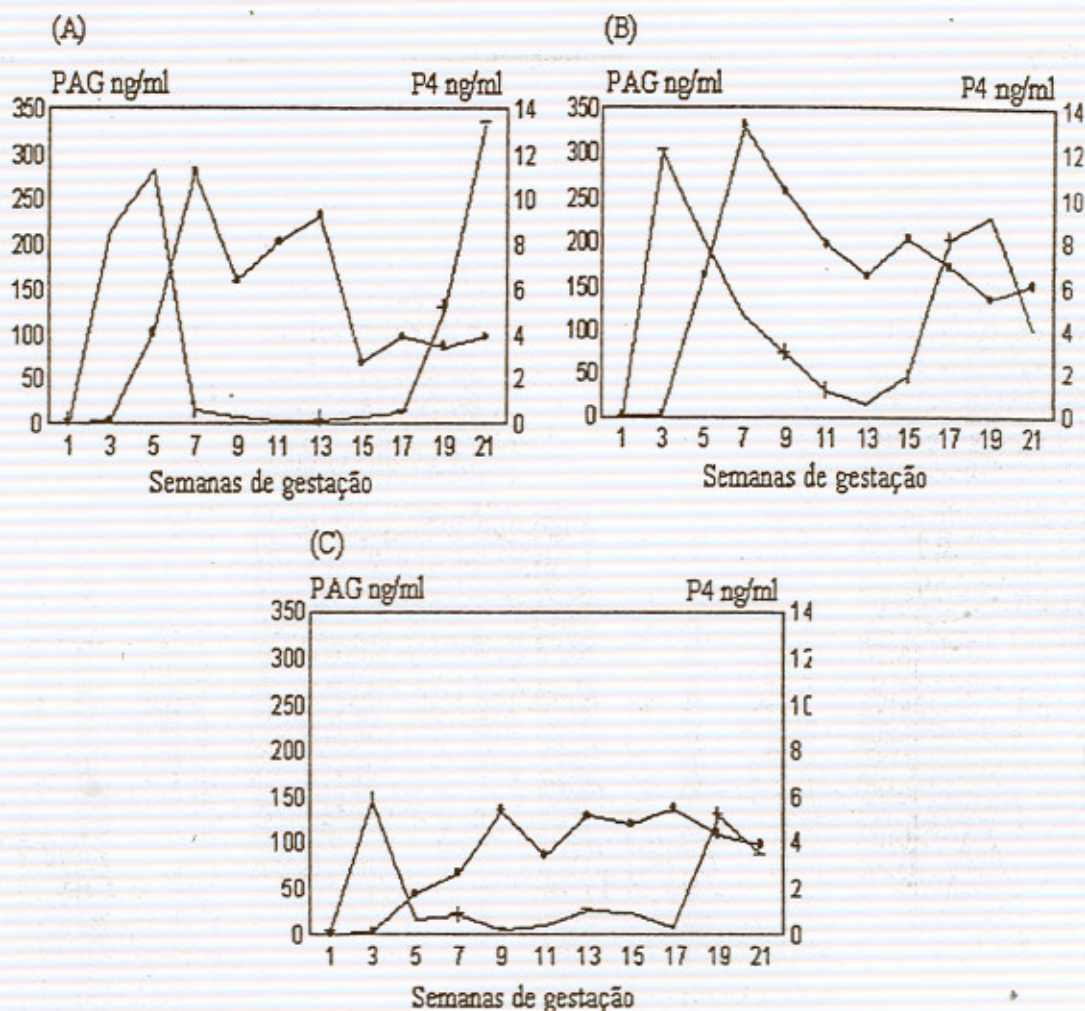


Figura 5. Perfis anormais de P4 (-+--+) e normais de PAG (-●-●-) em três cabras Moxotó (Figuras 5A, 5B e 5C) durante a gestação.

para cabras gestantes. Entretanto, surpreendentemente, as concentrações de P4 foram muito baixas, notadamente entre a 5ª e a 15ª semanas de gestação. Apesar das baixas concentrações de P4 observadas, todas as 3 cabras pariram 2 crias cada, após um período de gestação normal.

DISCUSSÃO

Este estudo descreve pela primeira vez os perfis sorológicos de PAG durante a gestação e o período pós-parto em cabras nativas da

região Nordeste do Brasil, bem como os perfis de P4 durante a gestação. A sensibilidade e a precisão do sistema radioimunológico utilizado para dosagem de PAG também foram determinados.

Apesar da ausência de reagentes específicos, o sistema heterólogo utilizado mostrou ser bastante sensível para a mensuração das concentrações periféricas maternas de PAG caprina. Neste estudo, a sensibilidade das análises com passo de pré-incubação foi mais alta que a sensibilidade das análises sem passo de pré-incubação. Resultados similares foram obtidos por Zoli et al. (1992b). Estes autores observaram que amostras incubadas com todos os reagentes (exceto ^{125}I -bPAG) à temperatura ambiente por 16 horas antes da adição de ^{125}I -bPAG, tinham uma sensibilidade maior que as amostras dosadas sem passo de pré-incubação.

Neste estudo, a dosagem radioimunológica de PAG também mostrou ser um método preciso para mensuração da PAG em cabras. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio obtidos para dosagens com e sem passo de pré-incubação foram considerados relativamente baixos (3,28% a 13,27%), sendo bastante similares aos obtidos por Zoli et al. (1992b) para o sistema homólogo de dosagem de PAG em bovinos ($6,87 \pm 2,48$ a $11,59 \pm 0,63\%$).

Nas 18 cabras que levaram sua gestação a termo, o comprimento de gestação foi considerado normal, estando dentro dos limites observados por Peaker (1978).

Uma cabra Canindé apresentou uma dramática queda nas concentrações de PAG entre a 5ª e a 7ª semanas de gestação, indicando uma possível mortalidade fetal. Este resultado foi comprovado por exame ecográfico realizado ao 60º dia de gestação. Apesar da queda nas concentrações de PAG, os níveis de P4 mantiveram-se relativamente altos até a 21ª semana pós-inseminação, o que indica a presença de um corpo lúteo funcional até o período estimado para a parturição. A ocorrência de atividade luteal prolongada em animais não-gestantes já foi descrita em casos de pseudogestação em cabras (Hasselink, 1994), assim como em vacas (Bulman & Lamming, 1977) e ovelhas (Zarco et al., 1984) não-gestantes

No que diz respeito às concentrações de PAG no início da gestação, foram observados neste trabalho níveis detectáveis de PAG em 6/18 cabras no 18º dia, em 13/18 cabras no 20º dia e, finalmente, em todas as cabras gestantes no 24º dia após IA. Estes resultados estão de acordo com aqueles de Benitez Ortiz (1992), o qual reportou que o início da secreção de PAG em cabras de raças européias ocorre a partir do 21º dia de gestação. Ainda segundo este autor, as concentrações periféricas de PAG foram baixas e altamente variáveis antes do 25º dia de gestação, o que explicaria o fato da sua detecção ser feita em todos os animais somente a partir do 24º dias de gestação.

No presente trabalho, após o 24º dia foi possível distinguir animais não-gestantes de gestantes de acordo com as concentrações de PAG. Resultados similares foram observados por Humblot et al. (1990) e Ruder et al. (1988) para dosagens heterólogas de PSPB em cabras e ovelhas, respectivamente. Estes autores reportaram a possibilidade de se distinguirem animais não-gestantes de gestantes a partir do 24º dia de gestação, o que concorda com os resultados obtidos em nosso trabalho.

No que se refere ao efeito da prolificidade sobre as concentrações de PAG, foi observada uma diferença significativa nas concentrações de PAG entre cabras nativas que pariram um ou múltiplos fetos. Durante a gestação, cabras que pariram múltiplos fetos apresentaram concentrações de PAG mais altas que aquelas que pariram um único feto. Achados similares em cabras foram descritos para a PSPB por Humblot et al. (1990) e para o cPL por Hayden et al. (1979, 1980).

Os perfis sorológicos de PAG obtidos em cabras Moxotó e Canindé ao longo da gestação foram similares àqueles reportados por Benitez Ortiz (1992) para cabras Blanca Celtibérica. Nas raças Moxotó, Canindé e Blanca Celtibérica, as concentrações de PAG aumentaram da 5ª à 7ª semana e decresceram em seguida. Entretanto, ao contrário das cabras Moxotó, nas quais as concentrações de PAG permaneceram relativamente constantes até o parto, nas cabras Canindé e Blanca Celtibérica um segundo incremento nas concentrações de PAG foi observado, não sendo o mesmo, entretanto, observado a níveis significativos.

Apesar da similaridade encontrada entre os perfis de PAG em cabras Blanca Celtibérica e cabras nativas do Nordeste do Brasil, as

concentrações de PAG encontradas em cabras Moxotó e Canindé foram consideravelmente mais baixas do que aquelas observadas em cabras Blanca Celtibérica. Esta diferença pode ser associada a vários fatores que influenciam os resultados obtidos no método de dosagem radioimunológica (Chard, 1989). Entretanto, a influência das raças não pode ser descartada.

Quando comparados com outras espécies ruminantes, como a bovina e a ovina, os perfis de PAG em cabras nativas mostraram algumas diferenças. Ao contrário dos perfis observados em cabras, as concentrações de PAG em vacas de corte e leite (Zoli et al., 1992b) e em ovelhas da raça Assaf (Ranilla et al., 1997) aumentaram continuamente durante a gestação. Em comparação com ovelhas das raças Churra e Merino (Ranilla et al., 1994), os perfis de PAG de cabras nativas também mostraram ser diferentes. Em ovelhas, houve um primeiro incremento significativo nas concentrações de PAG da 3ª à 9ª semanas de gestação, enquanto nas cabras nativas este incremento foi observado da 5ª à 7ª semanas de gestação. Nas ovelhas da raça Churra, foi observado ainda um segundo incremento significativo da 19ª à 21ª semanas de gestação. Nas cabras nativas, entretanto, as concentrações de PAG permaneceram relativamente constantes até o parto.

No que concerne o período pós-parto, tanto em cabras Moxotó quanto em Canindé, concentrações sorológicas de PAG decresceram rapidamente, atingindo níveis mínimos na 4ª semana pós-parto. Resultados similares foram observados por Ranilla et al. (1994, 1997) em ovelhas. Ao contrário do observado para caprinos, em bovinos as concentrações de PAG decresceram lentamente após o parto, sendo detectáveis até o 100º dia pós-parto em vacas de corte e de leite (Zoli et al., 1992b).

Além da determinação dos níveis de PAG, este estudo também investigou as concentrações de P4 em cabras nativas durante a gestação. Níveis significativamente mais baixos de P4 foram observados a partir do 18º dia de gestação em cabras não-gestantes quando comparadas às gestantes. Também foi observado que concentrações médias de P4 para cabras não-gestantes no 20º dia foram inferiores a 2 ng/ml. Resultados similares foram reportados em cabras da raça Alpina por Humblot et al. (1990).

Os perfis de P4 foram considerados independentemente para cabras apresentando perfis normais (n=15) e anormais (n=3). Nas 15 cabras estudadas, os perfis sorológicos de P4 foram similares àqueles reportados por outros autores (Irving et al., 1972; Thorburn & Schneider, 1972; Humblot et al., 1990) para cabras gestantes. De acordo com estes autores, não há tendência a um incremento ou decréscimo contínuos das concentrações médias de P4 durante toda a gestação.

Ao contrário do observado para PAG, concentrações de P4 não foram afetadas pelo nível de prolificidade. Estes resultados estão de acordo com aqueles previamente descritos por Jarrell & Dziuk (1991), que reportaram que o número de corpos lúteos ou fetos em cabras não influencia as concentrações de P4 após o 30º dia de gestação.

Neste estudo, 3 cabras Moxotó apresentaram concentrações mais baixas de P4, notadamente entre a 5ª e a 15ª semanas de gestação. Estes resultados não foram devidos a erros de estimação, já que todas as amostras destes animais foram dosadas uma 2ª vez para confirmar os resultados previamente encontrados. A razão para estas concentrações mais baixas de P4 pode ser devida a diversos fatores que podem afetar as concentrações periféricas de P4 em ruminantes domésticos. Dentre estes, podem ser mencionados variações individuais (Vahdat et al., 1981), metabolismo eritrocitário (van der Molen & Groen, 1968) e, finalmente, temperatura ambiente (Oltner & Edquist, 1982; Owens et al., 1980; Vahdat et al., 1979).

CONCLUSÃO

Em conclusão, os perfis de PAG durante a gestação foram similares entre as raças Canindé e Moxotó, sendo observadas as mais altas concentrações na 7ª semana de gestação. Após o parto, as concentrações decresceram rapidamente, alcançando os mais baixos níveis na 4ª semana pós-parto. As concentrações de P4 também foram semelhantes entre raças. Elas aumentaram significativamente na 3ª semana de gestação, decrescendo imediatamente antes da parturição. Também conclui-se pelos resultados obtidos que o método de dosagem radioimunológica utilizado para dosagem de PAG consiste em um sistema sensível e preciso para mensuração das concentrações de PAG na circulação periférica de cabras gestantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: IBGE, 1994.
- BAUD, M., COHEN, R., DUMOND, G., MERCIER, M., VASSALT, A. Protocoles d'évaluation de la limite de détection d'une méthode analytique. *Immunoanal. Biol. Spec.*, 14:17-27, 1989.
- BENITEZ ORTIZ, W. Diagnostic de gestation et étude de la mortalité embryonnaire chez les ruminants par dosage de la pregnancy associated glycoprotein (PAG). *Thèse Doctorat*. Université de Liège, 1992.
- BISSON B. Diagnostic de gestation chez la vache par dosage d'une protéine trophoblastique associée à la gestation (bPAG): bovine Pregnancy associated glycoprotein. *Thèse Doctorat*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 1992.
- BULMAN, D.C., LAMMING, G.E. Cases of prolonged luteal activity in the non-pregnant dairy cow. *Vet. Rec.*, 100:550-552, 1977.
- CHARD, T. The background to immunoassay. In: BURDON, R.H., VAN KNIPPENBERG, P.H. (eds.), *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. 3 ed. New York: Elsevier Publishers, 1989, p.1-25.
- ECTORS, F.J., SCHMIDT, M., SULON, J., DEVAL, A., REMY, B., AVERY, B., BECKERS, J.F. bPAG profiles in recipient heifers after of IVF and nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, 45:283, 1996.
- GONZÁLEZ-STAGNARO, C. Diagnóstico de gestación en ovejas y cabras tropicales. *Revista Científica*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidade del Zulia 3:249-267, 1993.
- GUILBAULT, L.A., BECKERS, J.F., LAPIERRE, S., ZOLI, A.P., BENITEZ ORTIZ, W., ROY G.L. Peripartum concentrations of placental protein hormones (bPL and bPAG) in Holstein and Hereford recipients carrying pubered Holstein fetuses. *Theriogenology*, 35, 1991.

- HASSELINK, J.W. Pseudopregnancy in the goat: diagnosis, incidence, treatment and some aspects of the aethiology of hydrometra. *These Doctorat.* Uthecht University, 1994.
- HAYDEN, T.J., THOMAS, C.R., FORYSTY, I.A. Effect of number of young born (little size) on milk yield of goats: Role for placental lactogen. *J. Dair. Sci.*, 62:53-57, 1979.
- HAYDEN, T.J., THOMAS, C.R., SMITH, S.V., FORSYTH, A.A. Placental lactogen in the goat in relation to stage of gestation, number of fetuses, metabolites, progesterone and time of day. *J. Endocr.*, 86:279-290, 1980.
- HUMBLOT, P., DE MONTIGNY, G., JEANGUYOT, N., TETEDOIE, F., PAYEN, B., THIBIER, M., SASSER, R.G. Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in french alpine goats throughout gestation. *J. Reprod. Fert.*, 89:205-212, 1990.
- IRVING, G., JONES, D.E., KNIFTON, A. Progesterone concentration in the peripheral plasma of pregnant goats. *J. Endocr.*, 53:447-452, 1972.
- JARRELL, V.L., DZIUK, P.J. Effect of number of corpora lutea and fetuses on concentrations of progesterone in blood of goats. *J. Anim. Sci.*, 69:770-773, 1991.
- MURRAY, R.D., NEWSTEAD, R. Determination of steroid hormones in goats' milk and plasma as an aid to pregnancy diagnosis using an ELISA. *Vet. Rec.* 122:158-161, 1988.
- OLIVEIRA, A.P.P., LIMA, V.P.M. Aspectos econômicos da caprino-ovinocultura tropical brasileira. In: *Semana da Caprinocultura e da Ovinocultura Tropical Brasileira*, 1, 1994. Anais. Sobral: EMBRAPA-CNPC, p. 7-46.
- OLTNER, R., EDQUIST, L.E. Changes in plasma progesterone levels during storage of heparinized whole blood from cow, horse, dog and pig. *Acta Vet. Scand.*, 23:1-8, 1982.

- OWENS, R.E., ATKINS, D.T., RAHE, C.H., FLEEGER, J.L., HARMS, P.G. Time-dependent loss of radioimmunoassayable levels of progesterone following ambient temperature incubation of heparinized bovine blood. *Theriogenology*, 13:305-309, 1980.
- PEAKER, M. Gestation period and litter size in the goat. *Brit. Vet. J.*, 134:379-383, 1978.
- RANILLA, M.J., SULON, J., CARRO, M.D., MANTECON, A.R., BECKERS, J.F. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in churra and merino sheep. *Theriogenology*, 42:537-545, 1994.
- RANILLA, M.J., SULON, J., MANTECON, A.R., BECKERS, J.F., CARRO, M.D., Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Rum. Res.* 24:125-131, 1997.
- RODBARD, D. Statistical quality control and routine data precessing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* 10:1255-1270, 1974.
- RUDER, C.A., STELLFLUG, J.N., DAHMEN, J.J., SASSER, R.G. Detection of pregnancy in sheep by radioimmunoassay of sera for Pregnancy-Specific Protein B. *Theriogenology*, 29:905-912, 1988.
- SOUZA NETO, J. *Características da caprinocultura leiteira no Estado de Pernambuco*. Boletim de Pesquisa 4, EMBRAPA-CNPC, 1987.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 Edition. SAS Institute, Cary, NC, 1988.
- THORBURN, G.D., SCHNEIDER, W. The progesterone concentration in the plasma of goat during the oestrus cycle and pregnancy. *J. Endocr.*, 52:23-56, 1972.
- THORELL, J.I., JOHANSSON, B.G. Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochem. Bioph. Acta.*, 251:363-369, 1971.

- VAHDAT, F., HURTTGEN, J.P., WHITMORE, H.L., JOHNSTON, S.D., KETELSEN, C.L. Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. *Theriogenology*, 12:371-374, 1979.
- VAHDAT, F., HURTTGEN, J.P., WHITMORE, H.L., SEGUIN, B.E., JOHNSTON, S.D. Decline in assayable progesterone in bovine plasma: effect of time, temperature, anticoagulant, and presence of blood cells. *Am. J. Vet. Res.*, 42:521-522, 1981.
- VAN DER MOLEN, H.J., GROEN, D. Interconversion of progesterone and 20α -dihydroprogesterone and of androstenedione and testosterone *in vitro* by blood and erythrocytes. *Acta Endocr.*, 58:419-444, 1968.
- ZARCO, L., STABENFELDT, G.H., KINDAHL, H., QUIRKE, J.F., GRANSTROM, E. Persistence of luteal activity in the non-pregnant ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, 7:245-267, 1984.
- ZOLI, A.P., DEMEZ, P., BECKERS, J.F., REZNIK, M., BECKERS, J.F. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentalome. *Theriogenology*, 46:623-629, 1992a.
- ZOLI, A.P., GUILBAULT, L.A., DELAHAUT, P., BENITEZ ORTIZ, W., BECKERS, J.F. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.*, 46:83-92, 1992b.
- ✶ZOLI, A.P., BECKERS, J.F., ECTORS, F. Isolement et caractérisation partielle d'une glycoprotéine associée à la gestation chez la brebis. *Ann. Méd. Vét.*, 139:177-184; 1995.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

- ⇒ O sistema de dosagem radioimunológica heteróloga utilizado para dosagem de PAG em caprinos mostrou ser um sistema sensível e preciso para mensuração das concentrações periféricas de PAG na circulação de fêmeas gestantes.
- ⇒ A dosagem radioimunológica heteróloga de PAG permitiu a distinção entre fêmeas gestantes e não-gestantes a partir do 24^o dia pós-inseminação.
- ⇒ Os perfis sorológicos de PAG e de P4 durante a gestação foram similares para cabras Moxotó e Canindé, sendo que para a PAG, as concentrações observadas em cabras com gestações múltiplas foram superiores às observadas em cabras com gestações simples.
- ⇒ Tanto nas cabras Moxotó quanto nas cabras Canindé, as concentrações de PAG decresceram rapidamente após o parto, sendo as menores concentrações observadas na 4^a semana pós-parto.

PERSPECTIVAS

A utilização da dosagem radioimunológica oferece sensibilidade e precisão para a detecção da PAG na circulação periférica de ruminantes. Esta técnica pode e deve ser utilizada como método de diagnóstico de gestação em rebanhos caprinos, o que abre grandes perspectivas para sua utilização a nível de campo.

BIBLIOGRAFIA GERAL

- AILENBERG, M., SHEMESH, M. Partial purification of a chorionic gonadotropin-like protein from bovine cotyledons. *Biol. Reprod.*, 28:517-522, 1983.
- AKASU, M.O., OSUAGWUH, A.I.A., AKPOKOOSE, J.U., EGBUNIKE, G.N. Ovarian activities of the west african dwarf goat (*Capra hircus*) during oestrous. *J. Reprod. Fert.*, 78:459-462, 1986.
- ALLEN, W.R., MOOR, R.M. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J. Reprod. Fert.*, 29:313-316, 1972.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: IBGE, 1994.
- BAIRD, D.T. Lutetrophic control of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:95-102, 1992.
- BARIL, G., BREBION, P., CHESNÉ, P. *Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre*. Roma: FAO, 1993.
- BAUD, M., COHEN, R., DUMOND, G., MERCIER, M., VASSALT, A. Protocoles d'évaluation de la limite de détection d'une méthode analytique. *Immunoanal. Biol. Spec.*, 14:17-27, 1989.
- BAZER, F.W. Establishment of pregnancy in sheep and pigs. *Reprod. Fert. Develop.*, 1:237-242, 1989.
- BAZER, F.W., FIRST, N.L. Pregnancy and parturition. *J. Anim. Sci.*, 57:425-460, Suppl. 2, 1983.
- BAZER, F.W., OTT, T.L., SPENCER, T.E. Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses: signals from the trophoblast. *Theriogenology*, 41:79-94, 1994.
- BAZER, F.W., GEISERT, R.D., ZAVY, M.T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E.S.E. (ed.), *Fisiologia da Reprodução*. 6 ed. São Paulo: Editora Manole, 1995, p. 191-216.

- BEAL, W.E., LUKASZEWSKA, J.H., HANSEL, W. Luteotropic effects of bovine blastocysts. *J. Anim. Sci.*, 52:567-574, 1981.
- BECKERS J.F. L'hormone placentaire somato-mammotrope bovine. *Thèse Doctorat*. Université de Liège, 1983.
- BECKERS, J.F., DE COSTER, R., WOUTERS-BALLMAN, P., FROMONT-LIENARD, C, VAN DER ZWALMEN, P., ECTORS, F. Dosage radioimmunologique de l'hormone placentaire somatotrope et mammotrope bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 126:9-21, 1982.
- BECKERS, J.F., VERSTEGEN, J., DEWULF, M., WOUTERS-BALLMAN, P., ECTORS, F. Purification of bovine chorioc gonadotrophin (bCG). In: First European Congress of Endocrinology, 1987, Copenhagen.
- BECKERS, J.F., WOUTERS-BALLMAN, P., ECTORS, F. Isolation and radioimmunoassay of a bovine pregnancy specific protein. *Theriogenology*, 29:219 (abstract), 1988.
- BELLAVER, C., NUNES, J.F. Manejo da amamentação e suas influências sobre cabritos e cabras. *Pesq. Agrop. Bras.*, 17:157-161, 1982.
- BENITEZ ORTIZ, W. Diagnostic de gestation et etude de la mortalité embryonnaire chez les ruminants par dosage de la pregnancy associated glycoprotein (PAG). *Thèse Doctorat*. Université de Liège, 1992.
- BISSON B. Diagnostic de gestation chez la vache par dosage d'une protéine trophoblastique associée à la gestation (bPAG): bovine Pregnancy associated glycoprotein. *Thèse Doctorat*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 1992.
- BJÖRKMAN, N. Placentação. In: DELLMANN, H.D., BROWN, E.M. (eds.), *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 1982, p. 278-294.

- BOHN, H. Biochemistry of placental proteins. In: BISCHOF, P., KLOPPER, A. (eds.), *Proteins of the placenta: biochemistry, biology and clinical application*. Berlin: Karger-Basel, 1985, p. 1-25.
- BOLANDER, F.F.Jr., FELLOWS, R.E. Purification and characterization of bovine placental lactogen. *J. Biol. Chem.*, 251:2703-2708, 1976.
- BONDIOLI, K.R., WESTHUSIN, M.E., LOONEY, C.R. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33:165-174, 1990.
- BOSC, M., GUILLIMIN, P., BOURGY, G., PIGNON, P. Hourly distribution of time of parturition in the domestic goat. *Theriogenology*, 30:23-33, 1988.
- BOSHIER, D.P. A histological and histochemical examination of implantation and early placentome formation in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 19:51-61, 1969.
- BOSU, W.T.K, GARIBAY, J.A.S., BARKER, C.A.V. Peripheral plasma levels of progesterone in pregnant goats and in pregnant goats treated with prostaglandin F₂ α . *Theriogenology*, 131-148, 1978.
- BULMAN, D.C., LAMMING, G.E. Cases of prolonged luteal activity in the non-pregnant dairy cow. *Vet. Rec.*, 100:550-552, 1977.
- BUTLER, J.E., HAMILTON, W.C., SASSER, R.G., RUDER, C.A., HASS, G.M., WILLIAMS, R.J. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol. Reprod.*, 26:925-933, 1982.
- BUTTLE, H.L., FORSYTH, I.A., KNAGGS, G. Plasma prolactin measured by radioimmunoassay and bioassay in pregnant and lactating goats and the occurrence of a placental lactogen. *J. Endocr.*, 53:141-146, 1972.
- BUTTLE, H.L., FORSYTH, I.A. Placental lactogen in the cow. *J. Endocr.*, 68:141-146, 1976.

- CARD, C.E., BUTLER, W.R., CURRIE, W.B., MICHEL, F. Caprine placental lactogen (PL): fetomaternal levels, short term changes and ketosis. *Biol. Reprod.*, 38:138 (abstract), Suppl. 1, 1988.
- CAVANAGH, A.C. Production *in vitro* of mouse early pregnancy factor and purification to homogeneity. *J. Reprod. Fert.*, 71:581-592, 1984.
- CHAN, J.S.D., ROBERTSON, H.A., FRIESEN, H.G. The purification and characterization of ovine placental lactogen. *Endocrin.*, 96:65-76, 1976.
- CHAN, J.S.D., ROBERTSON, H.A., FRIESEN, H.G. Maternal and fetal concentration of ovine placental lactogen measured by radioimmunoassay. *Endocrin.*, 102:1606-1613, 1978.
- CHARD, T. The background to immunoassay. In: BURDON, R.H., VAN KNIPPENBERG, P.H. (eds.), *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. 3 ed. New York: Elsevier Publishers, 1989, p.1-25.
- CHARD, T., GRUDZINSKAS, J.G. Placental and Pregnancy-Associated Proteins. Control mechanisms and clinical application. In: BISCHOF, P., KLOPPER, A. *Proteins of the placenta: biochemistry, biology and clinical application*. New York: Karger-Basel, 1985, p. 102-113.
- CHEMINEAU, P., GAUTHIER, D., POIRIER, J.C., SAUMANDE, J. Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17 β and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology*, 17: 313-323, 1982.
- CHEMINEAU, P., COGNIÉ, Y., GUÉRIN, Y., ORGEUR, P., VALLET, J.C. *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*. Roma: FAO, 1991.

- CHEMINEAU, P., DELGADILLO, J.A. Neuroendocrinologie de la reproduction chez les caprins. *INRA Prod. Anim.*, 7:315-326, 1994.
- COOKE, R.G., KNIFTON A. The effect of intra-aortic prostaglandin F₂ α on uterine motility in pregnant goats. *J. Reprod. Fert.*, 59:347-350, 1980.
- COOKE, R.G., HOMEIDA, A.M. Prevention of the luteolytic action of oxytocin in the goat by inhibition of prostaglandin synthesis. *Theriogenology*, 20:363-365, 1983.
- CROZET, N. La fécondation *in vivo* et *in vitro*. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 315-338.
- CURRIE, W.B., THORBURN, G.D. Induction of premature parturition in goats by prostaglandin F₂ α administered into the uterine vein. *Prostaglandins*, 4:201-214, 1973.
- CURRIE, W.B., THORNBURN, G.D. Parturition in goats: studies on the interactions between the foetus, placenta, prostaglandin F and progesterone before parturition, at term or at parturition induced prematurely by corticotrophin infusion of the foetus. *J. Endocr.*, 73: 263-278, 1977.
- CURRIE, W.B., CARD, C.E., MICEL, F.J., IGNOTZ, G. Purification, partial characterization, and development of a radioimmunoassay for goat placental lactogen. *J. Reprod. Fert.*, 90:25-36, 1990.
- DELOUIS, C., RICHARD, P. La lactation. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. (eds.), *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 487-514.
- DELPINO, A., GONZÁLEZ-STAGNARO, C. Évaluación del comportamiento reproductivo en pequeños rumiantes tropicales utilizando los perfiles de progesterona. *Revista Científica*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidade del Zulia 3:231-248, 1993.
- DENT, J. Ultrastructural changes in the intercotyledonary placenta of the goat during early pregnancy. *J. Anat.*, 114:245-259, 1973.

- DERIVAUX, J., ECTORS, F., BECKERS, J.F. The ruminant placenta: structure and endocrine function. *Monography IRSIA*, Bruxelles, 1988.
- DIAL, G.D., WISEMAN, B.S., OTT, R.S., SMITH, A.L., HIXON, J.E. Absence of sexual dimorphism in the goat: induction of luteinizing hormone discharge in the castrated male and female and in intersex with estradiol benzoate. *Theriogenology*, 23:351-360, 1985.
- DOBSON, H., DAVIES, D.A.R., WARD, W.R., WINTER, A.C., HUMBLLOT, P. Pregnancy specific protein B, oestrone sulphate and echography as possible indices of embryonic death and fetal number in prolific ewes. *J. Reprod. Fert.*, 47 (abstract), 1993.
- DRIANCOURT, M.A., GOUGEON, A., ROYÈRE, D., THIBAUT, C. La fonction ovarienne. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. (eds.), *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 273-298.
- DUELLO, T.M., BYATT, J.C., BREMEL, R.D. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentome. *Endocrin.*, 119:1351-1355, 1985.
- DUNBAR, M.M., WONG, T.S., RUDER-MONTGOMERY, C.A., CHEW, B.P., SASSER, R.G. Partial characterization of the immunosuppressive properties of Pregnancy-Specific Protein B (PSPB). *Theriogenology*, 33:220, 1990.
- ECKBLAD, W.P., SASSER, R.G., RUDER, C.A., PANLASIGUI, P., KUCZYNSKI, T. Localization of pregnancy-specific protein B (PSPB) in bovine placental cells using a glucose oxidase-anti-glucose oxidase immunohistochemical stain. *J. Anim. Sci.*, 61: 149, Suppl. 1, 1985.
- ECTORS, F.J., SCHMIDT, M., SULON, J., DEVAL, A., REMY, B., AVERY, B., BECKERS, J.F. bPAG profiles in recipient heifers after of IVF and nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, 45:283, 1996.

- ELEY, R.M., THATCHER, W.W., BAZER, F.W. Hormonal and physical changes associated with bovine conceptus development. *J. Reprod. Fert.*, 55:181-190, 1979.
- ELLINWOOD, W.E., NETT, T.M., NISWENDER, G.D. Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. I. Luteotropic properties of embryonic homogenates. *Biol. Reprod.*, 21:281-288, 1979.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Relatório Técnico Anual 1980*. Sobral: EMBRAPA/CNPC, 1981.
- FASANYA, O.O.A., MOLOKWU, E.C.I., ADEGBOYE, D.S., DIM, N.I. Gross and histological changes of the postpartum genitalia of Savanna Brown goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 14:65-74, 1987.
- FIELDS, M.J., FIELDS, P.A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, 45:1295-1326, 1996.
- FLÉCHON, J.E., RENARD, J.P. A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 53:9-12, 1978.
- FLEET, I.R., HEAP, R.B. Uterine blood flow, myometrial activity and their response to adenosine during the peri-implantation period in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 65:195-205, 1982.
- FLINT, A.P.F., SHELDRIK, E.L. Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 67:215-225, 1983.
- FOOTE, W.C., RIERA, G.S., SIMPLÍCIO, A.A. The effects of tropical environment on reproduction efficiency in ruminants. In: Simpósio Internacional de Bioclimatologia animal nos Trópicos: Pequenos e Grandes Ruminantes, 1986. Anais: Fortaleza-EMBRAPA-CNPC, p. 62-86.
- FORD S.P., CHENAULT J.R. Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 62:555-562, 1981.

- GADSBY, J.E., HEAP, R.B., BURTON, R.D. Oestrogen production by blastocyst and early embryonic tissue of various species. *J. Reprod. Fert.*, 60:409-417, 1980.
- GARCIA, O.B., GARCIA, E.B. Comportamiento reproductivo de la cabra en los trópicos. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidade del Zulia* 3:143-156, 1993.
- GNATEK, G.G., SMITH, L.D., DUBY, R.T., GODKIN, J.D. Maternal recognition of pregnancy in the goat: effects of conceptus removal on interestrus intervals and characterization of conceptus protein production during early pregnancy. *Biol. Reprod.*, 41:655-663, 1989.
- GODKIN, J.D., COTE, C., DUBY, R.T. Embryonic stimulation of ovine and bovine corpora lutea. *J. Reprod. Fert.*, 54:375-378, 1978.
- GODKIN, J.D., BAZER, F.W., MOFFATT, J., SESSIONS, F., ROBERTS, R.M. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. *J. Reprod. Fert.*, 65:141-150, 1982.
- GODKIN, J.D., BAZER, F.W., ROBERTS, R.M. Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. *Endocrin.*, 114:120-130, 1984a.
- GODKIN, J.D., BAZER, F.W., THATCHER, W.W., ROBERTS, R.M. Proteins released by cultured day 15-16 conceptuses prolong luteal maintenance when introduced into the uterine lumen of cyclic ewes. *J. Reprod. Fert.*, 71:57-64, 1984b.
- GODKIN, J.D., LIFSEY, B.L., FUJII, D.K., BAUMBACH, G.A. Bovine trophoblast protein-1: purification, antibody production, uterine cell interaction and antiviral activity. *Biol. Reprod.*, 38: 79, Suppl 1., 1988.
- GONZÁLEZ-STAGNARO, C. Diagnóstico de gestación en ovejas y cabras tropicales. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidade del Zulia* 3:249-267, 1993.

- GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. Biotechnology in Agriculture, n.11. CAB International, 1994.
- GORDON, Y.B., CHARD, T. The specific proteins of the human placenta: some new hypotheses. In: KLOPPER, A., CHARD, T. *Placental proteins*. Berlin: Springer-Verlag, 1979, p. 1-21.
- GROSS, T.S., WILLIAMS, W.F. In-vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition. *J. Reprod. Fert.*, 83:565-573, 1988.
- GUILBAULT, L.A., THATCHER, W.W., COLLIER, R.J., WILCOX, C.J. Periparturient endocrine changes of conceptus and maternal units in Holstein heifers bearing genetically different conceptuses. *J. Anim. Sci.*, 61:1505-1515, 1985.
- GUIBAULT L.A., BECKERS J.F., ROY G.L., GRASSO F. Plasma concentration of bovine placental lactogen, prolactin and prostaglandins during the periparturient period in ayrshire heifers bearing different breeds of fetus. *Theriogenology*, 29: 255 (abstract), 1988.
- GUILBAULT, L.A., BECKERS, J.F., LAPIERRE, S., ZOLI, A.P., BENITEZ ORTIZ, W., ROY G.L. Peripartum concentrations of placental protein hormones (bPL and bPAG) in Holstein and Hereford recipients carrying pubered Holstein fetuses. *Theriogenology*, 35, 1991.
- GUILLOMOT, M., FLÉCHON, J.E., WINTENBERGER-TORRES, S.
 * Conceptus attachment in the ewe: an ultrastructural study. *Placenta*, 2:169-182, 1981.
- GUILLOMOT, M., FLÉCHON, J.E., LEROY, E. Développement et implantation du blastocyste. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 377-402.
- GUIMARÃES FILHO, C. *Eficiência reprodutiva de caprinos no Nordeste Semi-Árido: limitações e possibilidades*. Documentos 20, EMBRAPA-CPATSA, 1983.

- GUIMARÃES FILHO, C., MAIA, A.M., PADILHA, T.N., ALBUQUERQUE, S.G., FIGUEIREDO, E.A.P. *Efeito da suplementação volumosa e mineralização mais vermifugação no desempenho de ovinos e caprinos: Performance reprodutiva*. Boletim de Pesquisa 16, EMBRAPA-CPATSA, 1982.
- HAFEZ, E.S.E. Ciclos reprodutivos. In: HAFEZ, E.S.E. (ed.), *Fisiologia da Reprodução*. 6 ed. São Paulo: Editora Manole, 1995a, p. 95-114.
- HAFEZ, E.S.E. Foliculogênese, maturação do ovo e ovulação. In: HAFEZ, E.S.E. (ed.), *Fisiologia da Reprodução*, 6 ed., São Paulo: Editora Manole, 1995b, p. 115-145.
- HAFEZ, E.S.E. Hormônios, fatores do crescimento e reprodução. In: HAFEZ, E.S.E. (ed.), *Fisiologia da Reprodução*, 6 ed., São Paulo: Editora Manole, 1995c, p.59-94.
- HAIGH, J.C., GATES, C., RUDER, A., SASSER, R. Diagnosis of pregnancy in wood bison using a bovine assay for Pregnancy-Specific Protein B. *Theriogenology*, 36:749-754, 1991.
- HAIGH, J.C., DALTON, W.J., RUDER, C.A., SASSER, R.G. Diagnosis of pregnancy in moose using a bovine assay for pregnancy-specific protein B. *Theriogenology*, 1993.
- HANSEN, P.J., SKOPETS, B. Temporal relationship between progesterone and uterine lymphocyte-inhibitory activity. *Vet. Rec.*, 131:371-372, 1992.
- HARIDON, R.M., HUYNH, L., ASSAL, N.E., MARTAL, J. A single intrauterine infusion of sustained recombinant ovine interferon- τ extends copus luteum lifespan in cyclic ewes. *Theriogenology*, 1031-1045, 1995.
- HASSELINK, J.W. Pseudopregnancy in the goat: diagnosis, incidence, treatment and some aspects of the aethiology of hydrometra. *These Doctorat*. Uthecht University, 1994.
- HAYDEN, T.J., THOMAS, C.R., FORYSTY, I.A. Effect of number of young born (little size) on milk yield of goats: Role for placental lactogen. *J. Dair. Sci.*, 62:53-57, 1979.

- HAYDEN, T.J., THOMAS, C.R., SMITH, S.V., FORSYTH, A.A.
Placental lactogen in the goat in relation to stage of gestation, number of fetuses, metabolites, progesterone and time of day. *J. Endocr.*, 86:279-290, 1980.
- HELMER, S.D., HANSEN, P.J., THATCHER, W.W., ROBERTS, R.M., BAZER, F.W. Similarities between ovine and bovine conceptus secretory proteins (oCSP, bCSP) associated with luteal maintenance. *J. Anim. Sci.*, 61:400-401, Suppl. 1, 1985.
- HELMER, S.D., HANSEN, P.J., ANTHONY, R.V., THATCHER, W.W., BAZER F.W., ROBERTS, R.M. Identification of bovine trophoblast protein-1, a secretory protein immunologically related to ovine trophoblast protein-1. *J. Reprod. Fert.*, 79:83-91, 1987.
- HELMER, S.D., GROSS, T.S., HANSEN, P.J., THATCHER, W.W. Bovine conceptus secretory proteins (bCSP) and bovine trophoblast protein-1 (bTP-1), a component of bCSP, alter endometrial prostaglandin (PG) secretion and induce an intracellular inhibitor of PG synthesis *in vitro*. *Biol. Reprod.* 38:153, Suppl. 1, 1988.
- HEYMAN, Y., CAMOUS, S., FEURE, J., MEZIOU, W., MARTAL, J. Maintenance of corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles in cyclic cows and ewes. *J. Reprod. Fert.*, 70:379-383, 1984.
- HICKEY, G.J., HANSEL, W. In-vitro synthesis of a low molecular weight lipid-soluble luteotropic factor by conceptuses of cows at day 13-18 of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 80:569-576, 1987.
- HOMEIDA, A .M., COOKE, R.G. Peripheral plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α and progesterone around luteolysis and during early pregnancy in the goat. *Prostaglandins*, 24:313-321, 1982.
- HOUSTON, D.B., ROBBINS, C.T., RUDER, C.A., SASSER, R.G. Pregnancy detection in mountain goats by assay for Pregnancy-Specific Protein B. *J. Wildl. Maneg.*, 50:740-742, 1986.

- HRADECKY, P., MOSSMAN, H.W., STOTT, G.G. Comparative development of ruminant placentomes. *Theriogenology*, 29:715-729, 1988.
- HUMBLLOT, P., CAMOUS, S., MARTAL, J., CHARLERY, J., JEANGUYOT, N., THIBIER, M., SASSER, G. Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows. *Theriogenology*, 30:257-267, 1988a.
- HUMBLLOT, P., CAMOUS, S., MARTAL, J., CHARLERY, J., JEANGUYOT, N., THIBIER, M., SASSER, G. Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, 83:215-223, 1988b.
- HUMBLLOT, P., DE MONTIGNY, G., JEANGUYOT, N., TETEDOIE, F., PAYEN, B., THIBIER, M., SASSER, R.G. Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in french alpine goats throughout gestation. *J. Reprod. Fert.*, 89:205-212, 1990.
- IMAKAWA, K., ANTHONY, R.V., KAZEMI, M., MAROTTI, K.R., POLITES, H.G., ROBERTS, R.M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature*, 330:377-379, 1987.
- IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fert.*, 34:39-54. 1987.
- IRVING, G., JONES, D.E., KNIFTON, A. Progesterone concentration in the peripheral plasma of pregnant goats. *J. Endocr.*, 53:447-452, 1972.
- IVANI, K.A., RUDER, C.A., SASSER R.G. Serum concentrations of a bovine pregnancy-specific protein during gestation. *J. Dair. Sci.*, 387, 1984.
- JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E.S.E. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In: HAFEZ, E.S.E. (ed.), *Fisiologia da Reprodução*. 6 ed. São Paulo: Editora Manole, 1995a, p.217-240.

- JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E.S.E. Ovinos e caprinos. In: HAFEZ, E.S.E. (ed.), *Fisiologia da Reprodução*. 6 ed. São Paulo: Editora Manole, 1995b, pp.335-347.
- JAROSZ, S.J., DEANS, R.J., DUKELOW, W.R. The reproductive cycle of the Afrikan Pigmy and Toggenburg goat. *J. Reprod. Fert.*, 24:119-123, 1971.
- JARRELL, V.L., DZIUK, P.J. Effect of number of corpora lutea and fetuses on concentrations of progesterone in blood of goats. *J. Anim. Sci.*, 69:770-773, 1991.
- KELLY, P.A., ROBERTSON, H.A., FRIESEN, H.G. Temporal pattern of placental lactogen and progesterone secretion in sheep. *Nature*, 248:435-437, 1974.
- KING, G.J., ATKINSON, B.A., ROBERTSON, H. Development of the bovine placentome during the second month of gestation. *J. Reprod. Fert.*, 55: 173-180, 1979.
- KING, G.J., ATKINSON, B.A., ROBERTSON, H. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. *J. Reprod. Fert.*, 59: 95-100, 1980.
- KING, G.J., ATKINSON, B.A., ROBERTSON, H. Implantation and early placentation in domestic ungulates, *J. Reprod. Fert.*, 17-30, Suppl. 31, 1982.
- KIRAFÖFE, G.H., WRIGHT, J.M., SCHALLES, R.R., RUDER, C.A., PARISH, S., SASSER, R.G. Pregnancy-Specific Protein B in serum of postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 71:2199-2205, 1993.
- KOCH, E., MORTON, H., ELLENDORFF, F. Early Pregnancy Factor: biology and practical application. *Brit. Vet. J.*, 139:52-58, 1983.
- KOLIGIAN, K.B., STORMSHAK F. Progesterone synthesis by ovine fetal cotyledons *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 42:439-443, 1976.
- LAWSON, J.L., FORREST, D.W., SHELTON, M. Reproductive response to suckling manipulation in Spanish goats. *Theriogenology*, 21:747-755, 1984.

- LEYMARIE, P., MARTAL J. Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif. In: THIBAUT, C. & LEVASSEUR, M.C. (eds.), *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 403-422.
- MALTIER, J.P., LEGRAND, C., BREUILLER, M. La parturition. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 465-486.
- MARTAL, J., DJIANE, J. The production of chorionic somatomammotropin in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 49:285-289, 1977.
- MARTAL, J., LACROIX, M.C., LOUDES, C., SAUNIER, M., WINTERBERGER-TORRES, S. Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 56:63-73, 1979.
- MARTAL, J., CÉDART, L. Endocrinologie placentaire. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 223-245.
- MAURER, R.R., RUDER, C.A., SASSER, R. Effectiveness of the Protein B radioimmunoassay to diagnose pregnancy in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 61:390, Suppl. 1, 1985.
- MCCRAKEN, J.A., SCHRAMM, W., OKULICZ, W.C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂ α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.*, 7:31-55, 1984.
- MEDEIROS, L.P., GIRÃO, R.N., GIRÃO, E.S., PIMENTEL, J.C.M. *Caprinos: princípios básicos para sua exploração*. EMBRAPA-CPAMN/SPI, 1994.
- MÉNÉZO, Y., RENARD, J.P. La vie de l'oeuf avant l'implantation. In: THIBAUT, C. LEVASSEUR, M.C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 339-357.

- MORGAN, G., WOODING, F.B.P., BECKERS, J.F., FRIESEN, H.D. Na immunological cryo-ultrstructural study of a sequential appearance of proteins in placental binucleate cells in early pregnancy in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 86:745-752, 1989.
- MORI, Y., KANO, Y. Changes in plasma concentrations of LH, progesterone and oestradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrous and time of ovulation in the Shiba goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fert.*, 72:223-230, 1984.
- MORTON, H., MORTON, D.J., ELLENDORFF, F. The appearance and characteristics of early pregnancy factor in the pig. *J. Reprod. Fert.*, 69:437-446, 1983.
- MORTON, H., NANCARROW, C.D., SCARAMUZZI, R.J., EVISON, B.M., CLUMIE, G.J.A. Detection of early pregnancy in sheep by the rosette inhibition test. *J. Reprod. Fert.*, 56:75-80, 1979.
- MURRAY, R.D., NEWSTEAD, R. Determination of steroid hormones in goats' milk and plasma as an aid to pregnancy diagnosis using an ELISA. *Vet. Rec.* 122:158-161, 1988.
- NANCARROW, C.D., WALLACE, A.L.C., GREVAL, A.S. The early pregnancy factor of sheep and cattle. *J. Reprod. Fert.*, 191-199, Suppl. 30, 1981.
- NEWTON, G.R., OTT, T.L., WOLDESENBET, S., SHELTON, A.H., BAZER, F.W. Biochemical and immunological properties of related small ruminant trophoblast interferons. *Theriogenology*, 46:703-716, 1996.
- NORTHEY, D.L., FRENCH, L.R. Effect of embryo removal and intrauterine infusion of embryonic homogenates on the lifespan of the bovine corpus luteum. *J. Anim. Sci.*, 50:298-302, 1980.
- OLIVEIRA, A.P.P., LIMA, V.P.M. Aspectos econômicos da caprino-ovinocultura tropical brasileira. In: *Semana da Caprinocultura e da Ovinocultura Tropical Brasileira*, 1, 1994. Anais. Sobral: EMBRAPA-CNPC, p. 7-46.

- OLLIVIER, M., GALL, L. La cellule. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 171-188.
- OLTNER, R., EDQUIST, L.E. Changes in plasma progesterone levels during storage of heparinized whole blood from cow, horse, dog and pig. *Acta Vet. Scand.*, 23:1-8, 1982.
- OSBURN, D.A., BECKERS, J.F., SULON, J., GASSETT, J.W., MULLER, L.I., MURPHY, B.P., MILLER, K.V., MARCHINTON, R.L. Use of glycoprotein assays for pregnancy diagnosis in white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.*, 60:388-393, 1996.
- O'SHEA, J.D., RODGERS, R.J., D'OCCHIO, M.J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *J. Reprod. Fert.*, 85:483-487, 1989.
- OWENS, R.E., ATKINS, D.T., RAHE, C.H., FLEEGER, J.L., HARMS, P.G. Time-dependent loss of radioimmunoassayable levels of progesterone following ambient temperature incubation of heparinized bovine blood. *Theriogenology*, 13:305-309, 1980.
- PATEL, O.V., DOMEKI, I., SASAKI, N., TAKAHASHI, T., HIRAKO, M., SASSER, R.G., HUMBLLOT, P. Effect of fetal mass, number and stage of gestation on Pregnancy-Specific Protein B concentrations in the bovine :827-833, 1995.
- PEAKER, M. Gestation period and litter size in the goat. *Brit. Vet. J.*, 134:379-383, 1978.
- PERRY, J.S., HEAP, R.B., AMOROSO, E.C. Steroid hormone production by pig blastocysts. *Nature*, 245:45-47, 1973.
- PRATHER, R.S., FIRST, N.L. A review of early mouse embryogenesis and its applications to domestic species, *J. Anim. Sci.*, 66:2626-2635, 1988.
- RANILLA, M.J., SULON, J., CARRO, M.D., MANTECON, A.R., BECKERS, J.F. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in churra and merino sheep. *Theriogenology*, 42:537-545, 1994.

- RANILLA, M.J., SULON, J., MANTECON, A.R., BECKERS, J.F., CARRO, M.D., Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Rum. Res.*, 24:125-131, 1997.
- REDDY, S., WATKINS, W.B. Immunofluorescence localization of ovine placental lactogen. *J. Reprod. Fert.*, 52:173-174, 1978.
- REIMERS, T.J., SASSER, R.G., RUDER, C.A. Production of pregnancy-specific protein by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol. Reprod.* 32:55, Suppl. 1, 1985a.
- REIMERS, T.J., ULLMANN, M.B., HANSEL, N. Progesterone and prostanoid production of bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol. Reprod.* 33:1227-1236, 1985b.
- ROBEL, P. La stéroïdogenèse: les enzymes et leur régulation génomique. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Edition Marketing, 1991, p. 127-134.
- ROBERTS, R.M., CROSS, J.C., LEAMAN, D.W. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocrin.*, 13:432-452, 1992.
- RODBARD, D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* 10:1255-1270, 1974.
- RODGERS, R.J., O'SHEA, J.D., FINDLAY, J.K., SHELDRIK, E.L. Large luteal cells: the source of luteal oxytocin in the sheep. *Endocrin.*, 113:2302-2304, 1983.
- RODGERS, R.J., WATERMAN, M.R., SIMPSON, E.R. Cytochromes P450_{scc} P450_{17 α} adrenoxin and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome P450 reductase concentrations. *Endocrin.*, 118:1366-1374, 1986.
- ROWELL, J.E., FLOOD, P.F., RUDER, C.A., SASSER, R.G. Pregnancy-Specific Protein in the plasma of captive muskoxen. *J. Wildl. Manag.*, 53:899-901, 1989.

- RUDER, C.A., SASSER, K.A., IVANI, K.A., PANLASIGUI, P.M., DAHMEN, J.J., STELLFLUG, J.N. Diagnosis of pregnancy in sheep by measurement of a blood antigen that cross reacts in a radioimmunoassay for a bovine pregnancy-specific protein. *J. Dair. Sci.*, 541 (abstract), 1984.
- RUDER, C.A., SASSER, R.G. Source of bovine pregnancy-specific protein B (bPSPB) during the postpartum period and estimation of half-life of bPSPB. *J. Anim. Sci.*, 63:428, Suppl. 1, 1986.
- RUDER, C.A., STELLFLUG, J.N., DAHMEN, J.J., SASSER, R.G. Detection of pregnancy in sheep by radioimmunoassay of sera for Pregnancy-Specific Protein B. *Theriogenology*, 29:905-912, 1988.
- SACHDEVA, K.K., SENGAR, O.P.S., SINGH, S.N., LINDAHL, I.L. Effect of plane of nutrition on the reproductive performance of does. *J. Agric. Sci.*, 80:375-379, 1973.
- SALAMONSEN, L.A., HAMPTON, A.L., SUZUKI, R., NAGASE, H. Modulation of production of matrix metalloproteinases from ovine endometrial cells by ovine trophoblast interferon. *J. Reprod. Fert.*, 102:155-162, 1994.
- SASSER, R.G., RUDER, C.A., IVANI, K.A., BUTLER, J.E., HAMILTON, W.C. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel Pregnancy-Specific Protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.*, 5:936-942, 1986.
- SASSER, R.G., CROCK, J., RUDER-MONTGOMERY, C.A. Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 109-113, Suppl. 37, 1989.
- SAUMANDE, J. La folliculogénese chez les ruminants. *Rec. Vet.*, 167:205-218, 1991.
- SHIU, R.P.C., KELLY, P.A., FRIESEN, H.G. Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones. *Science*, 180:968-971, 1973.

- SILVIA, W.J., FITZ, T.A., MAYAN, M.H., NISWENDER, G.D. Cellular mechanisms involved in luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, 7:57-74, 1984.
- SIMPLÍCIO, A.A. Reprodução na espécie caprina. *Rev. Bras. Reprod. Animal.*, 3:7-16, 1980.
- SIMPLÍCIO, A.A. Reproduction in three native genotypes of goats under two feeding management systems in Northeast Brazil; and luteinizing hormone profiles during the estrous cycle and seasonal anestrus in Spanish Goats in the United States. *These Doctorat.* Utah State University, 1985.
- SMITH, M.F. Recent advances in corpus luteum physiology. *J. Dair. Sci.*, 69:911-926, 1986.
- SOUZA NETO, J. *Características da caprinocultura leiteira no Estado de Pernambuco.* Boletim de Pesquisa 4, EMBRAPA-CNPC, 1987.
- STABENFELDT, G.H., EDQUIST, L.E. Processos reprodutivos na fêmea. In: SWENSON, M.J. *Fisiologia dos Animais Domésticos.* 10 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988, p. 689-717.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 Edition. SAS Institute, Cary, NC, 1988.
- STEPHANOU, A., HANDWERGER, S. Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrin.*, 136:933-938, 1995.
- STEVENS, V.C. Potential antifertility vaccines using antigens of hCG. In: KLOPPER, A., CHARD, T. *Placental proteins.* Berlin: Springer-Verlag, 1979, p. 43-53.
- STEWART, W.J., McCANN, S.H.E., BARKER, P.J., LEE, K.E., LAMMING, G.E., FLINT, A.P.F. Interferon sequence homology and receptor binding activity of ovine trophoblast antiluteolytic protein. *J. Endocr.*, 115:813-815, 1987.

- SZAFRANSKA, B., XIE, S., GREEN, J., ROBERTS, R.M. Porcine pregnancy-associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophectoderm. *Biol. Reprod.*, 53:21-28, 1995.
- THORBURN, G.D., SCHNEIDER, W. The progesterone concentration in the plasma of goat during the oestrus cycle and pregnancy. *J. Endocr.*, 52:23-56, 1972.
- THORELL, J.I., JOHANSSON, B.G. Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochem. Biophys. Acta.*, 251:363-369, 1971.
- TIELGY, A.H., FATHALLA, M., OMAR, M.A., AL-DAHASH, S. The clinical and morphological characteristics of the uterus of the goat during the period of involution. *Can. Vet. J.*, 23:138-140, 1982.
- ULMANN, M.B., REIMERS, T. Progesterone production by bunucleate trophoblastic cells of cow. *J. Reprod. Fert.*, 173-179, Suppl. 1, 1989.
- UMO, I., FITZPATRICK, R.J., WARD, W.R. Parturition in the goat: plasma concentrations of prostaglandin F and steroid hormones and uterine activity during late pregnancy and parturition. *J. Endocr.*, 383-389, 1976.
- VAHDAT, F., HURTGEM, J.P., WHITMORE, H.L., JOHNSTON, S.D., KETELSEN, C.L. Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. *Theriogenology*, 12:371-374, 1979.
- VAHDAT, F., HURTGEM, J.P., WHITMORE, H.L., SEGUIN, B.E., JOHNSTON, S.D. Decline in assayable progesterone in bovine plasma: effect of time, temperature, anticoagulant, and presence of blood cells. *Am. J. Vet. Res.*, 42:521-522, 1981.
- VAN DER MOLEN, H.J., GROEN, D. Interconversion of progesterone and 20α -dihydroprogesterone and of androstenedione and testosterone *in vitro* by blood and erythrocytes. *Acta Endocr.*, 58:419-444, 1968.

- VAN RENSBURG, S.J. Reproductive physiology and endocrinology of normal and habitually aborting Angora goats. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 38:1-62, 1971.
- VERSTEGEN, J., FELLMANN, D., BECKERS, J.F. Immunodetection of bovine chorionic somatomammotrophin (bCS). *Acta Endocrin.*, 108:403-410, 1985.
- WANGO, E.O., WOODING, F.B.P., HEAP, R.B. The role of trophoblast binucleate cells in implantation in the goat: a quantitative study. *Placenta*, 11:381-394, 1990.
- WILKER, C., BALL, B., REIMERS, T, SASSER, G., BRUNNER, M., ALEXANDER, B., GIAKINTO, M. Use of Pregnancy-Specific Protein B and estrone sulfate for determination of pregnancy on day 49 in fallow deer (*Dama dama*). *Theriogenology*, 1993.
- WILLARD, J.M., WHITE, D.R., WESSON, C.A.R., STELLFLUG, J., SASSER, R.G. Detection of fetal twins in sheep using a radioimmunoassay for Pregnancy-Specific Protein B. *J. Anim. Sci.*, 73:960-966, 1995.
- WILTBank, M.C., NISWENDER G.D. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:103-110, 1992.
- WOODING, F.B.P. Localization of ovine placental lactogen in sheep placentomes by electron microscope immunocytochemistry. *J. Reprod. Fert.*, 62: 15-19, 1981.
- WOODING, F.B.P. The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. *J. Reprod. Fert.*, 31-39, Suppl. 31, 1982.
- WOODING, F.B.P. Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am. J. Anat.*, 170:233-250, 1984.
- WOODING, F.B.P. Current topic: the syncytiotrophoblastic placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, 13:101-113, 1992.

- WOODING, F.B.P., WATHES, D.C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J. Reprod. Fert.*, 59:425-430, 1980.
- WOODING, F.B.P., FLINT, A.P.F., HEAP, R.B., MORGAN, G., BUTTLE, H.L., YOUNG, I.R. Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. *J. Reprod. Fert.*, 76:499-512, 1986.
- WOODING, F.B.P., BECKERS, J.F. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. *Cell. Tiss. Res.*, 247:667-673, 1987.
- XIE, S., LOW, B.G., NAGEL, R.J., KRAMER, K.K., ANTHONY, R.V., ZOLI, A.P., BECKERS, J.F., ROBERTS, R.J. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the inactive members of the aspartic proteinase family. *Biochem.*, 88:10247-10251, 1991a.
- XIE, S., LOW, B., ZOLI, A.P., ROBERTS, R.M. Molecular cloning of Pregnancy-Associated Glycoproteins from cattle and sheep identity with the aspartate protease family. *Biol. Reprod.*, 194, Suppl 1, 1991b.
- XIE, S., LOW, B.G., COSBY, N.C., NAGEL, R.J. Identification of a novel cotyledonary cDNA related to but distinct from the cDNA for the Pregnancy-Associated Glycoprotein, PAG. *Biol. Reprod.*, 449, Suppl 1, 1992.
- XIE, S., NAGEL, R.J. Interconversion of metabolically-labeled forms of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) of sheep. *Biol. Reprod.*, 49, Suppl. 77, 1993.
- XIE, S., LOW, B.G., NAGEL, R.J., BECKERS, J.F., ROBERTS, R.J. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoctoderme. *Biol. Reprod.*, 51:1145-1153, 1994.

- XIE, S., NAGEL, R.J., GREEN, J., BECKERS, J.F., ROBERTS, M.R. Trophoblast-specific processing and phosphorylation of Pregnancy-Associated Glycoprotein-1 in day 15 to 25 sheep placenta. *Biol. Reprod.*, 54:122-129, 1996.
- ZARCO, L., STABENFELDT, G.H., KINDAHL, H., QUIRKE, J.F., GRANSTROM, E. Persistence of luteal activity in the non-pregnant ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, 7:245-267, 1984.
- ZARCO, L., STABENFELDT, G.H., BOSU, S., BRADFORD, G.E., KINDAHL, H. Modification of PGF 2α synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 83:527-536, 1988.
- ZOLI, A.P. Isolement, purification et caractérisation d'une protéine placentaire associée à la gestation chez les bovins. *Thèse Doctorat*. Université de Liège, 1992a.
- ZOLI, A.P. Mise en évidence d'une protéine immunologiquement apparentée à la PAG dans les gonades des ruminants. *Thèses annexes*. Université de Liège, 1992b.
- ZOLI, A.P., BECKERS, J.F., CLOSSET, J., BALLMAN-WOUTERS, P., FALMAGNE, P., ECTORS, F. Purification and characterization of a bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein. *Biol. Reprod.*, 45:1-10, 1991.
- ZOLI, A.P., DEMEZ, P., BECKERS, J.F., REZNIK, M., BECKERS, J.F. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placenta. *Theriogenology*, 46:623-629, 1992a.
- ZOLI, A.P., GUILBAULT, L.A., DELAHAUT, P., BENITEZ ORTIZ, W., BECKERS, J.F. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.*, 46:83-92, 1992b.
- ZOLI, A.P., BECKERS, J.F., ECTORS, F. Isolement et caractérisation partielle d'une glycoprotéine associée à la gestation chez la brebis. *Ann. Méd. Vét.*, 139:177-184; 1995.