

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia**

**AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DE OCITOCINA SINTÉTICA
APLICADA EM DIFERENTES FORMULAÇÕES PELA VIA
VAGINAL EM NOVILHAS GIROLANDO**

CRISTINA LOUREIRO MÜLLER PESSÔA NETTO

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2016**

CRISTINA LOUREIRO MÜLLER PESSÔA NETTO

**AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DE OCITOCINA SINTÉTICA
APLICADA EM DIFERENTES FORMULAÇÕES PELA VIA
VAGINAL EM NOVILHAS GIROLANDO**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Zootecnia.

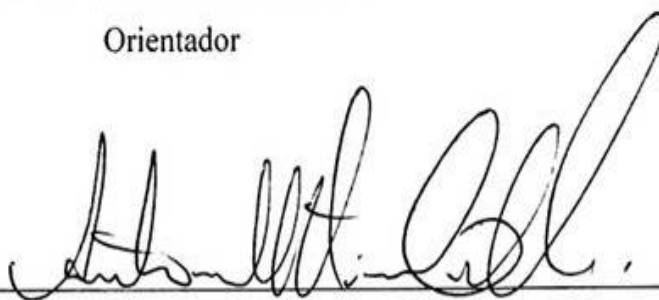
Área de Concentração: Produção Animal
Orientador: Prof. Helton Mattana Saturnino
Co-orientador: Prof. Paulo Ricardo de O. Paes
Co-orientadora: Prof. Kelly Moura Keller

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2016

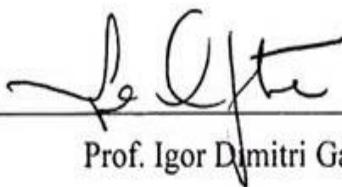
Tese defendida e aprovada em 05/08/2016, pela comissão examinadora composta pelos seguintes membros:



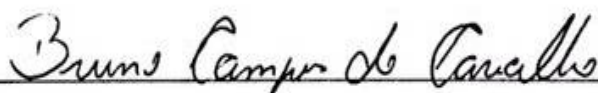
Prof. Helton Mattana Saturnino
Orientador



Prof. Antônio Último de Carvalho



Prof. Igor Dimitri Gama



Dr. Bruno Campos de Carvalho



Prof. Breno Mourão de Sousa

*“Regrets, I've had a few
But then again, too few to mention
I did what I had to do
And saw it through without exemption*

*I planned each charted course
Each careful step along the byway
And more, much more than this
I did it my way”*

*My Way,
Claude François, 1967*

Dedico este trabalho:

Ao meu marido, Caíco, que é o meu amor, amigo e companheiro de sempre, Aos meus filhos, Camila, Gustavo e Arthur, que são a luz da minha vida! Aos meus pais, Laís e Dalmo e meus irmãos, Mônica, Letícia e Guilherme, que são os meus melhores amigos.

AGRADECIMENTOS

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais por me oferecer a oportunidade de realizar um enorme sonho, que me fez melhor.

Ao Professor Helton Mattana Saturnino, pelos ensinamentos, paciência, persistência, orientação e apoio em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Muito obrigada!

Ao Professor Antônio Ultimo de Carvalho, pelos ensinamentos, pela ajuda incondicional, pelo encorajamento, pelas lições de toda natureza que me deu. O senhor foi um bom amigo!

Ao Professor Paulo Paes, que de pronto aceitou meu pedido de coordenar o meu projeto e submetê-lo a FAPEMIG.

Ao Professor Igor Dimitri Gama Duarte, que colaborou na definição das formulações de ocitocina, além de tê-las produzido, e no direcionamento da parte de farmacologia deste trabalho. Obrigada professor, sua ajuda e gentileza fizeram toda a diferença.

À professora Kelly Moura Keller, por me receber na reta final em seu laboratório e ajudar a desvendar os caminhos tortuosos para análise das minhas amostras.

Ao professor Jenner K. P. dos Reis, que participou das discussões e interpretação do kit Elisa.

Ao Professor Fernando Antônio Bretas Viana, que me ajudou e acreditou no meu trabalho. Suas ideias foram muito importantes para a definição do caminho a ser seguido. Muito obrigada!

Aos professores Ronaldo B. Reis e Sandra G. Coelho, por acreditarem no meu projeto e me estimularem a seguir em frente.

À Grazielle, que me ajudou muito no laboratório. Também nos momentos difíceis. Obrigada.

Aos funcionários da Fazenda em Igarapé. Agradeço principalmente ao Ailton, ao Airton e ao Lúcio, que me ajudaram com muita dedicação e paciência.

Agradeço a CAPES, pela bolsa de Doutorado que foi de grande ajuda neste período.

Agradeço a FAPEMIG, pela aprovação e liberação de recursos que viabilizaram este experimento, por meio do projeto APQ-01987-13.

Ao professor Ivan B. M. Sampaio e ao Danilo Bastos, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao meu Marido, Carlos Frederico, que me deu amor, segurança, suporte em casa, apoio incondicional, força para continuar e acima de equilíbrio emocional! Obrigada meu parceiro! Sem você nada disso teria acontecido.

A minha Filha Camila, que me acompanhou nos momentos em que estava mais cansada! Me ajudou, me motivou e como sempre faz, deu motivos para eu amar ainda mais a vida! Só para estar a seu lado! Filha Linda!!

Aos meus filhos Gustavo e Arthur, por me fazerem querer sempre mais da vida! Me desculpem meus filhos, se estive ausente e obrigada pelo carinho na hora da chegada!!

Aos meus Pais, Dalmo e Laís, pela força, pelos conselhos sempre acolhedores e pacíficos. Obrigada por me ensinarem a resistir.

A minha Sogra, Aparecida, que me ajudou com as crianças ou com o que fosse preciso por inúmeras vezes, para que eu pudesse concluir esta etapa. Obrigada por estar presente nas horas difíceis!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 OCITOCINA	16
3.1.1 Histórico	17
3.1.2 Biossíntese, transporte e armazenamento	18
3.1.3 Papéis fisiológicos da ocitocina.....	19
3.2 A GLÂNDULA MAMÁRIA	23
3.2.1 A lactação	26
3.2.2 A ocitocina na lactação.....	26
3.2.3 Mecanismo de ejeção do leite.....	28
3.2.4 Distúrbios de ejeção do leite.....	31
3.2.5 Ocitocina endógena	34
3.2.6 Distribuição e disponibilidade do leite na glândula mamária.....	36
3.2.7 Ocitocina exógena	37
3.3 ADMINISTRAÇÃO DE OCITOCINA E SEUS INCONVENIENTES	40
3.3.1 Administração via transmucosa.....	41
3.3.2 Anatomia e fisiologia vaginal.....	42
3.3.3 Absorção de fármacos e a via transmucosa	45
3.3.4 Incrementadores de Absorção	48
3.4 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE OCITOCINA	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 PRODUÇÃO DAS FORMULAÇÕES COM OCITOCINA	52
4.2 TESTES PILOTO	53
4.3 EXPERIMENTO (2ª FASE A CAMPO).....	55
4.3.1 Localização.....	55
4.3.2 Animais experimentais	56

4.3.3	Aplicação de ocitocina.....	56
4.3.4	Coleta das amostras, processamento e armazenamento	56
4.4	DOSAGEM DE OCITOCINA	58
4.4.1	Protocolo de preparo das amostras de plasma sem extração	58
4.4.2	Protocolo para extração de ocitocina do plasma	58
4.4.4	Procedimentos para dosagem de ocitocina	61
4.4.5	Cálculos dos resultados	63
4.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	64
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÕES.....	76
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	77
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Dosagens de ocitocina indicadas para tratar distúrbio de ejeção do leite em vacas em produtos disponíveis no comércio	38
Quadro 02- Agentes incrementadores de absorção, forma de ação e principais características	50
Quadro 03 – Variedade de protocolos em 39 trabalhos publicados sobre concentração de ocitocina no sangue de várias espécies	51
Quadro 04: Características das formulações utilizados	53
Quadro 05: Modelagem de delineamento em QL 8x8 de novilhas Girolando submetidas a oito formulações contendo ocitocina sintética	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Valores descritivos da mediana (em pg/mL), concentração de ocitocina ao longo do tempo (em minutos), valores mínimos e máximos obtidos e número de repetições	70
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01 – Concentrações plasmática médias de ocitocina em pg/mL obtidas de amostras de plasma total (sem extração), de todas as formulações aplicadas contendo 10 UI de ocitocina conforme tempo após aplicação 65
- Gráfico 2 – Concentrações plasmáticas médias de ocitocina (pg/mL de plasma – com processo de extração) de todas as formulações contendo ocitocina conforme tempo após aplicação 67
- Gráfico 3 – Concentração plasmática de ocitocina no plasma após aplicação de 10 UI pela via endovenosa 69
- Gráfico 04 – Concentrações plasmáticas médias de ocitocina ao longo do tempo obtidas com aplicações de 2 ml (10 UI) das sete formulações pela via vaginal 69
- Gráfico 05 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em glicerina 71
- Gráfico 06 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em propilenoglicol..... 72
- Gráfico 07 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em água 73
- Gráfico 08 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em PVA 74
- Gráfico 09 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) de formulação de ocitocina em CMC 74
- Gráfico 10 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) de formulação de ocitocina em DMSO 75
- Gráfico 11 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em Tween 80 ... 75
-

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – A figura ilustra a vascularização e a conexão neural direta entre hipotálamo e hipófise posterior	18
Figura 02 – Organização histológica do tecido mamário glandular	24
Figura 03 – Esquema histológico do alvéolo mamário e da célula alveolar ativa	25
Figura 04 - Alvéolo e célula secretora alveolar sob ação do Fator Inibidor da lactação (FIL)	27
Figura 05 – Mecanismo do reflexo de ejeção do leite	29
Figura 06 – Trato reprodutivo da vaca	43
Figura 07 – Esquema de suprimento e drenagem sanguínea para o trato reprodutivo da vaca	45
Figura 08 – Diversos mecanismos usados pelos fármacos para atravessar as barreiras celulares	47
Figura 09 – Sete formulações com ocitocina e ocitocina comercial utilizadas neste experimento	52
Figura 10 – Processo de evaporação de amostras de plasma após processo de extração. Evaporação manual unitária e com a utilização de equipamento adaptado.....	55
Figura 11 – Coleta, organização e acondicionamento das amostras a campo	56
Figura 12 – Esquema temporal das coletas de amostras de sangue nos animais experimentais	57
Figura 13 – Amostras para serem centrifugadas e amostras nos tubos <i>eppendorfs</i> contendo plasma	57
Figura 14 – Diluições de ocitocina padrão	61
Figura 15 – Placa de EIA pronta para ser incubada a 4°C por período de 18-24 horas.....	62
Figura 16 – Placas de EIA utilizadas para leitura de concentrações de ocitocina	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN = Acetonitrile
ACTH = Hormônio Adrenocorticotrófico
ADH = Vasopressina
ASC = Área sob a curva
Asn = asparagina
CCK = Colecistocina
CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais
CMC = Carboxi Metil Celulose
Cys = cisteína
DMSO = Dimetilsulfóxido
EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA = Ácido etilenodiaminotetracético de etilenoglicol
EIA = ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F = disponibilidade Sistêmica
FIL = Fator Inibidor da Lactação
GH = Hormônio do crescimento
Gln = glutamina
Gly = glicina
Ile = isoleucina
Leu = leucina
NH₂ = amina
ROT = receptor para ocitocina
PGF₂ α = Prostaglandina F₂ α
pH = Unidade que define a concentração de ions H⁺ em um meio
pKA = Escala de medida de acidez
POMC = Pró-opiomelanocortina
PRL = Prolactina
Pro = prolina
PVA = Álcool Polivinílico
p/v = peso por volume
QL = Quadrado Latino
RIA = Radio-Imuno-Assay
TFA= Ácido Trifluoroacetico
Tyr = tirosina
v/v = volume por volume

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi testar a viabilidade da utilização da via vaginal em fêmeas bovinas visando aplicação de ocitocina a partir de formulações específicas. A ocitocina foi utilizada associada a facilitadores de absorção e na forma injetável (como parâmetro de comparação). Foram produzidas sete formulações: ocitocina em água; ocitocina em álcool polivinílico 4% P/V; ocitocina em carboxi metil celulose 2% P/V; ocitocina em glicerina 2% V/V; ocitocina em dimetilsulfóxido 10% V/V; ocitocina em propilenoglicol 25% V/V e ocitocina em tween80 10% V/V, todas com concentração de 5 UI/mL de ocitocina. O delineamento experimental foi em quadrado latino 8x8 (oito dias, oito tratamentos e oito novilhas púberes ciclando). As administrações de ocitocina foram pela via vaginal e a ocitocina injetável comercial pela via endovenosa, todas aplicações contendo 10 UI. Amostras de sangue (n=7) foram coletadas de cada animal, no tempo 0, anterior à administração dos tratamentos, e de três em três minutos até 18 minutos. A ocitocina foi extraída do plasma e dosada utilizando o kit comercial *Oxytocin EIA*. Os resultados obtidos foram avaliados por análise estatística não paramétrica utilizando o teste *Kruskal Wallis*. Foi observada diferença estatística entre o tempo 0 e o tempo 12 minutos ($p < 0,05$) para a formulação ocitocina em glicerina, indicando que houve absorção. Concluiu-se que houve absorção através da via vaginal para esta formulação, mas ressalva-se a necessidade de mais estudos para seu emprego no manejo com as fêmeas bovinas de forma efetiva.

Palavras-chave: ocitocina, produção de leite, ordenha, girolando

ABSTRACT

The aim of this study was to test the feasibility of vaginal route in order to apply oxytocin in female bovines using specific formulations. The oxytocin was used in both its injectable form (as a comparison standard) and associated with absorption enhancers. Seven formulations were produced: oxytocin plus water; oxytocin plus polyvinyl alcohol 4% W/V; oxytocin plus carboxy methyl cellulose 2% W/V; oxytocin plus glycerin 2% V/V; oxytocin plus dimethyl sulfoxide 10% V/V; oxytocin plus propylene glycol 25% V/V and oxytocin plus tween80 10% V/V, containing all 5 IU/ml of oxytocin. The experimental design was made in an 8x8 latin square (eight days, eight treatments and eight cycling heifers). The formulations were delivered in vaginal route and the injectable oxytocin was applied intravenously, all of them having 10 IU of oxytocin. Blood samples (n=7) were collected from each animal, the first at time 0, prior to the administration of the treatment, and the following every three minutes until 18 minutes. Oxytocin was extracted from plasma and measured using the commercial kit Oxytocin EIA. The responses were evaluated using the non-parametric statistic test method by Kruskal Wallis. A statistical difference was observed between times 0 and 12 ($p < 0,05$) for the oxytocin plus glycerin formulation, showing that absorption did occur. Therefore, the outcomes revealed that this formulation had been absorbed, even though it does not suppress the need for further research before it can be effectively used in female bovine management.

Key-words: Oxytocin, milk yield, milking, girolando

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as atividades econômicas vêm passando por modificações cada vez mais rápidas. O aumento das tecnologias disponíveis, advindo da incessante busca por ganhos de produtividade – e conseqüentemente de lucratividade – tem como resultado a abertura de campos de estudo cada vez mais especializados. No caso da pecuária leiteira, diversos temas passaram a ser explorados pela academia, no seu papel de prover o setor produtivo de inovações capazes de identificar e resolver problemas, concorrendo para o desenvolvimento deste setor da economia agrária.

O assunto que se explora neste trabalho é decorrência tanto do avanço da atividade leiteira no Brasil quanto da identificação de um gargalo para este avanço. O modelo de produção era predominantemente baseado em premissas de países com condições edafoclimáticas diferentes das brasileiras e inadequadas na maior parte do território nacional. A escolha de um modelo de produção adequado para estas regiões passa necessariamente pela tropicalização da atividade, que levou os produtores a uma modificação na composição genética dos rebanhos e nas práticas de manejo.

Neste contexto, ganhou espaço a utilização de gado mestiço (principalmente, taurino x zebuino), que era antes restrita a pequenos produtores com baixas produções e produtividades. Adequações no manejo e nas técnicas de seleção genética transformaram este modelo, que passou a ser uma alternativa de produção de leite a pasto como atividade econômica, com custos mais baixos de instalações e manutenção de animais, além de possibilitar a utilização de terras mais baratas.

Um dos principais entraves à exploração intensiva das vacas mestiças, relatado por técnicos e produtores, está relacionado à ordenha. Os rebanhos leiteiros baseados em raças zebuínas precisam do bezerro para estimular a ejeção do leite, prática de

difícil aplicação em propriedades com grande número de animais mestiços, principalmente animais F1 e com ordenha mecanizada.

Neste trabalho identificou-se como um campo de estudo que pode trazer ganhos à atividade leiteira a utilização da ocitocina como forma de superar este problema. Mais especificamente, pretendeu-se estudar uma forma alternativa de administração desta substância – a via vaginal – diversa da prática usual – de aplicação endovenosa –, que pode trazer problemas como a disseminação de doenças (Trypanossomose bovina, leucose, entre outras), muitas vezes desconhecidos ou subdimensionados pelos produtores.

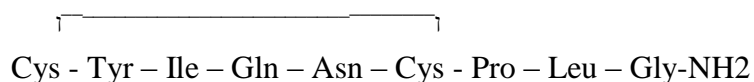
2. OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi testar a via vaginal como uma alternativa para a administração de ocitocina, a partir de formulações específicas, com o propósito de facilitar sua absorção por essa via em novilhas mestiças Holandês x Zebu.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ocitocina

O nome ocitocina (que também se grafa oxitocina) é de origem grega, significando rápido trabalho de parto. É um hormônio polipeptídeo formado por nove resíduos de aminoácidos (Dukes, 2006). A sequência primária da ocitocina fica assim representada:



A molécula possui uma ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína além de ligações peptídicas. Esta ligação Cys-Cys nas posições 1-6 é importante para o reconhecimento pelo receptor de ocitocina (ROT). É um hormônio de natureza

hidrossolúvel, o que favorece seu transporte no plasma sanguíneo até as células alvo. Sua fórmula é $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ e sua massa $1007,19g.mol^{-1}$ (Akers, 2002; Dukes, 2006; Uvnäs-Moberg, 2009).

3.1.1 Histórico

A ocitocina foi identificada em 1906 pelo cientista britânico Henry Dale. Sua primeira função conhecida a descrevia como substância que acelera o trabalho de parto e em seguida que também estimula a lactação (Uvnäs-Moberg, 2009). Sua identificação a partir de material orgânico (fragmentos da neurohipófise¹) dificultava sua utilização, em virtude da impossibilidade de seu isolamento de outras substâncias, como pequenos polipeptídios com atividade biológica ou a vasopressina (ADH), outro hormônio de estrutura química semelhante à da ocitocina e com ação antidiurética. A diferença desta para a ocitocina está em apenas dois aminoácidos.

Foi o primeiro hormônio polipeptídico a ser sequenciado e sintetizado, em 1950, por Vincent du Vigneaud (Sawyer e Manning; 1973; Hadley, 1996; Uvnäs-Moberg, 2009).

A ocitocina hoje disponível comercialmente, de natureza sintética, é fisiológica e quimicamente semelhante à endógena (natural), produzindo as mesmas respostas farmacológicas (Spinosa *et al.*, 2011). Entre os efeitos das diversas aplicações dirigidas a diferentes espécies, incluem-se a indução e aceleração do trabalho de parto e prevenção à hemorragia pós-parto, o tratamento de autismo, fobia social, distúrbio de ereção, anorgasmia masculina e atrofia vaginal na menopausa feminina. Especificamente para a pecuária leiteira, é indicada como promotor de ejeção do leite e no tratamento de seu distúrbio, atuando decisivamente na lactação, função esta que será primordialmente tratada neste trabalho.

¹ Também denominada de glândula pituitária posterior.

3.1.2 Biossíntese, transporte e armazenamento

A biossíntese da ocitocina ocorre principalmente no hipotálamo por células denominadas neurônios magnocelulares², que se encontram nos núcleos supraóptico e paraventricular (Figura 01). A vasopressina, juntamente com a ocitocina, é produzida nestes núcleos. Ambas são sintetizadas na forma de um peptídeo maior (precursor) que é rapidamente clivado no hormônio ativo e sua proteína transportadora, a neurofisina. O complexo ocitocina-neurofisina I é sintetizado em maior quantidade no núcleo paraventricular, enquanto o complexo vasopressina-neurofisina II é sintetizado em maior quantidade no núcleo supraóptico (Brunton *et al.*, 2012).

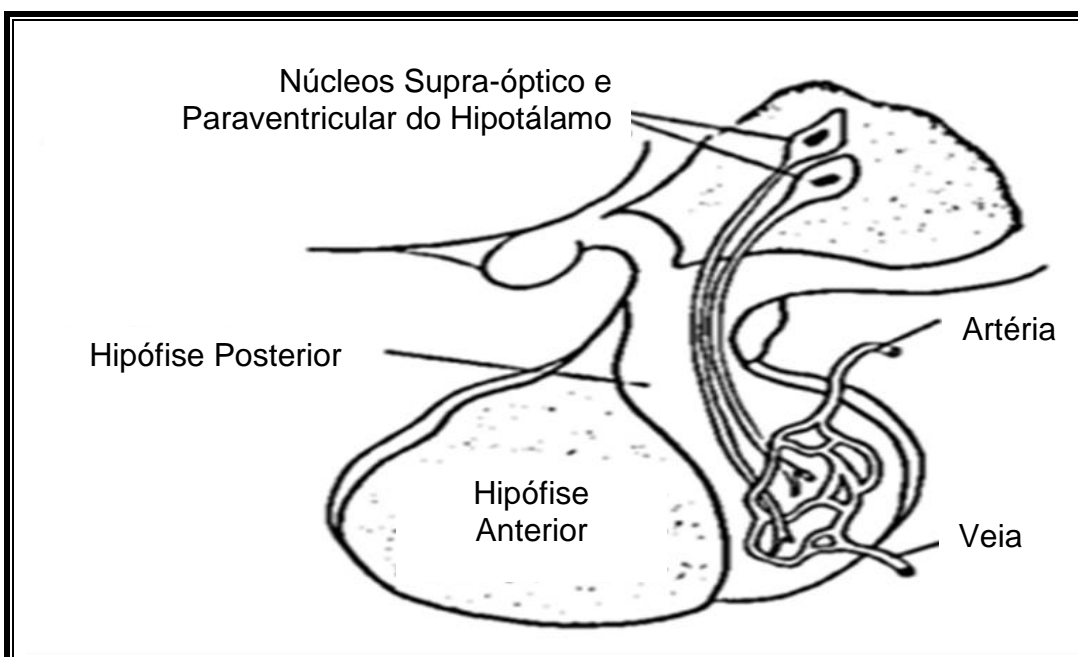


Figura 01 – A figura ilustra a vascularização e a conexão neural direta entre hipotálamo e hipófise posterior.

Fonte: Adaptada de Frandson *et al.* (2003).

O transporte destes hormônios para a neurohipófise é axonal através do infundíbulo. A ocitocina é transportada em forma de vesícula e segue, ligada a neurofisina I, pelos axônios longos dos neurônios magnocelulares terminados em

² Principal local de expressão do gene da ocitocina segundo Gimpl e Fahrenholz (2001).

junções neurohemáticas no lobo posterior da hipófise dos mamíferos (Hadley, 1996; Akers, 2002; Spinosa *et al.*, 2011).

A ocitocina também pode ser encontrada no líquido cefalorraquidiano. O transporte deste hormônio é feito pelos neurônios ocitocinérgicos que se projetam do hipotálamo para regiões do tronco encefálico e da medula espinhal (Brunton *et al.*, 2012).

A Neurohipófise é composta por células do tipo glial ou pituícitos, que não sintetizam hormônios. Só armazenam hormônios hipofisários como ocitocina, vasopressina e suas respectivas neurofisinas sob a forma de grânulos (Spinosa *et al.*, 2011; Brunton *et al.*, 2012).

Estudos mostram que existe síntese de ocitocina em outros tecidos, por exemplo, no útero, na placenta, no âmnio, no corpo lúteo, nos testículos e no coração (Gimpl e Fahrenholz, 2001). Os ROT também apresentam ampla distribuição, estando presentes em diversos locais além da glândula mamária. Diferente do que se pensava a ocitocina não é um hormônio estritamente feminino que desempenha somente papel importante no trabalho de parto e na lactação.

3.1.3 Papéis fisiológicos da ocitocina

Na área da ciência comportamental, a ocitocina é conhecida como hormônio da ligação afetiva, da fidelidade e da confiança. Ela interfere no comportamento social de diversos mamíferos. Segundo Uvnäs-Moberg (2009), o contato físico afetuoso promove liberação de ocitocina em homens e mulheres. Quanto maior a sua concentração na corrente sanguínea, maior será a sensação de tranquilidade e calma.

A inalação de 40 UI de ocitocina interfere positivamente no julgamento social de pessoas desconhecidas como, por exemplo, ao fazer julgamentos pela aparência. Administrada pela via intranasal reduz o estresse e aumenta a confiança (Theodoridou *et al.*, 2009).

É liberada durante o ato sexual e quando ocorre orgasmo em ambos os sexos, o que favorece o comportamento monogâmico. Parceiros satisfeitos têm concentração de ocitocina mais alta (Uvnäs-Moberg *et al.*, 2001).

A ocitocina reduz a liberação do hormônio adrenocorticotrófico³ (ACTH) da hipófise anterior, interferindo conseqüentemente na síntese de cortisol pela glândula adrenal. A relação entre a ocitocina e o cortisol ainda não foi completamente esclarecida. No entanto, estudos revelaram que a ocitocina desempenha um papel na regulação de respostas ao estresse (Windle *et al.*, 1997; Devarajan e Rusak, 2004; Theodoridou *et al.*, 2009) e que a aplicação de cortisol promove aumento da concentração plasmática de ocitocina (Tops *et al.*, 2012).

A ocitocina exerce efeito moderador sobre a fisiologia do estresse e tem ação ansiolítica em ratos (Windle *et al.*, 1997; Uvnäs-Moberg, 1998). Também pode diminuir a pressão arterial, podendo esta ação ser notada mais nitidamente após cinco dias de tratamento em ratos (Petersson *et al.*, 1996; Uvnäs-Moberg, 1998). Segundo esta última autora, a aplicação diária de ocitocina reduziu as concentrações de cortisol e aumentou a taxa de cicatrização de feridas.

Entre os papéis fisiológicos da ocitocina merece atenção especial sua participação nos diversos processos envolvidos na reprodução. Este hormônio atua no comportamento e nos tratos genitais feminino e masculino, no acasalamento, no ciclo estral, na concepção, na gestação, no parto, no pós-parto e na lactação.

O estrógeno é responsável pelo aumento da expressão dos ROT no endométrio e promove a liberação de ocitocina pela neurohipófise (Spencer e Bazer, 1996), viabilizando sua ação no estro e no parto. Os ROT no endométrio de vacas ciclando e no início da gestação apresentam uma correlação negativa com a concentração de progesterona plasmática circulante, sugerindo que este hormônio modula a atuação da ocitocina (Fuchs *et al.*, 1990). A progesterona antagoniza o efeito estimulador da ocitocina *in vitro*, e a refratariedade à progesterona no final da gestação pode contribuir para o início do parto normal humano (Brunton *et al.*, 2012). O

³ Fator liberador de cortisol.

interferon-tau, molécula produzida pelo concepto e responsável pelo reconhecimento materno da gestação, interfere na expressão dos receptores de estrógeno e de ocitocina no endométrio de pequenos ruminantes, impedindo o aumento do número destes receptores e também a liberação de prostaglandina F2 α (PGF2 α) (Spencer *et al.*, 1995).

Durante a gestação a ocitocinase⁴ é encontrada no plasma, na placenta e no útero (Brunton *et al.*, 2012). A atividade enzimática da ocitocinase é uma forma comum de degradação da ocitocina, por meio da quebra das ligações entre os aminoácidos que formam a molécula. A taxa de eliminação metabólica da ocitocina foi 1,4 vezes maior nas fêmeas de babuínos que estavam no terço final da gestação do que nas que estavam no período pós-parto (Kowalski *et al.*, 1998). No final da gestação, este catabolismo em tecidos intrauterinos reduz-se, favorecendo o aumento da concentração local de ocitocina (Mitchell *et al.*, 1997).

Um teste diagnóstico precoce de gestação utilizando a ocitocina luteal foi avaliado e aprovado quanto à precisão por Grizelj *et al.* (2010). Vinte dias após a inseminação, uma dose não luteolítica de PGF2 α promoveu liberação de ocitocina luteal, que pode ser percebida por meio da liberação do leite alveolar em vacas com o teto canulado, em caso de corpo lúteo funcional (animal gestante).

A ocitocina estimulou as células do corpo lúteo a produzirem progesterona *in vitro* (Sakumoto *et al.*, 1996). Por outro lado, quando não há a concepção, a ocitocina produzida nestas células possui ação luteolítica. Age no endométrio induzindo a liberação de PGF2 α quando ligada ao seu receptor, o que promove a regressão do corpo lúteo (Hafez e Hafez, 2004).

Outros locais de síntese de ocitocina incluem o endométrio e a placenta fetal (Brunton *et al.*, 2012). Trata-se provavelmente de controles parácrinos que são regulados de formas diferentes durante a gestação. Os ROT no endométrio e na

⁴ Enzima secretada pela placenta na corrente sanguínea.

placenta aumentam em quantidade de forma acentuada pouco antes do início do trabalho de parto (Fuchs *et al.*, 1992).

O número de ROT na cérvix (colo do útero) varia durante o ciclo estral. Durante a fase estral foram observadas altas concentrações de receptores na mucosa do colo uterino, já na fase luteal foram observadas drásticas reduções (Fuchs *et al.*, 1996). Segundo o autor, a função pode ser de dilatar a cérvix facilitando o transporte do esperma no momento da ovulação. Já o músculo da cérvix parece ser menos importante neste processo, devido ao menor número de ROT observados neste tecido.

Entre os fatores que estimulam a secreção da ocitocina figuram o estradiol, a dor, a desidratação, a hemorragia e a hipovolemia. Embora as ações da ocitocina não pareçam desempenhar papel decisivo em resposta a estes três últimos, ela possui uma atividade antidiurética intrínseca fraca similar à vasopressina, que pode participar na regulação central da pressão arterial. Já o etanol e a relaxina⁵ inibem a sua liberação. Este efeito inibitório parece ocorrer por ação mediada por opióides endógenos (Brunton *et al.*, 2012).

A liberação da ocitocina durante o trabalho de parto se intensifica quando o feto entra no canal pélvico dilatando a cérvix (reflexo de Ferguson). A capacidade de resposta do útero à ocitocina aumenta com a proximidade do parto sob a ação do estrógeno, que aumenta a expressão dos ROT nas células do endométrio. A ocitocina age estimulando a frequência e a força das contrações uterinas (Frandsen *et al.*, 2003).

Alguns autores acreditavam que a falta de contratilidade uterina poderia ser a principal causa da retenção de placenta, e indicavam a utilização da ocitocina imediatamente após o parto como protocolo de tratamento preventivo para a retenção de placenta. Mollo *et al.* (1997) observaram resultado favorável com aplicação de 40 UI de ocitocina imediatamente após o parto seguida de outra dose após 2 a 4 horas, em vacas da raça Holandês. Palomares *et al.* (2010) repetiram o

⁵ É um polipeptídeo ovariano.

mesmo modelo experimental do estudo citado anteriormente com vacas cruzadas com Zebu em condições tropicais, não encontrando resultado favorável a esta prática. As pesquisas sugerem que a principal causa da retenção de placenta pode ser a não degradação dos pontos de adesão entre carúncula-cotilédone (Laven e Peters, 1996; Davies *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2004), mas não refutam a existência de vantagens em aplicar ocitocina neste momento, também para o controle e prevenção de hemorragia pós-parto.

O plasma seminal, importante para proteção e transporte do espermatozoide no trato genital feminino, contém ocitocina e prostaglandinas (Watson *et al.*, 1999). Ambas são potentes estimuladores de contrações uterinas em equinos. Também a ocitocina liberada pela neurohipófise da égua durante o contato visual, ritual e acasalamento com o garanhão foram associadas com início de contrações do miométrio (Madill *et al.*, 2000). Estas contrações são vitais para o transporte do espermatozoide no útero até o oviduto.

A ação da ocitocina na glândula mamária no momento da ordenha é fundamental para a manutenção da lactação. O processo de involução da glândula mamária pode ser desencadeado pela falha da remoção do leite (Neville *et. al.*, 2002).

Para os mamíferos a falha em aleitar representa a falha em reproduzir. No entanto, a importância da lactação transcende a função nutritiva, uma vez que a ocitocina liberada durante a amamentação aumenta o vínculo afetivo entre mãe e filho (Uvnäs-Moberg *et al.*, 2001; Carter, 1992; Bartels e Zeki, 2004). Nesse período ocorre uma interação comportamental e social fundamental para a sobrevivência dos mamíferos na natureza (Uvnäs-Moberg, 2009).

3.2 A Glândula mamária

A glândula mamária é uma glândula multicelular epitelial (Akers, 2002) cuja função primordial é a transferência de nutrientes e imunidade para o neonato. A breve descrição de sua anatomia tem por objetivo apresentar suas estruturas, o local de atuação da ocitocina e da importância desta na ejeção do leite.

O úbere da vaca é formado por tecido conjuntivo (estroma) e tecido glandular (parênquima). São quatro quartos funcionalmente separados compostos por glândulas mamárias distintas, drenadas por seus respectivos tetos, totalmente independentes. O parênquima é representado pelos alvéolos mamários, os quais possuem todas as estruturas necessárias para síntese e secreção do leite. Cada conjunto de alvéolos é circundado por tecido conjuntivo, formando um lóbulo, o qual é drenado para um único ducto menor. O agrupamento de vários lóbulos forma um lobo, drenado por um ducto maior que se comunica com a cisterna da glândula (Figura 02) (Santos e Fonseca, 2007).

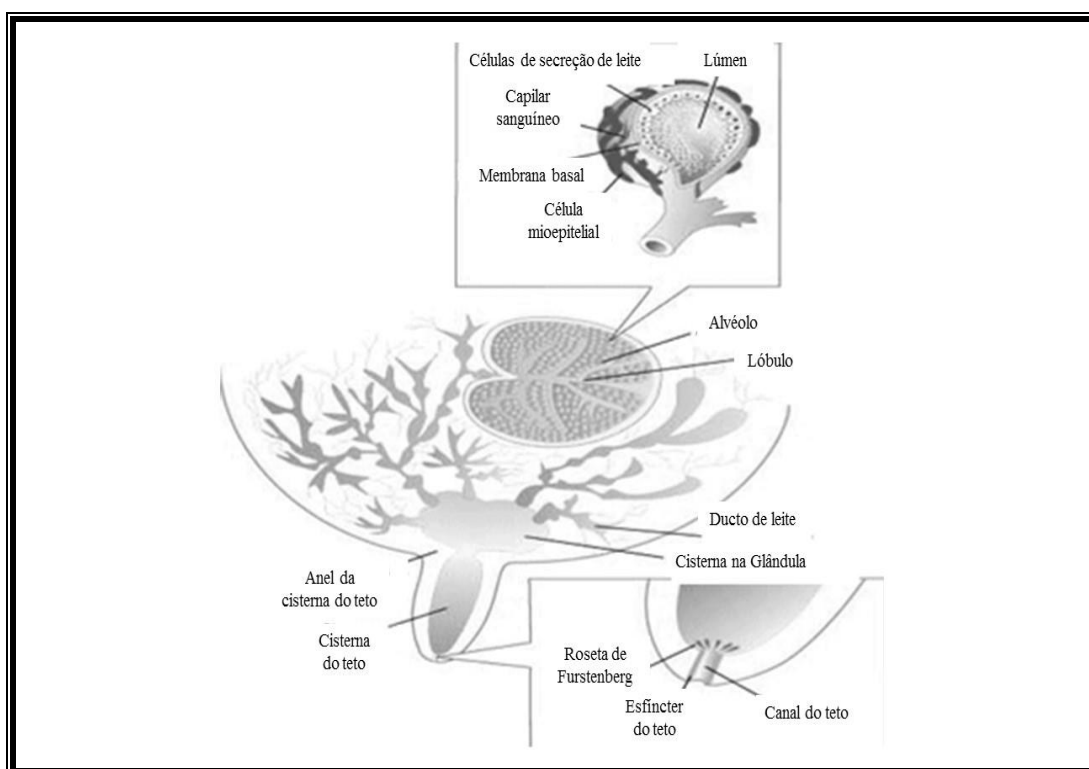


Figura 02 – Organização histológica do tecido mamário glandular.

Fonte: Adaptado de <http://www.delaval.com.br>, acessado em 03.03.2009.

O alvéolo é formado por uma camada de células epiteliais secretoras de leite que estão ligadas umas às outras por um complexo juncional, localizado próximo ao ápice da célula, que impede, em circunstâncias normais, a passagem de substâncias entre o sangue e o interior do alvéolo. As células epiteliais secretoras são altamente especializadas em sintetizar gordura, proteína e lactose. Elas captam os precursores

no sangue através das membranas basal e lateral e secretam o leite via membrana apical para o lúmen do alvéolo. Em bovinos, cerca de 80% do leite secretado fica armazenado dentro do alvéolo, que é circundado por células mioepiteliais (Figura 03). Estas células formam estruturas musculares lisas que envolvem também os ductos maiores e possuem ROT. Estes receptores são compostos por sete domínios transmembrânicos, na forma de α -hélice, acoplados a uma proteína ligada ao nucleotídeo guanina, denominada proteína Gq (Gimpl e Fahrenholz, 2001).

Os ROT são acoplados à proteína Gq e ao serem ativados liberam o cálcio intracelular, promovendo a contração das células mioepiteliais. Os alvéolos se contraem e o leite alveolar é expulso para os ductos maiores, e, daí, para as cisternas (Schams *et al.* 1984, Hafez e Hafez, 2004; Santos e Fonseca, 2007).

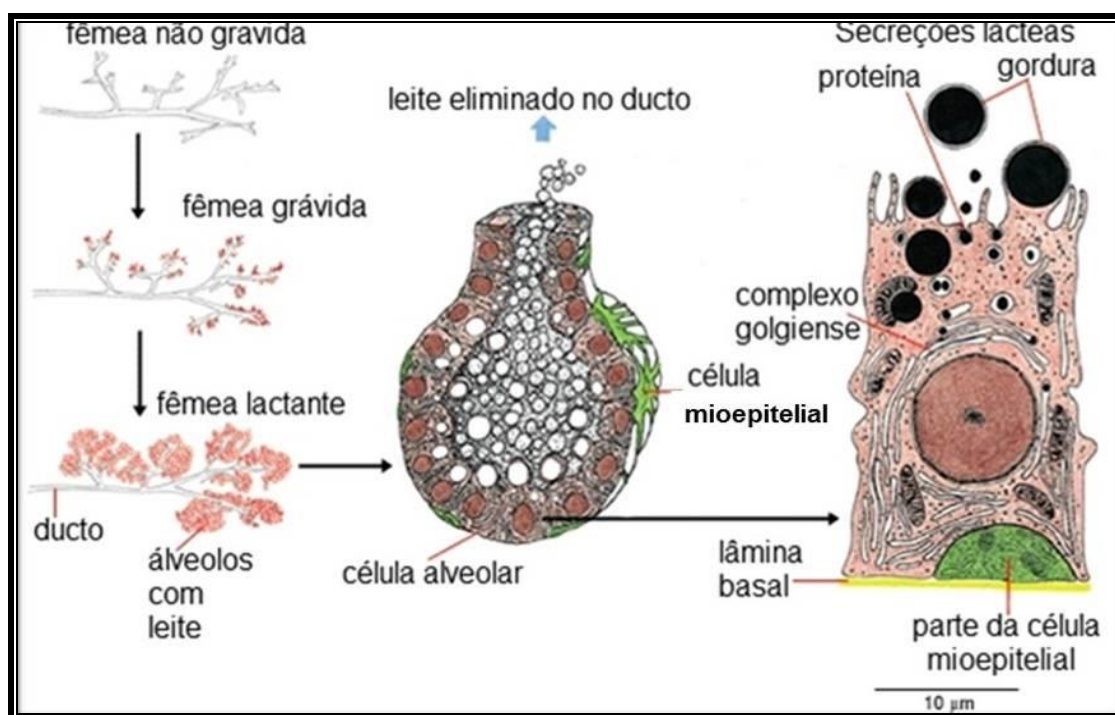


Figura 03 – Esquema histológico do alvéolo mamário e da célula alveolar ativa.

Fonte: Adaptado de <http://tecnicoanatomia.blogspot.com.br/2012/03/glândula-mamária.html>, acessado em 13.11.2014.

3.2.1 A lactação

Toda lactação é necessariamente precedida pela lactogênese (Figura 03). O processo de lactogênese é usualmente descrito em dois estádios. O primeiro consiste na diferenciação estrutural e funcional do epitélio mamário durante o terceiro trimestre da gestação (diferenciação citológica e enzimática das células alveolares). O segundo compreende a conclusão desta diferenciação, a proliferação das células secretoras alveolares, a ativação do gene da α -lactoalbumina e sua produção após o parto para estabelecimento da síntese e secreção láctea (Akers, 2002).

A continuidade da lactação (galactopoiese) exige estímulos da amamentação ou ordenha. Se a remoção regular do leite não ocorrer, a lactação é impedida. Uma vez estabelecida a lactação, ocorre a interação entre o sistema endócrino e o sistema nervoso para continuar a síntese, a secreção e a remoção do leite (Akers, 2002). Aumentar ou diminuir a frequência de ordenhas promove impactos no funcionamento da glândula mamária, podendo estimular, reduzir ou até cessar a síntese do leite (Stelwagen, 2001).

3.2.2 A ocitocina na lactação

A ocitocina tem influência na liberação de hormônios gastrointestinais como gastrina, secretina e colecistocina (CCK), interferindo assim no processo digestivo (Björkstrand *et al.*, 1996a). Também age estimulando a liberação de glucagon pelo pâncreas, o que promove mobilização de glicose para a síntese do leite (Björkstrand *et al.*, 1996b; Uvnäs-Moberg *et. al.*, 2001). No entanto, ela só influencia aumentando a produção de leite quando promove a completa retirada do leite residual. A aplicação de ocitocina sem a remoção do leite alveolar não interfere positivamente na produção de leite (Lollivier e Marnet; 2005).

Este efeito ocorre porque a presença de leite residual na glândula mamária deixa as células secretoras expostas ao Fator Inibidor da Lactação (FIL). O FIL é uma glicoproteína produzida e secretada no leite pelas células epiteliais alveolares. Nos

alvéolos, o FIL se liga a receptores na membrana apical das células, retornando ao interior destas, promovendo redução na taxa de secreção de proteínas pela destruição das vesículas de caseína durante sua passagem pelo Complexo de Golgi (Figura 04) (Knight *et al.*, 1998).

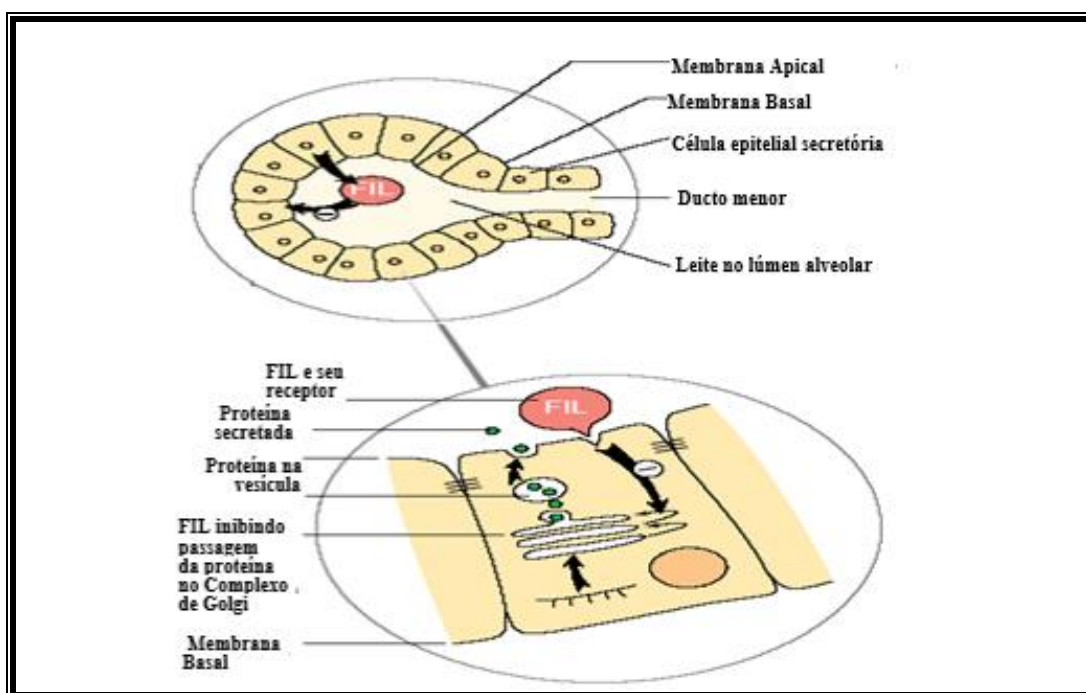


Figura 04 - Alvéolo e célula secretora alveolar sob ação do Fator Inibidor da lactação (FIL)
Fonte: Adaptado de Knight *et al.* (1998).

O efeito positivo sobre a produção de leite em resposta da ação da ocitocina endógena ou exógena tem sido demonstrado em vários trabalhos (Nostrand *et al.*, 1991; Negrão e Marnet, 2002; Bruckmaier, 2003). Também a administração de hormônio do crescimento (GH) (Bauman, 1992) ou de combinação de GH e prolactina (PRL) (Flint e Knight, 1997) estão associadas a maior produção de leite. Portanto, diferentes práticas de manejo de ordenha (como ordenha com ou sem bezerro ou aumento da frequência de ordenhas) podem interferir na produção de leite, uma vez que influenciam na quantidade de ocitocina, GH e PRL liberadas pelo estímulo da glândula mamária (Negrão e Marnet, 2002; Bar-Peled *et al.*, 1995).

A ocitocina interfere na liberação de GH em ratos. Segundo Björkstrand *et al.* (1997) ela pode influenciar aumentando ou diminuindo a secreção de GH, dependendo da dose aplicada. Também é considerada como importante fator de liberação de PRL em ratos e porcos (Morit *et al.*, 1990).

3.2.3 Mecanismo de ejeção do leite

A ejeção do leite não está sob o controle consciente do animal. É um reflexo neuroendócrino. Após estímulos sensoriais, auditivos, táteis, olfatório e/ou visuais, impulsos nervosos aferentes desencadeados pelos receptores sensíveis à pressão da pele e do teto percorrem a medula espinhal até os núcleos supraóptico e paraventricular no hipotálamo promovendo um estímulo sincronizado intermitente (Molina, 2014).

Este estímulo provoca a despolarização da membrana nervosa que se propaga para a parte terminal do axônio. Assim, do hipotálamo o estímulo segue via neurônios ocitocinérgicos até a neurohipófise. O influxo de cálcio promove a fusão dos grânulos e a exocitose dos conteúdos granulares, promovendo a liberação pulsátil da ocitocina e sua neurofisina no leito capilar. A ocitocina é encontrada sob a forma livre ou ligada a proteínas plasmáticas. Dissocia-se rapidamente da neurofisina, não sendo conhecida a função desta última após a separação do hormônio (Norman e Jitnack, 1997; Hafez e Hafez, 2004; Spinoso *et al.*, 2011).

Na glândula mamária, a ocitocina atua promovendo a ejeção do leite alveolar em aproximadamente 20 segundos após sua secreção pela neurohipófise. A ocitocina liga-se aos receptores nas células mioepiteliais, promovendo sua contração e a expulsão do leite para os ductos e a para a cisterna da glândula, expandindo e aumentando a pressão da cavidade cisternal (Norman e Jitnack, 1997; Hafez e Hafez, 2004).

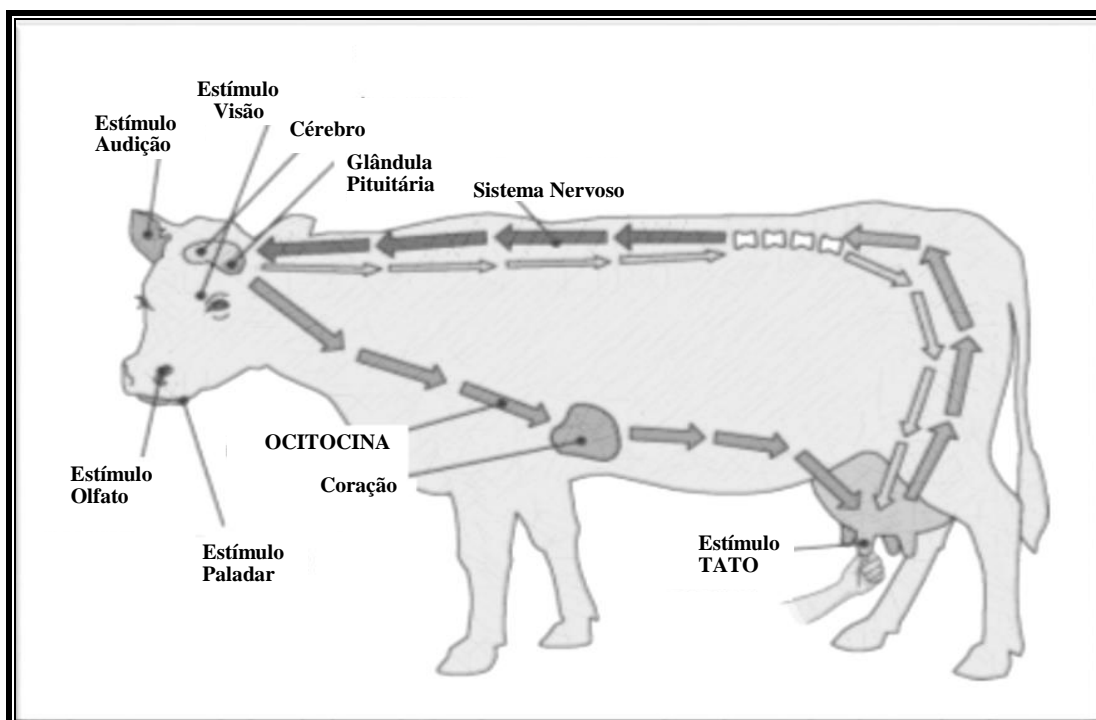


Figura 05 – Mecanismo do reflexo de ejeção do leite

Fonte: Adaptado de <http://www.reagro.com.br>, acessado em 25.09.2011.

A ordenha deve ser iniciada em aproximadamente 60 segundos após a estimulação sensorial para otimizar a ação da ocitocina. A demora aumenta o leite residual e, conseqüentemente, diminui a produção de leite em sistema de ordenha mecânica. Rasmussen *et al.* (1992) demonstraram que tempo maior que 3 minutos entre início da estimulação dos tetos e início da ordenha mecânica resultaram em menor produção de leite (11,3 kg para 1 minuto e 10,7 kg para 3 minutos ou mais) e aumento do leite residual (2,03 kg e 2,19 kg para 1 minuto e 3 minutos, respectivamente).

Um minuto após a aplicação de 0,2 UI de ocitocina, Bruckmaier *et al.* (1994c) verificaram a concentração plasmática de 9 - 15 pg/mL em vacas primíparas com distúrbio de ejeção do leite⁶, concentração essa suficiente para ordenha segundo Schams *et al.* (1984). Bruckmaier *et al.* (1994c) verificaram também que após começarem a ordenha 3 minutos após a aplicação de ocitocina, as concentrações já

⁶ Valor original em ng/L que equivale a pg/mL.

estavam próximas às concentrações basais e apenas 50% do leite tinha sido ordenhado.

A ejeção do leite é um processo dinâmico. Enquanto o leite é drenado da cisterna pela ordenha, o espaço criado vai sendo preenchido pelo leite alveolar, que é bombeado para esta cavidade pela contração das células mioepiteliais do alvéolo e dos ductos. Para obter a remoção completa do leite alveolar, é necessário que a ocitocina seja liberada durante todo o tempo de ordenha (Bruckmaier *et al.*; 1994b).

A meia vida plasmática da ocitocina é classificada como curta. Entretanto, o tempo atribuído a esta meia vida varia consideravelmente na literatura. Seria de aproximadamente 3,5 minutos segundo Fjellestad-Paulsen e Lundin (1996); menor que 3 minutos segundo Bruckmaier *et al.* (1994c); de 12 a 15 minutos segundo Brunton *et al.* (2012); e, segundo Spinosa *et al.* (2011), varia de 1 a 20 minutos, dependendo da espécie animal. A ocitocina é eliminada da corrente sanguínea principalmente pelo metabolismo hepático – o hormônio é metabolizado no fígado pela quebra da ligação Cys-Cys. Nos rins o hormônio sofre a proteólise da ligação 8-Leucina e 9-Glicina, liberando o grupo glicinamida (Fjellestad-Paulsen e Lundin, 1996; Santos e Fonseca, 2007; Spinosa *et al.*, 2011). Em menor grau, é eliminada pela glândula mamária, pela ação enzimática da ocitocinase e pela excreção renal direta sem metabolismo (Brunton *et al.*, 2012).

Kowalski *et al.* (1998) relatam, diferentemente, que, após a aplicação endovenosa de 500 mU (1 mU = 2 pmol) de ocitocina, foi verificado que a meia vida plasmática da ocitocina foi mais curta na fase inicial de sua distribuição (1 min) seguida por uma eliminação terminal mais prolongada (10 min).

Mesmo quando a ordenha mecânica é realizada de forma adequada, é comum que parte do leite permaneça dentro do alvéolo após a ordenha. Essa porção é denominada leite residual e normalmente representa cerca de 10 a 20% do leite total no úbere da vaca (Santos e Fonseca, 2007). Na ordenha mecânica, em experimento com vacas *bos taurus taurus*, a falta do estímulo tátil que ocorre na ordenha manual ou do estímulo da amamentação para liberação contínua de

ocitocina endógena durante a ordenha resultou na permanência de uma fração de 10 a 30% de leite residual na glândula mamária (Bruckmaier *et al.*, 1994c).

Segundo Schams *et al.* (1984), a concentração basal de ocitocina verificada em estudo com vacas da raça Pardo Suíço foi de $1,5 \pm 0,6$ pmol/l de plasma. Trinta segundos após o início da estimulação a concentração foi de $14,2 \pm 13,8$ pmol/l de plasma. Aos sessenta segundos após o início da estimulação a concentração foi de $19,8 \pm 15$ pmol/l de plasma. Entretanto, os autores relatam que um aumento de 3 a 5 pmol/l no plasma foi suficiente para obter a máxima ejeção de leite, e que, mais importante do que a quantidade de ocitocina liberada na corrente sanguínea é a relação temporal entre o pico da liberação e o início da ordenha.

3.2.4 Distúrbios de ejeção do leite

Alguns estímulos estressantes podem interferir na ejeção do leite e aumentar o volume de leite residual acima do aceitável (Santos e Fonseca, 2007). A inibição da ejeção do leite pode ser induzida na glândula mamária (Bruckmaier e Blum, 1998) ou no sistema nervoso central. Segundo os autores, a inibição neste segundo nível é a mais observada em vacas leiteiras. Os neurônios secretores dos núcleos supraópticos e paraventriculares no hipotálamo estão em contato sináptico com os neurônios das vias aferentes, podendo receber tanto impulsos aferentes (colinérgicos) quanto inibidores (noradrenérgicos) (Hadley, 1996).

A inibição periférica é caracterizada pela ausência do efeito da ocitocina na glândula mamária, embora a liberação tenha ocorrido pela neurohipófise. Este efeito inibitório ocorre em resposta às catecolaminas, principalmente a adrenalina (Bruckmaier e Blum, 1998; Santos e Fonseca, 2007). Estas promovem distúrbio de ejeção do leite mediadas pelos receptores α -adrenérgicos, que causam contração no teto, nos ductos e na cisterna da glândula (Bruckmaier *et al.*, 1991; Bruckmaier *et al.*, 1997). Estas contrações não reduzem o fluxo da ordenha enquanto houver leite cisternal, mas inibem a passagem do leite pelos ductos entre o alvéolo e a cisterna.

Também a vasoconstrição periférica provocada pela adrenalina poderia interferir negativamente na chegada da ocitocina nas células mioepiteliais. No entanto, o fluxo sanguíneo nunca cessa completamente e, mesmo sob doses elevadas de ocitocina aplicadas via endovenosa, não houve ejeção de leite após aplicação endovenosa de catecolaminas (Bruckmaier *et al.*, 1997).

A inibição do reflexo de ejeção do leite por ação central, quando não há suficiente liberação de ocitocina, tem sido observada em vacas ordenhadas em ambiente desconhecido (Bruckmaier *et al.*, 1993), em primíparas logo após o parto (Bruckmaier *et al.*, 1992), em vacas no cio (Bruckmaier e Blum, 1998) e em vacas Girolando F1 ordenhadas sem a presença da cria (Alvarez *et al.*, 1980). Quando isto ocorre, a administração de dose fisiológica de ocitocina pode restabelecer a ejeção do leite (Bruckmaier e Blum, 1998).

As inibições periférica e central da ejeção do leite foram simuladas e comparadas separadamente em um experimento de Bruckmaier *et al.* (1997). ROT e receptores α -adrenérgicos foram bloqueados utilizando Atosiban⁷ e Cloridrato de Fenilefrina⁸, respectivamente, simulando a inibição periférica. A simulação do bloqueio central foi realizada ordenhando as vacas em ambiente desconhecido. Cada grupo foi comparado com seu respectivo grupo controle. Como era previsto, a inibição central resultou em distúrbio de ejeção do leite por deficiência de ocitocina e apenas o leite presente na cisterna da glândula foi removido. A aplicação de dose fisiológica de ocitocina foi suficiente para obter o leite alveolar. Já os animais com inibição periférica da ejeção do leite tiveram liberação normal de ocitocina, mas durante a ordenha, apenas o leite cisternal foi removido. Estes resultados demonstram que a inibição periférica promovida pela ativação dos receptores α -adrenérgicos pode bloquear o fluxo de leite para a cisterna.

Em um experimento acerca do distúrbio de ejeção de leite em vacas (Simental x Holandês Vermelho e Pardo Suíço) foram avaliadas as concentrações sanguíneas de

⁷ Peptídeo sintético, antagonista competitivo pelo receptor da ocitocina.

⁸ Agente simpatomimético sintético, com ação direta sobre os receptores alfa-adrenérgicos.

ocitocina, prolactina, cortisol e β -endorfina durante ordenha em ambiente desconhecido (Bruckmaier *et al.*, 1993). A concentração basal de ocitocina foi similar entre os dois grupos ($1,5 \pm 0,3$ pg/mL de plasma)⁹. Um minuto após o início da ordenha, a concentração de ocitocina do grupo ordenhado em ambiente desconhecido foi menor que a do grupo ordenhado em seu próprio ambiente ($2,1 \pm 0,4$ pg/ml de plasma e $20,9 \pm 0,5$ pg/ml de plasma, respectivamente). O grupo que estava sendo ordenhado em ambiente desconhecido não obteve concentrações de ocitocina suficientes para a ejeção do leite alveolar e apenas o leite cisternal foi obtido. Já no outro grupo, a ordenha resultou na extração de, em média, 79,23% do total de leite dos animais. A concentração de prolactina aumentou em ambos os grupos, mas de forma mais pronunciada no grupo ordenhado em seu próprio ambiente. Elevadas concentrações de cortisol e β -endorfina foram verificadas nas vacas ordenhadas em ambientes estranhos.

O ACTH e a β -endorfina derivam do mesmo precursor na hipófise, a pró-opiomelanocortina (POMC) (Eipper *et al.*, 1980; Brunton *et al.*, 2012). Segundo Guillemin *et al.* (1977) ambos, ACTH e β -endorfina, foram liberados concomitantemente em ratos estressados.

Segundo Bruckmaier e Blum (1998), a ligação entre elevadas concentrações de β -endorfina, de cortisol e de distúrbios de ejeção do leite ainda não foi totalmente esclarecida, mas está relacionada com estresse emocional por isolamento, transporte, adaptação e ordenha em ambientes novos.

A aplicação exógena de cortisol não resultou em distúrbio de ejeção do leite (Mayer e Lefcourt, 1987), no entanto a ejeção do leite pode ser inibida pela aplicação de morfina (Wright, 1985), pela β -endorfina induzida por ordenha em ambiente desconhecido (Bruckmaier *et al.*, 1993) e induzida pela aplicação de Naloxona¹⁰, que estimula a liberação de ocitocina durante a ordenha em condições normais (Tancin *et al.*, 2006).

⁹ Valor original em ng/L que equivale a pg/mL.

¹⁰ A Naloxona é uma droga antagonista de receptores de opióides criada pela farmacêutica Sankyo nos anos 60.

3.2.5 Ocitocina endógena

Diversas práticas com o objetivo de conseguir o apoio na hora da ordenha em vacas mestiças têm sido aplicadas. Uma delas consiste em alimentar as vacas durante a ordenha, outra é utilizar o bezerro. Desta forma, a ejeção do leite é obtida por meio de ocitocina endógena, isto é, pela ocitocina liberada pela neurohipófise na hora da ordenha.

Estudos verificaram que a alimentação durante a ordenha pode influenciar positivamente na produção de leite e na secreção de hormônios como ocitocina, prolactina e somastatina¹¹ (Johansson *et al.*, 1999). Segundo Uvnäs-Moberg *et al.* (2001) dois mecanismos podem estar envolvidos na liberação de ocitocina durante a alimentação: a ativação de nervos sensoriais na mucosa oral relatado em trabalho de Verbalis *et al.* (1986) e a estimulação do nervo aferente vagal, comprovada por estimulação elétrica em pesquisa de Stock e Uvnäs-Moberg (1998).

A prática de ordenhar vacas mestiças com bezerro ao pé era adotada por mais de 80% dos produtores entrevistados em pesquisa realizada em Minas Gerais, embora as orientações técnicas fossem voltadas para o aleitamento artificial (Madalena *et al.* 1997). Isto se justificava porque a estimulação da ordenha manual ou da amamentação resultava na liberação contínua da ocitocina na corrente sanguínea pela neurohipófise. Este processo ocorreria em resposta a um arco reflexo neuroendócrino que promoveria a liberação também contínua do leite alveolar para as cisternas, tornando-o disponível ao longo da ordenha (Bruckmaier *et al.*, 1994c).

Em trabalho realizado para comparar modelos de ordenha com e sem bezerro, a produção foi 21% maior no volume de leite produzido por vacas Girolando F1 no sistema de ordenha com bezerro (Junqueira *et al.*, 2004). Outros autores encontraram resultados semelhantes, com produção maior em sistema de ordenha de vacas mestiças *Bos taurus x Bos indicus* com bezerro, comparado com ordenha sem bezerro (Campos *et al.*, 1993; Negrão e Marnet, 2002; Combellas *et al.*, 2003).

¹¹ Hormônio gastrointestinal.

A duração da lactação também foi maior no sistema de ordenha com bezerro ao pé (Junqueira *et al.*, 2004). Os autores concluíram que um dos motivos que levaram a este resultado foi o fato de 9,4% (5/53) das vacas no sistema de ordenha sem bezerro terem tido a lactação inferior a 60 dias. Caldas e Madalena (2001) concluíram, baseados em revisão de literatura sobre ordenhar com ou sem bezerro, que o método de amamentação restrita nos dois ou três primeiros meses da lactação de vacas Girolando F1 tem apresentado maior produção de leite comercializável que o método de ordenha sem bezerro.

Também a estimulação vaginal, segundo Bruckmaier *et al.* (1992) promoveu liberação de ocitocina endógena suficiente para ordenhar o leite alveolar de vacas primíparas com distúrbio de ejeção. Em outro experimento, Bruckmaier *et al.* (1993) mediram a concentração plasmática de ocitocina em vacas multíparas sem e com distúrbio de ejeção induzido por ambiente desconhecido. As vacas foram submetidas à estimulação vaginal por 2 minutos. As concentrações plasmáticas foram medidas um minuto depois. Aquelas que não apresentavam distúrbio aumentaram a concentração de ocitocina de $20,9 \pm 5,1^b$ para $26,3 \pm 10,6^b$ pg/mL¹² e as com distúrbio tiveram um aumento de $2,16 \pm 0,4^a$ para $3,7 \pm 0,7^a$ pg/mL.

A desvantagem é que as práticas que promovem a liberação endógena de ocitocina são, em sua maioria, de difícil adaptação ao manejo de propriedades com grandes produções, com ordenha mecanizada e que buscam por ganhos de produtividade e lucratividade. A prática de alimentar as vacas na sala de ordenha vai contra os princípios descritos como fundamentais para o controle de sanidade da glândula mamária (Ruegg, 2006). Em rebanhos comerciais, com um grande número de animais em lactação, a alimentação e/ou a presença de bezerros na sala de ordenha tornam o manejo ainda mais complicado, principalmente quando estes ficam maiores.

Na reprodução o efeito da amamentação sobre a condição anovulatória na vaca é um grande problema (Short *et al.*, 1990). Trabalhos mostraram que dependendo do

¹² Valor original em ng/L que equivale a pg/mL.

escore corporal da vaca, somente a presença física do bezerro foi capaz de influenciar negativamente no intervalo de partos, pelo aumento do período anovulatório (Mukasa-Mugerwa *et al.*, 1991; Viker *et al.*, 1993).

Também na criação das bezerras de reposição, o modelo de amamentação natural é muito desfavorável. Os índices de mortalidade e morbidade de bezeros foram elevados no experimento de Campos *et al.* (1993). A baixa resistência dos animais às enfermidades e parasitas é um fator de frustração na exploração leiteira, como consequência de deficiências na alimentação e no controle sanitário (animais de várias idades juntos em grandes concentrações pelo menos por duas vezes ao dia).

3.2.6 Distribuição e disponibilidade do leite na glândula mamária

Entre as espécies de mamíferos, existem diferenças na proporção de leite armazenado no úbere dentro dos alvéolos e das cisternas. Distingue-se o leite alveolar, aquela porção que depende da ocitocina para ser ordenhada, do leite disponível, que é aquele presente na cisterna da glândula (Santos e Fonseca, 2007). O mecanismo da ejeção do leite alveolar pela contração das células mioepiteliais sob ação da ocitocina ocorre na maioria das espécies estudadas. Entretanto, as diferenças anatômicas entre as espécies alteram a necessidade e/ou o grau de liberação de ocitocina durante a ordenha. O reflexo de ejeção do leite pode não ser essencial para a ordenha de animais que armazenam a maior parte do leite nas cisternas glandulares (Akers, 2002).

Os pequenos ruminantes possuem cisternas da glândula maiores. O percentual de leite disponível varia de 40 a 80% do total armazenado no úbere (Marnet e McKusick, 2001), o que faz com que o reflexo de ejeção no momento da ordenha seja menos importante em comparação com vacas leiteiras (Bruckmaier *et al.*, 1994c).

Pesquisas a respeito da dinâmica de ordenha em búfalas relatam problemas relacionados ao reflexo de ejeção na ordenha mecânica. A área média da cisterna da glândula na búfala é de $13,1 \pm 1,1 \text{ cm}^2$, menor do que em vacas (Thomas *et al.*,

2004). Segundos os autores, a área de cisterna é maior em animais no início de lactação, diminuindo no meio e final da lactação. Os animais mais velhos apresentam maior área que os mais jovens, com menor número de partos.

Também em bovinos, a fração de leite cisternal depende da ordem, da fase da lactação e da raça. O tamanho da cisterna é maior no pico da lactação e em vacas com maior número de partos (Bruckmaier *et al.*, 1994a) e nas vacas da raça Holandês quando comparadas as vacas Girolando (Porcionato *et al.*, 2009). A área da cisterna da glândula mamária encontrada em vacas da raça Holandês foi de $20,31 \text{ cm}^2 \pm 2,02^a$ e a das vacas Girolando foi de $13,72 \text{ cm}^2 \pm 1,34^b$.

3.2.7 Ocitocina exógena

A prática de aplicar ocitocina exógena se fundamenta pelo papel fundamental deste hormônio na lactação. Sua ação otimizada proporciona uma ordenha rápida e completa, interferindo positivamente na produção de leite. Vacas da raça Holandês, submetidas a injeções de ocitocina durante toda a lactação, produziram 11,6% mais leite que as que não receberam (Nostrand *et al.*, 1991).

Quando vacas Girolando F1 são ordenhadas sem bezerro, tendem a apresentar distúrbios de ejeção do leite e a reter grandes volumes de leite residual, o que contribui para a redução tanto da produção de leite como da duração da lactação (Alvarez *et al.*, 1980). A aplicação de ocitocina exógena tem sido utilizada antes da ordenha a fim de obter maior retirada do leite, tratando, assim, a ejeção incompleta de leite (Bruckmaier, 2003).

Em experimento com vacas Girolando F1, Oliveira (2010) avaliou a aplicação de ocitocina ou a presença do bezerro no momento da ordenha sobre os parâmetros produtivos e reprodutivos. O grupo experimental era ordenhado na ausência da cria e submetido à aplicação de 2 UI de ocitocina endovenosa imediatamente antes do início da ordenha. O grupo controle era ordenhado na presença da cria e amamentava após a ordenha durante 30 minutos. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre as médias ajustadas para produção de leite, mas as vacas submetidas

à aplicação de ocitocina apresentaram menor taxa de redução da produção de leite ao longo da lactação. Além disso, apresentaram melhor desempenho reprodutivo. A autora concluiu recomendando a aplicação de ocitocina como alternativa de manejo em rebanhos com vacas Girolando F1, em substituição à ordenha com bezerro.

Araújo *et al.* (2012) compararam a produção de leite de vacas Girolando F1 com ou sem bezerro, com e sem aplicação de ocitocina. As vacas ordenhadas com seus bezerras e as com aplicação de ocitocina obtiveram maior produção de leite diária (+2,58 litros) em relação aos seus respectivos tratamentos controle ($p < 0,05$). Os autores concluíram que tanto a administração de ocitocina exógena quanto a utilização do bezerro durante a ordenha estimularam a produção de leite nestas vacas.

A aplicação de ocitocina exógena tem sido utilizada em altas dosagens, segundo Bruckmaier (2003), para tratar a ejeção incompleta de leite. No Brasil as indicações das bulas de ocitocina divergem entre laboratórios, mas sempre com indicação de elevada dosagem como se vê no quadro abaixo:

Quadro 01 – Dosagens de ocitocina indicadas para tratar distúrbio de ejeção do leite em vacas em produtos disponíveis no comércio.

NOME	LABORATÓRIO	VIA DE APLICAÇÃO	
		IM ¹ ou SC ²	IV ³
Placentex ⁴	Agener União	2 a 4 mL (20 a 40 UI)	-
Ocitovet ⁵	Vetecia Lab. Prod. Vet. LTDA.	1 a 2 mL (10 a 20 UI)	1 a 2 mL (10 a 20 UI)
Ocitocina Forte UCB ⁶	UCBVET	2 a 5 mL (20 a 50 UI)	-
Ocitocina Vitalfarma ⁷	Lab. Farmacêutico Vitalfarma	2 a 5 mL (20 a 50 UI)	1,5 a 4 mL (15 a 40 UI)

Notas:

¹-intramuscular; ²-subcutânea; ³-intravenosa, ⁴Placentex (1983), ⁵Ocitovet (2004), ⁶Ocitocina Forte UCB (1978), ⁷Ocitocina Vitalfarma (1996).

Em entrevista com fazendeiros na Suíça, Belo e Bruckmaier (2010) verificaram que altas dosagens de ocitocina eram utilizadas (7 ± 2 UI pela via endovenosa e 23 ± 2 UI pela via intramuscular). Estas dosagens, segundo os autores, especialmente quando as aplicações são intramusculares, provocam elevadas concentrações de ocitocina durante várias horas. Elevadas dosagens de ocitocina utilizadas de forma contínua reduzem sua liberação endógena espontânea para ejeção do leite quando o tratamento é interrompido, mostrando que esta prática torna dependentes os animais a ela submetidos (Bruckmaier, 2003; Macuhova *et al.*, 2004).

Ribeiro *et al.* (2004) testaram diferentes doses de ocitocina aplicadas via intramuscular para medir a produção de leite de ovelhas ordenhadas sem suas crias. Não foram encontradas diferenças entre doses de 1 a 5 UI de ocitocina para ordenhar ovelhas sem a presença da cria. Já a utilização de ocitocina em bovinos foi testada por Gorewit e Sagi (1984), medindo a porção de leite residual em vacas da raça Holandês. Cinco doses de ocitocina (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 UI) foram aplicadas na veia mamária um minuto após a ordenha mecânica. Após 15 minutos mais 10 UI de ocitocina foram aplicadas para verificar se a dose utilizada anteriormente tinha sido suficiente para a extração do leite residual. Os autores observaram diferenças entre a não aplicação (sem ocitocina) e as demais doses. Também observaram que a administração de 2 ou 3 UI de ocitocina foi suficiente para se obter a ordenha completa de vacas com distúrbio de ejeção.

Belo e Bruckmaier (2010) testaram a aplicação endovenosa 0,2 e 0,5 UI de ocitocina para tratar distúrbio de ejeção. Segundo os autores, o tempo de ejeção do leite aumentou com a dosagem de ocitocina aplicada. Portanto, a quantidade do leite ordenhado também aumentou com a dosagem de ocitocina aplicada. Os autores concluíram que a aplicação de ocitocina deveria ser reduzida para o mínimo, e que a dose pode ser calculada com base no tempo necessário para uma ordenha completa, de acordo com a necessidade do animal.

A ocitocina, em baixa concentração, atua promovendo contração da musculatura lisa do útero de forma rítmica em pulsos. Em concentrações elevadas promove a

diminuição do potencial de repouso da membrana, levando a aumento da excitabilidade (pela soma de potencial de ação repetitivos) resultando em paralisia (Spinosa *et al.*, 2011).

Em doses elevadas e repetidas, a ocitocina ativa os receptores V₂ de vasopressina e exerce efeitos antidiuréticos (por causa de sua semelhança com a vasopressina). Ações vasodilatadoras também foram observadas, podendo causar taquicardia reflexa e hipotensão e intoxicação hídrica (Brunton *et al.*, 2012).

3.3 Administração de Ocitocina e seus inconvenientes

A aplicação de ocitocina na pecuária nacional é feita por meio de injeções pelas vias endovenosa ou intramuscular. Este mecanismo é frequentemente utilizado para tratar a ejeção incompleta de leite (Bruckmaier, 2003), tendo como vantagem a rápida ação do fármaco. No entanto, problemas de transmissão de doenças infecciosas têm sido frequentemente relacionados com esta prática, como, por exemplo, a tripanossomíase bovina (EV-UFGM, 2014).

Em junho de 2014, um surto de Trypanossomose bovina atingiu cidades como Abaeté, Martinho Campos, Itamarandiba, Biquinhas, Maravilhas e Pompéu, levando a muitas mortes de vacas e prejuízo para os produtores (EV-UFGM, 2014). A disseminação desta doença ocorre normalmente de animal para animal, pela picada da mosca-de-estábulo (*Stomoxys calcitrans*), que pica o animal infectado e em sequência pica outro animal, transmitindo o parasito pelo sangue. Fez-se uma coleta de dados, minuciosa anamnese, exames clínicos e do ambiente. Os indícios sugeriram, entretanto, que este surto ocorreu pelo uso indevido da agulha na aplicação de ocitocina. Verificou-se nestas fazendas que somente vacas em lactação apresentavam sinais clínicos da doença. Também, que o líquido da ocitocina, que é transparente, se tornava avermelhado após a aplicação nas vacas, devido à contaminação pelo sangue. “A agulha se tornou mais eficiente do que a mosca”, conforme afirmação do prof. Antônio Último de Carvalho na notícia citada.

Outra doença que apresenta risco potencial é a Leucose. O vírus desta doença apresenta distribuição mundial com prevalência alta na América do Sul e do Norte, sendo que a transmissão horizontal é a principal forma de contaminação (Galinari, 2014). A aplicação de vacinas ou de ocitocina em massa sem trocas de agulhas ou utilização de medicamentos contaminados é contrária à postura moderna de buscar o controle epidemiológico, que consiste em reduzir as oportunidades de disseminação de doenças (Gay, 2009). Para desencadear um surto em um grupo de animais basta a existência de um caso subclínico não diagnosticado.

Além disso, a aplicação endovenosa ou intramuscular de ocitocina para obter ejeção de leite requer no mínimo duas injeções diárias em cada animal, o que representa pelo menos 610 agulhadas em uma lactação de 305 dias. O risco de flebites por contaminação e de ocorrências de surto é grande, ainda mais quando se espera pelo menos três lactações para cada vaca, representando no mínimo 1.830 injeções na veia mamária ao longo de sua vida produtiva. Ademais, além de todos os problemas apresentados, a prática causa estresse de forma continuada nos animais.

3.3.1 Administração via transmucosa

A via mucosa nasal tem sido usada como rota alternativa na medicina humana para a disponibilidade sistêmica de fármacos resultando em rápida absorção (Turker *et al.*, 2004). Mulheres com dificuldade de amamentar ou extrair o leite recebem indicação de utilizar medicamento comercial na forma de spray de ocitocina sintética, tendo êxito na estimulação da ejeção e no tratamento de ingurgitamento (Syntocinon®, 2015). Segundo o laboratório Novartis, o medicamento é absorvido de forma rápida e suficiente a partir da mucosa nasal, e o efeito ocorre em menos de 5 minutos.

Em experimento com primatas (*Macaca mulatta*), a concentração de ocitocina no líquido cefalorraquidiano foi medida antes e 40 minutos após a aplicação de um placebo (solução salina) e de ocitocina na via nasal, usando um spray intranasal e um nebulizador. Ambas as aplicações de ocitocina usando o spray ou nebulizador

resultaram em elevação na concentração de ocitocina em comparação com a aplicação do placebo. Não houve diferença entre os métodos de aplicação (Dal Monte *et al.*, 2014).

A mucosa nasal é de difícil acesso em bovinos em lactação, pois a contenção da cabeça causa estresse e liberação de adrenalina, que é um hormônio antagonista à ocitocina, interferindo negativamente na ejeção leite (Bruckmaier e Blum; 1998). No entanto, a medicina veterinária já utiliza a mucosa vaginal em larga escala, com a aplicação de dispositivos intravaginais para programas reprodutivos, por meio de implantes impregnados com progesterona para a manipulação do ciclo estral em bovinos (Spinosa *et al.*, 2011). Não foi encontrada na pesquisa bibliográfica até aqui realizada qualquer referência à utilização de ocitocina em bovinos por via mucosa vaginal.

A via vaginal foi redescoberta como via potencial para aplicação sistêmica de fármacos. Entretanto, diferentemente de outras vias, a fisiologia da vagina é altamente dinâmica, em razão das frequentes alterações cíclicas reprodutivas e em função da idade, podendo gerar incertezas quanto a sua utilidade para a finalidade de aplicação de drogas. Mesmo assim, tem sido explorada para aplicação de fármacos de ação sistêmica por sua grande área de superfície, alta vascularização e permeabilidade a uma vasta gama de compostos, incluindo os de grande peso molecular como peptídeos e proteínas (Choudhury e Kar, 2011; Patel e Patel, 2012).

3.3.2 Anatomia e fisiologia vaginal

A vagina pode ser descrita como parte do trato reprodutivo que se encontra dentro da pelve, entre o útero cranialmente e a vulva caudalmente (figura 06). A parede vaginal é constituída por uma superfície epitelial, uma camada muscular e uma serosa. A superfície epitelial da vagina possui epitélio escamoso (pavimentado) estratificado, com células mucosas na sua parte cranial (Frandsen *et al.*, 2003). A porção muscular é formada por uma camada interna circular espessa e outra,

também interna, longitudinal fina. Esta túnica muscular é suprida por vasos sanguíneos, feixes nervosos, grupos de células nervosas e tecido conjuntivo denso e frouxo (Hafez e Hafez, 2004). A porção serosa reveste apenas a parte cranial da vagina (peritônio). A parte caudal da vagina é revestida por tecido conjuntivo (Frandsen *et al.*, 2003).

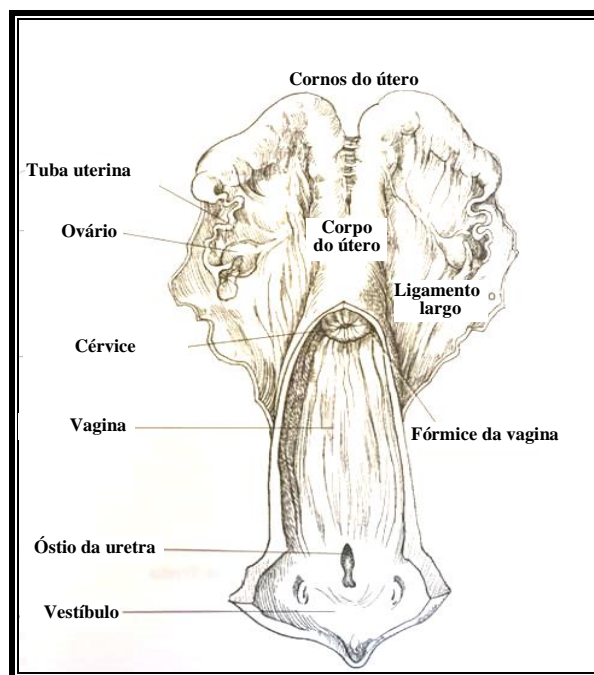


Figura 06 – Trato reprodutivo da vaca.
Fonte: Adaptado de Frandsen *et al.* (2003).

O epitélio vaginal da vaca varia em resposta à influência hormonal do ciclo estral. Sob a influência da progesterona, o epitélio na parte cranial possui cerca de três camadas de células, enquanto na parte caudal possui cerca de 10 camadas de células. No início do estro, quando a estrutura está sob influência do estrógeno, as células colunares e caliciformes da parte cranial da vagina ficam cobertas pelo muco cervical e a espessura do epitélio vaginal na parte caudal aumenta. No entanto, não se observa real queratinização. Neste período as células superficiais são mais escamosas, em sequência, ocorre a descamação (Eurell, 2012).

As paredes vaginais são umedecidas por fluidos vaginais. São transudatos do epitélio, muco cervical e secreções endometriais. Ao se aproximar o cio, aumenta a vascularização local e o fluido fica mais seroso (Hafez e Hafez, 2004).

A microbiota vaginal é composta por vários microrganismos aeróbicos, anaeróbicos, facultativos e estritamente anaeróbicos. Trata-se de uma mistura dinâmica sendo constantemente introduzidos novos microrganismos. As respostas imunológicas parecem estar sob controle endócrino. Células plasmáticas maduras e imaturas, localizadas abaixo do epitélio, aumentam em número durante a fase luteínica e secretam imunoglobulinas A e G, que parecem prevenir infecções bacterianas (Hafez e Hafez, 2004). Linfócitos e plasmócitos são mais comuns sob a influência da progesterona, já os neutrófilos invadem o epitélio vaginal na fase folicular (Eurell, 2012).

Segundo Khudayer (2007), o pH vaginal de vacas no pró-estro, estro e na fase luteal é alcalino, variando entre 7,0 e 7,95, não excedendo a 8,0. Em comparação, o pH fica mais alcalino no estro que no pró-estro. Contudo, durante a gestação, o pH vaginal se torna ácido, variando entre 5,9 e 6,1, de acordo com o autor, que utilizou de forma satisfatória o pH como forma de identificar a situação gestacional dos animais.

O suprimento sanguíneo da parte caudal do útero, sua cérvice e partes adjacentes da vagina, é feito por ramos da artéria vaginal e um ramo da artéria pudenda interna (Frandsen *et al.*, 2003). A drenagem é realizada pelas veias vaginais e acessórias. São bilaterais, localizadas uma de cada lado da vagina. Formam-se a partir de plexos laterais e drenam para as veias ilíacas internas (figura 07).

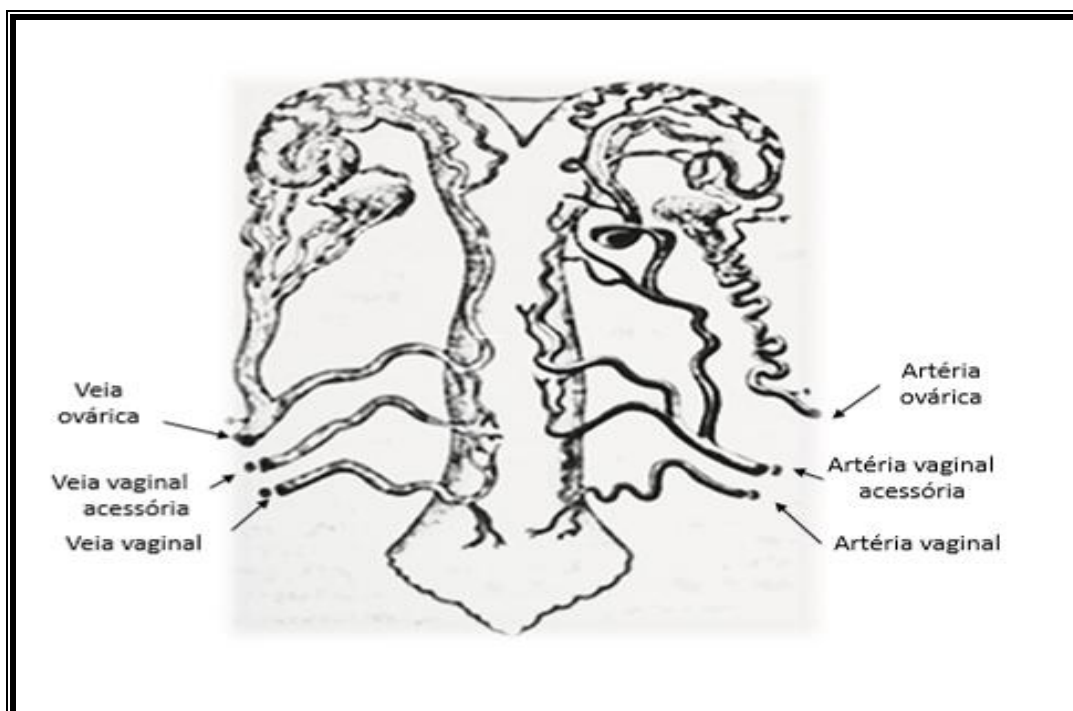


Figura 07 – Esquema de suprimento e drenagem sanguínea para o trato reprodutivo da vaca.
 Fonte: Adaptado de Dyce *et al.* (1996).

A veia íliaca interna se une à veia íliaca externa, formando a veia íliaca comum que desemboca na veia cava inferior, chegando assim ao coração. Desta forma, a vagina se destaca como uma via eficiente de administração de medicamentos, permitindo que a absorção seja feita diretamente para a circulação sem passar pelo sistema porta¹³, isto é, sem sofrer interferência do metabolismo hepático (Standing, 2010).

Em um estudo sobre a angioarquitetura venosa, Gioso *et al.* (2005) observaram nas vacas o mecanismo contracorrente devido a anastomoses uterinas com a circulação vulvar e vaginal. O sangue é drenado da vagina e da cérvix não apenas pela veia vaginal, mas também pela veia útero-ovariana, possibilitando uma rota local entre estas estruturas sem passar pela circulação sistêmica.

3.3.3 Absorção de fármacos e a via transmucosa

A absorção de um fármaco representa a passagem do local de aplicação para a circulação sistêmica. Sua atuação depende da concentração, da área da superfície

¹³ No sistema porta, o sangue passa pelo fígado antes de retornar ao coração.

absorvente, da vascularidade e do transporte através das membranas celulares ou por entre elas para alcançar o alvo. Em alguns casos, o fármaco precisa atravessar as membranas plasmáticas de várias células, em outros casos o fármaco precisa transpor apenas uma única camada de células (Brunton *et al.*, 2012).

Os fármacos atravessam as membranas, na maioria das vezes, por processos passivos. São eles o transporte paracelular e difusão. No transporte paracelular ou filtração, os fármacos passam por espaços pré-existentes, que variam em diâmetro nas várias membranas corporais. É um mecanismo comum para pequenas substâncias hidrossolúveis, polares ou apolares. Na difusão (simples ou passiva), as moléculas do fármaco atravessam a membrana em função do gradiente de concentração. No entanto, precisam ser apolares e apresentarem peso molecular compatível com a dupla camada lipídica que pretendem atravessar (Spinosa *et al.*, 2011).

Alguns fármacos atravessam envolvendo a participação ativa de componentes da membrana, isto é, mediada por carreador (figura 08). Pode ser por difusão facilitada ou por transportadores de fármacos. Na difusão facilitada, o fármaco é transportado por intermédio de um carreador a favor de um gradiente químico sem gasto de energia. Quando o é por transportadores de fármacos, o transporte ativo realiza movimento contra um gradiente eletroquímico necessitando de energia (figura 08) (Spinosa *et al.*, 2011).

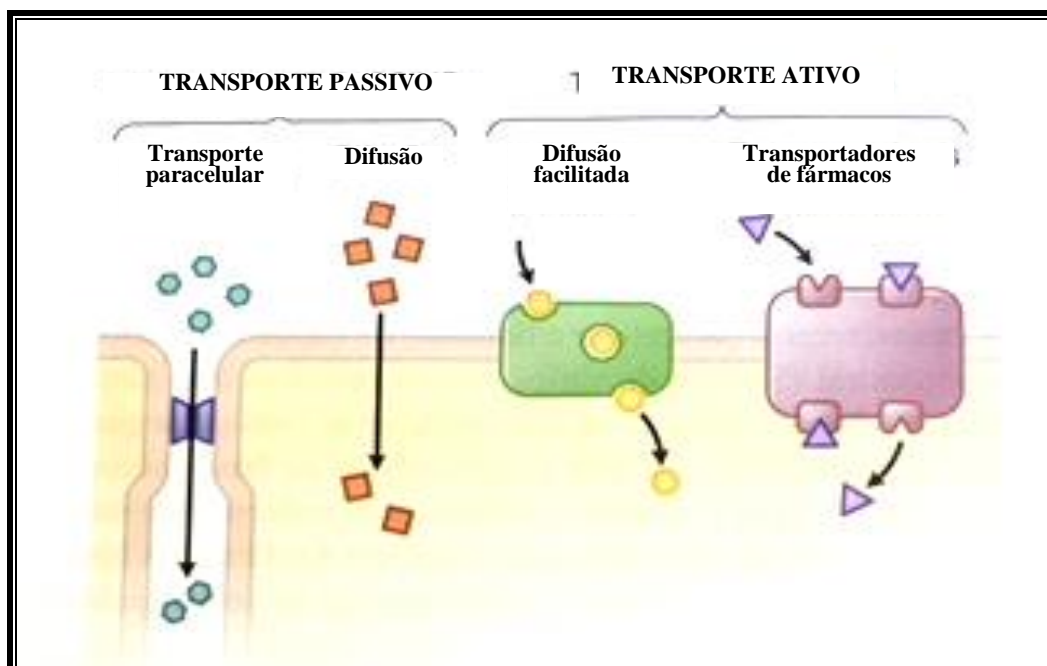


Figura 08 – Diversos mecanismos usados pelos fármacos para atravessar as barreiras celulares.

Fonte: Adaptado de Brunton *et al.* (2012).

Um parâmetro para avaliar a absorção é a verificação da biodisponibilidade. Ela é descrita como sendo a fração do fármaco que consegue alcançar a circulação sistêmica a partir de sua via de administração. A técnica consiste em avaliar a disponibilidade sistêmica (F), comparando a extensão da absorção da droga de aplicação por via não vascular (área sob a curva = $ASC_{\text{via não vascular}}$) com a aplicação de doses iguais da droga via vascular para os mesmos animais (área sob a curva = $ASC_{\text{endovenosa}}$). A área sob a curva (ASC) da concentração-tempo é estimada pela soma da área de todos os trapézios e triângulos limitados pela curva, e matematicamente calculada como a integral da curva. A aplicação endovenosa representa por definição a disponibilidade sistêmica total. O cálculo pode ser feito utilizando a seguinte fórmula: $F = ASC_{\text{via não vascular}} / ASC_{\text{endovenosa}}$ (Adams, 2003).

Na vagina, alguns fatores fisiológicos podem interferir na absorção de fármacos, principalmente por figurar nas duas etapas fundamentais para sua realização: a diluição do fármaco no lúmen vaginal e a penetração deste na membrana. O aumento do fluido vaginal pode aumentar a absorção de drogas pouco solúveis em

água, mas também pode reduzir ao facilitar sua expulsão da cavidade vaginal (Choudhury e Kar, 2011).

Mudanças cíclicas hormonais interferem na concentração de estrógeno e no pH vaginal (Choudhury e Kar, 2011). A permeabilidade está relacionada à concentração de estrógeno, podendo influenciar na farmacocinética de drogas de ação sistêmica. Alterações no pH podem alterar o grau de ionização e afetar o perfil de liberação de fármacos sensíveis ao pH, interferindo na diluição e penetração destes na mucosa (Choudhury e Kar, 2011). Muitos fármacos são ácidos ou bases fracas presentes em soluções sob a forma ionizada ou não. As não ionizadas são, via de regra, mais lipossolúveis que as ionizadas, podem difundir-se mais facilmente pela membrana celular. Outros fatores também influenciam facilitando ou não o transporte transcelular, como o tamanho da molécula e sua estrutura química. A distribuição transcelular é determinada pelo seu pKA e pelo gradiente de pH através da membrana (Brunton *et al.*, 2012).

A absorção vaginal para a maioria das substâncias ativas acontece por difusão. Quando o fármaco é hidrofóbico, a rota de absorção é transcelular por difusão a favor de um gradiente. Mas quando se trata de substância hidrófila, a absorção é paracelular, mediada pelos “*Tight junctions*” ou poros presentes na mucosa vaginal. A absorção vaginal também pode ser mediada por vesícula ou receptor (Choudhury e Kar, 2011).

No entanto, segundo Attwood e Florence (2011), não se deve esperar que regras teóricas se apliquem a quaisquer circunstâncias complexas e dinâmicas, como a interação e a absorção de drogas. Segundo os autores, a teoria fornece apenas uma orientação e previsão provável do comportamento da droga, que deve ser submetida a testes para sua avaliação.

3.3.4 Incrementadores de Absorção

Pode-se realizar a associação de substâncias a um fármaco com o objetivo facilitar sua absorção na via utilizada para sua aplicação. Trabalhos sobre a permeabilidade

vaginal indicaram que as drogas elegíveis para a via vaginal devem ter algum grau de solubilidade aquosa (Choudhury e Kar, 2011).

De acordo com Attwood e Florence (2011), todas as membranas biológicas possuem uma camada de água relativamente não agitada adjacente a sua superfície. Desta forma, durante o processo de absorção, a droga deve transpor uma camada aquosa e em seguida uma camada lipídica.

Algumas substâncias favorecem a absorção, comportando-se como carreadoras de outras. As membranas celulares são relativamente permeáveis à água, seja por difusão ou fluxo resultante dos gradientes hidrostáticos ou osmóticos existentes na membrana. Devido a esta propriedade, a água pode transportar consigo alguns fármacos que se encontram nela dissolvidos (Brunton *et al.*, 2012).

Os carreadores, de acordo com Dodla e Velmurugan (2013), deveriam ter como características ideais para transportar drogas via membrana: serem seguros e não tóxicos, não irritantes nem alergênicos; serem farmacológica e quimicamente inertes; não apresentarem atividade farmacológica sistêmica relevante; e, não serem quimicamente incompatíveis com a droga a ser administrada.

Os polímeros mucoadesivos interagem com o muco que recobre o epitélio da mucosa, aumentando a permanência, a absorção e, conseqüentemente, a concentração plasmática do fármaco associado. Essas substâncias têm ganhado maior atenção nas últimas duas décadas porque, além de favorecer a absorção de substâncias como proteínas, promovem a manutenção de uma formulação em contato íntimo com local de absorção, como mucosas da cavidade nasal, oral, do olho ou vagina. Podem também ser utilizados como agentes terapêuticos revestindo tecidos danificados ou agindo como lubrificantes. Precisam ser não tóxicos, não absorvíveis, ter rápida aderência em tecidos úmidos e capazes de liberar o fármaco a ele incorporado (Asija1 *et al.*, 2013).

Lista-se abaixo, alguns agentes incrementadores de absorção e suas características que, quando associados a fármacos, atuam favorecendo a absorção de formulações em mucosas (Quadro 02).

Quadro 02- Agentes incrementadores de absorção, forma de ação e principais características

Agente Incrementador de Absorção	Ação	Características
Água	Agente carreador	Transporta consigo fármacos que se encontram dissolvidos nela. Possui fluxo em função de equilíbrio hidrostático ou osmótico ¹ .
Álcool Polivinílico (PVA)	Mucoadesivo	Polímero termoplástico sintético hidrossolúvel e biodegradável, formador de película com alto poder adesivo ² .
Carboxi Metil Celulose (CMC)	Mucoadesivo	Polímero hidrossolúvel que incha em contato com a água até sua completa dissolução ² .
Glicerina	Mucoadesivo	Forma uma película no local de sua aplicação ³ . Trata-se de um composto higroscópico
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Agente carreador aumenta a permeabilidade da membrana	Transporta consigo fármacos que se encontram dissolvidos nela através das membranas ⁴ . Trata-se de um composto higroscópico com grande capacidade de penetração favorecendo transporte paracelular ³ .
Propilenoglicol	Mucoadesivo Agente carreador	Forma uma película no local de sua aplicação. Composto higroscópico. Transporte parecelular ³ .
Tween 80	Aumenta a permeabilidade da membrana	Agente surfactante. Age promovendo perturbação dos lipídios intercelulares e da integridade da camada proteica e facilitando o transporte transcelular ³ .

Notas:

¹ (Brunton *et al.*, 2012); ² (Asija1 *et al.*, 2013); ³(Dodla e Velmurugan, 2013); ⁴(Rand-Luby *et al.* 1996).

3.4 Metodologia de análise de concentração de ocitocina

A concentração de ocitocina pode ser medida no sangue de bovinos pelo método Radioimunoensaio (RIA – Radio-imuno-assay) (Gorewit, 1979; Schams *et al.*, 1984; Gorewit e Gassman, 1985; Bruckmaier *et al.*, 1993) ou Enzimoimunoensaio (ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Marnet *et al.*, 1998; Porcionato

et al., 2005; Bochini *et al.*, 2014; Dal Monte *et al.*, 2014; Robinson, 2014). As duas técnicas, RIA e EIA, foram usadas para detectar uma grande variedade de anticorpos e antígenos. Os procedimentos e princípios utilizados na técnica EIA são semelhantes aos utilizados pela técnica RIA, mas sua vantagem é que utiliza enzimas em vez de isótopos radioativos como marcadores (Amado, 2002).

De acordo com Robinson (2014), a maioria dos estudos publicados sobre concentração de ocitocina utilizaram o método EIA. Também segundo o autor, há uma grande variedade de protocolos utilizados por pesquisadores (Quadro 03), o que torna possível diversas opções para o desenvolvimento dos experimentos.

Quadro 03: Variedade de protocolos em 39 trabalhos publicados sobre concentração de ocitocina no sangue de várias espécies

OCITOCINA EXTRAÍDA DO PLASMA	Nº	ANTICOAGULANTE	Nº	UTILIZOU INIBIDOR (APROTIMINA)	Nº
Sim	13	EDTA	12	Sim	7
Não	17	Heparina	10	Não	7
Não relataram ou Usaram soro	9	Não relataram	17	Não relataram	25

Fonte: Adaptado de Robinson (2014).

Na literatura consultada duas opções de anticoagulantes foram encontradas como válidas em diversos experimentos, vacutainer com heparina ou com EDTA e aprotinina. Robinson (2014) utilizou a heparina, motivado pelo alto custo da aprotinina. O manual do Kit Oxytocin EIA (da Enzo) indica a utilização de EDTA e aprotinina, mas adverte que a atividade do conjugado é afetada por concentrações de agentes quelantes (>10nM), tais como EDTA e EGTA.

Relativamente ao tratamento das amostras, verificou-se a existência de indicações para análise a partir de plasma sem ou com extração de ocitocina, este último com a utilização das colunas cromatográficas c-18. O manual do kit (Oxytocin EIA da Enzo) não descreve qual o protocolo deveria ser seguido para a preparação das diversas amostras que poderiam ser utilizadas (soro, plasma, saliva, leite, urina ou líquido cefalorraquidiano). Apenas explica como deve ser feita a diluição para o

caso de amostras com concentração maior que a curva padrão ou o método de extração, indicado para amostras que não podem ser diluídas suficientemente ou para concentrar amostras.

Robinson (2014) analisou primeiramente o plasma sem extração de ocitocina, depois repetiu sua análise utilizando o método de extração. Segundo o autor, não houve correlação entre os resultados obtidos de concentração de ocitocina no plasma com ou sem extração de ocitocina, sendo que os do plasma sem extração foram muito maiores que os do plasma com extração.

4. MATERIAIS E METÓDOS

O trabalho foi dividido em quatro fases: uma fase laboratorial, seguida de duas experimentais, terminando com outra fase laboratorial. O projeto deste trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob protocolo 116/2013.

4.1 Produção das formulações com ocitocina

A primeira fase laboratorial foi realizada no Departamento de Farmacologia (ICB/UFMG)¹⁴. Foram produzidas sete formulações com ocitocina para aplicação vaginal, todas com concentração de 5 UI/mL (Figura 09).



Figura 09 – Sete formulações com ocitocina e ocitocina comercial utilizadas neste experimento.
Fonte: Arquivo pessoal.

¹⁴ Trabalho desenvolvido pelo professor Dr. Igor Dimitri Gama Duarte.

Os produtos associados foram selecionados por serem agentes facilitadores para absorção, com objetivo de verificar sua habilidade de conduzir a ocitocina visando atingir maior concentração plasmática no menor tempo possível. A ocitocina injetável usada foi uma formulação comercial denominada Placentex® do laboratório Agener União. As diversas composições dos veículos utilizados e características estão descritas abaixo (Quadro 04).

Quadro 04- Características das formulações utilizadas

Codificação	Formulação	Concentração
A	Ocitocina em água ¹	5 UI/mL
B	Ocitocina em Álcool Polivinílico (PVA) ¹ 4% P/V ³	5 UI/mL
C	Ocitocina em Carboxi Metil Celulose (CMC) ¹ 2% P/V ³	5 UI/mL
D	Ocitocina em Glicerina ¹ 2% V/V ⁴	5 UI/mL
E	Ocitocina comercial ²	10 UI/mL
F	Ocitocina em Dimetilsulfóxido (DMSO) ¹ 10% V/V ⁴	5 UI/mL
G	Ocitocina em Propilenoglicol ¹ 25% V/V ⁴	5 UI/mL
H	Ocitocina em Tween ¹ 80 10% V/V ⁴	5 UI/mL

Notas:

¹ Formulações produzidas; ² Formulação comercial Placentex® do Laboratório Agener União; ³% P/V = porcentagem peso por volume; ⁴ % V/V = porcentagem volume por volume.

4.2 Testes Piloto

Sete coletas foram realizadas ao longo experimento, sendo que duas foram realizadas após a coleta das amostras do experimento propriamente dito. Seis foram feitas no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, e uma foi realizada na Fazenda Experimental Hélio Barbosa, com objetivo de repetir os mesmos animais do experimento.

As coletas de amostras foram feitas para verificar as seguintes condições:

- A utilização do tronco e a forma de conter do animal, visando evitar a ocorrência de acidentes;

- Qual seria a melhor veia a ser puncionada e a forma que seria mais eficiente. Inicialmente, a veia mamária seria utilizada para coleta das amostras, entretanto verificou-se que coletar o sangue nesta veia não seria viável no contexto proposto e que a coleta poderia ser na veia jugular sem maiores diferenças, reduzindo inclusive o estresse dos animais.
- A utilização de cateter, planejada no projeto inicial também foi descartada por não facilitar o procedimento. Eles entupiram e se deslocaram facilmente quando o animal era solto, exigindo manuseio frequente, o que causaria flebite. Já a coleta com agulha e seringa descartáveis foi realizada de forma mais prática e eficiente. A prévia higienização do local puncionado com algodão embebido em álcool iodado foi suficiente para não provocar flebites ou edemas;
- Testou-se também o acesso a vagina para administração das formulações no local proposto para aplicação de ocitocina, no tempo previsto, com o animal no tronco de contenção. Verificou-se a necessidade de utilizar uma sonda mais longa e de ajuda para encaminhar a ponta da sonda pela vagina, com a mão introduzida no reto do animal, garantindo assim que o produto fosse aplicado no final do saco vaginal e não fosse expelido por alguma contração;
- Fornecer material para os testes laboratoriais.

Os testes em laboratório foram realizados para verificar:

- A qualidade da amostra em função da forma de coleta, acondicionamento, transporte, centrifugação para separação do plasma e transferência deste para tubos *eppendorfs*. Os testes foram iniciados sempre ao final do procedimento de coleta. Verificou-se nesta oportunidade que coletar o sangue formando vácuo, o que ocorre quando é necessário desentupir ou quando a agulha se desloca da veia, promovia hemólise, deixando a amostra inadequada para o experimento;

- Se haveria a necessidade de diluir a amostra de plasma. Verificou-se com este teste, que para trabalhar com plasma total seria necessário diluir a amostra na proporção de 1:16 com Assay Buffer. Já as amostras submetidas ao processo de extração de ocitocina não precisaram ser diluídas;
- A melhor forma de manusear os materiais e equipamentos para utilização do Kit EIA de ocitocina;
- Como tornar possível preparar o número maior de amostras ao mesmo tempo, o que foi feito por meio da adaptação de equipamento para evaporar maior número de amostras simultaneamente (Figura 10).



Figura 10 – Processo de evaporação de amostras de plasma após processo de extração. Evaporação manual unitária e com a utilização de equipamento adaptado.
Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 Experimento (2ª fase a campo)

4.3.1 Localização

A coleta das amostras foi realizada na Fazenda Experimental Hélio Barbosa, da UFMG, localizada na cidade de Igarapé. A duração do tempo de coleta foi de oito dias, no período de 01 a 08 de outubro de 2015.

4.3 2 Animais experimentais

Nesta fase foram submetidas aos tratamentos oito novilhas Girolando 3/4, com idades entre 15 e 28 meses e pesos entre 310 e 410 kg. Nenhuma ação de interferência ou identificação da fase em que se encontravam no ciclo estral foi realizada, no entanto não foram inseminadas e/ou cobertas e não estavam gestantes.

4.3 3 Aplicação de ocitocina

O experimento consistiu na aplicação endovaginal de 2 mL (10 UI) das sete formulações de ocitocina e uma aplicação endovenosa de 1 mL (10 UI) de ocitocina comercial, totalizando 8 tratamentos por dia. Ao longo de oito dias todos os animais foram submetidos a uma aplicação de cada um dos tratamentos.

A formulação contendo ocitocina foi introduzida utilizando uma sonda de uso individual acoplada a uma seringa, e a ocitocina endovenosa pela veia jugular.

4.3.4 Coleta das amostras, processamento e armazenamento

As amostras de sangue (6 mL) foram colhidas da veia jugular utilizando seringas e agulhas descartáveis (Figura 11).



Figura 11 – Coleta, organização e acondicionamento das amostras a campo.

Fonte: Arquivo pessoal.

A primeira amostra foi colhida no momento anterior à aplicação da ocitocina (tempo zero) e por mais seis vezes (no minuto 3 e a cada 3 minutos até completar 18 minutos) (Figura 12).

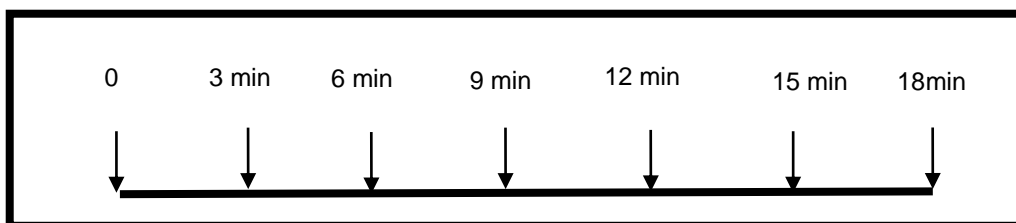


Figura 12 – Esquema temporal das coletas de amostras de sangue nos animais experimentais.

As amostras foram colocadas em tubos heparinizados e acondicionadas em caixa térmica com gelo.

O tempo total para coleta das amostras diárias foi de aproximadamente quatro horas. A cada hora as amostras foram transferidas para geladeira até que todas as amostras fossem colhidas. Foram centrifugadas a 3.000 g por 15 minutos para obtenção do plasma logo após o fim da coleta de cada dia (Figura 13). O plasma foi fracionado em duas partes ao ser transferido para os tubos *eppendorfs* (amostra e duplicata). As amostras foram armazenadas a -20°C e as duplicatas foram armazenadas a -70°C .



Figura 13 – Amostras para serem centrifugadas e amostras nos tubos *eppendorfs* contendo plasma.
Fonte: Arquivo pessoal.

4.4 Dosagem de ocitocina

As análises foram feitas utilizando o kit Elisa comercial da Enzo (Oxytocin EIA). As primeiras amostras foram analisadas com o plasma total, conforme descrito no item 4.4.1 (Protocolo de preparo das amostras de plasma sem extração). Depois foram refeitas utilizando as duplicatas e o método de extração de ocitocina do plasma utilizando coluna cromatográfica C-18 produzidas pela empresa Waters, conforme descrito no item 4.4.2 (Protocolo para extração de ocitocina do plasma).

4.4.1 Protocolo de preparo das amostras de plasma sem extração

O preparo foi feito da seguinte forma:

- 1- As amostras foram expostas à temperatura ambiente (19 a 22°C), com 30 minutos de antecedência;
- 2- A solução tampão para ensaio foi preparada para diluição das amostras imediatamente antes da utilização, diluindo 10 mL de tampão “Assay Buffer” em 90 mL de água deionizada. A porção não utilizada foi descartada;
- 3- Foi feita a diluição 1:16 das amostras (condição proposta no manual e verificada no teste Piloto) da seguinte forma:
 - Foram pipetados 600µL da solução tampão em cada tubo *eppendorf*;
 - Foram pipetados 40µL de cada amostra nos respectivos tubos *eppendorfs*;
 - As amostras tamponadas foram homogeneizadas utilizando vortex e a leitura da concentração utilizando kit (Oxytocin EIA).

4.4.2 Protocolo para extração de ocitocina do plasma

As duplicatas das amostras, que estavam armazenadas a -70° C, foram submetidas ao processo de extração de ocitocina. O procedimento foi feito como descrito a seguir:

- 1- As amostras foram retiradas do freezer e deixadas na temperatura ambiente, com 30 minutos de antecedência;
- 2- A solução (TFA 0,1%) foi preparada diluindo 0,5 mL de ácido tricloroacético em 500 mL de água deionizada;
- 3- A solução (95% ACN + 5% (TFA 0,1%)) foi preparada diluindo 5 mL de TFA 0,1% em 95 mL de acetonitrile puro;
- 4- A diluição 1:2 das amostras foi feita da seguinte forma:
 - Foram pipetados 750 μ L da solução TFA 0,1% em cada tubo *eppendorf* (previamente identificado);
 - Foram pipetados 750 μ L de cada amostra nos respectivos tubos *eppendorfs* e homogeneizando utilizando o vortex.
- 5- As amostras foram centrifugadas a 17.000g por 15 minutos a 4 °C;
- 6- As colunas c-18 Sep-Pac da Waters foram colocadas no aparelho Visiprep DL (Disposable Liner) Vacuum Manifold;
- 7- As colunas c-18 Sep-Pac foram equilibradas com 1mL de acetonitrile;
- 8- Dando sequência, as colunas foram lavadas com 15 mL de TFA 0,1%;
- 9- Foi pipetado 1 mL do sobrenadante da amostra na coluna c-18 Sep-Pac;
- 10- As colunas foram novamente lavadas com 15 mL de TFA 0,1% e o lavado foi descartado;
- 11- A amostra foi eluída lentamente com 3 mL de (95% ACN + 5% (TFA 0,1%)) e coletada em tubo de ensaio;
- 12- Depois de recuperada, a amostra foi evaporada utilizando gás nitrogênio, congelada e armazenada a -20°C por até sete dias, quando todas as amostras já estavam devidamente preparadas para serem utilizadas para leitura da concentração de ocitocina.

4.4.3 Preparo dos reagentes para Elisa

Foi utilizado o protocolo descrito a seguir, para preparar os reagentes para a leitura de ocitocina.

- 1- A solução tampão foi preparada imediatamente antes da utilização, diluindo 10 mL de “Assay Buffer” em 90 mL de água deionizada. A porção não utilizada foi descartada;
- 2- A ocitocina padrão (10.000 pg/mL) foi retirada do freezer com 30 minutos de antecedência para que descongelasse naturalmente à temperatura ambiente. A curva padrão foi formada utilizando 7 diluições da ocitocina padrão (Figura 14), conforme as seguintes orientações:
 - Foram identificados sete tubos (eependof) de 12mm x 75mm (numerados de 1 a 7);
 - Foram pipetados 900µL da solução tampão no tubo 1;
 - Foram pipetados 500µL da solução tampão nos tubos numerados de 2 a 7;
 - Foram adicionados 100µL de ocitocina padrão (10.000 pg/mL) no tubo 1 e agitado utilizando o vortex;
 - Foram pipetados 500µL do tubo 1, adicionados no tubo 2 e agitados utilizando o vortex;
 - Foram pipetados 500µL do tubo 2, adicionados no tubo 3 e agitados utilizando o vortex;
 - Os procedimentos foram repetidos para os tubos 3 até o 7;
 - As concentrações de ocitocina nos tubos de 1 a 7 foram de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 e 15,6 pg/mL, respectivamente.
- 3- A ocitocina conjugada foi mantida a -20° C e para utilizá-la, a mesma foi retirada com 30 minutos de antecedência e exposta a temperatura ambiente;
- 4- A solução de lavagem foi preparada diluindo 5 mL de tampão de lavagem “Wash Buffer” em 95% de água deionizada.



Figura 14 – Diluições de ocitocina padrão.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.4 Procedimentos para dosagem de ocitocina

Todos os reagentes e amostras foram retirados do freezer e expostos à temperatura ambiente com 30 minutos de antecedência. As amostras extraídas foram ressuspensas com 500 μL de solução tampão. O procedimento de ensaio foi realizado da seguinte forma:

- 1- Foi definido, utilizando a folha de ensaio de leiaute, o número de poços e a localização das amostras nos poços a serem utilizados;
- 2- A placa foi retirada do ziploc e organizada de acordo com o leiaute previsto;
- 3- Foram pipetados 100 μL da solução tampão nos poços de ligações não específicas (NSB) e ligação zero (Bo);
- 4- Foram pipetados 100 μL das soluções padrão de 1 a 7 nos poços a eles destinados;
- 5- Foram pipetados 100 μL de cada amostra de plasma nos poços desconhecidos “*Unknown*”;
- 6- Foram pipetados 50 μL de solução tampão nos poços NSB;
- 7- Foram pipetados 50 μL da ocitocina conjugada em cada poço, exceto no TA e no branco “*Blank*”;
- 8- Foram pipetados 50 μL do anticorpo de cor Amarelo em cada poço exceto no TA, Blank e NSB. Neste momento todos os pocinhos ficaram

verdes, exceto os NSB, que ficaram azuis e os poços TA e Blank, que estão vazios e incolores (Figura 15);

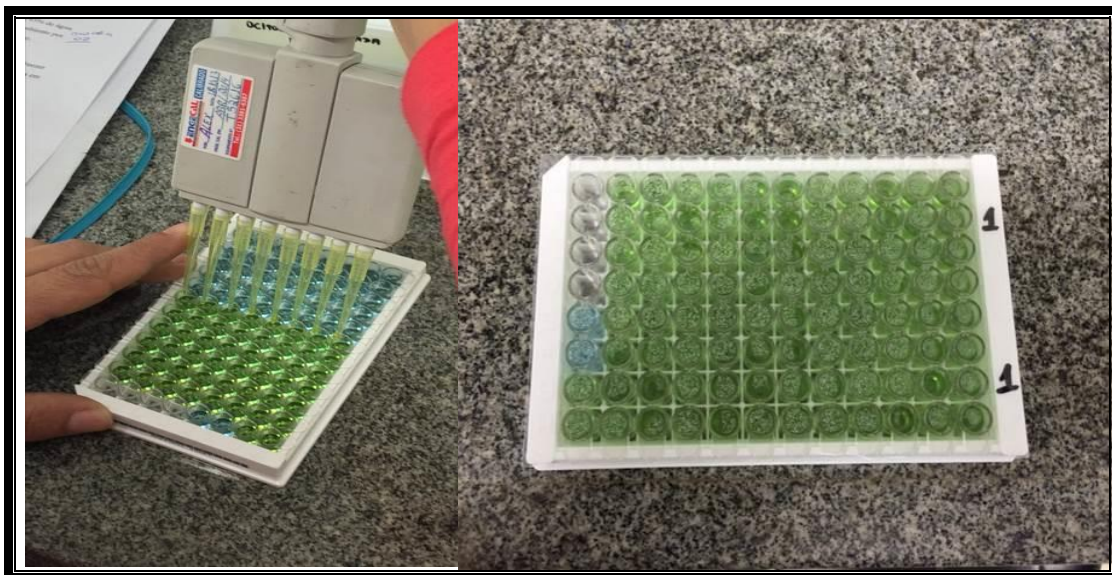


Figura 15 – Placa de EIA pronta para ser incubada a 4°C por período de 18-24 horas.
Fonte: Arquivo pessoal.

- 9- Foi colocado o adesivo próprio do kit para selar. A placa foi balançada delicadamente com movimentos circulares para misturar e, em seguida, colocada para incubar a 4° C por período de 18-24 horas;
- 10- Após a incubação os conteúdos de todos os poços foram descartados e os poços lavados adicionando-se 400 µL de solução Wash Buffer em cada um dos poços. A lavagem foi repetida por mais duas vezes completando 3 lavagens;
- 11- Após as lavagens, os pocinhos foram esvaziados e secos batendo a placa firmemente no papel toalha sobre a bancada até remover qualquer resíduo da solução Wash Buffer;
- 12- Foram pipetados 5 µL da ocitocina conjugada (azul) nos poços TA;
- 13- Foram pipetados 200 µL da solução substrato pNpp para cada poço. Em seguida a placa foi incubada à temperatura ambiente por uma hora sem ser agitada;

- 14- Foram pipetados 50 μ L de solução de parada “*Stop*” em cada poço.
Esta solução tem a propriedade de interromper a reação;
- 15- A placa foi lida imediatamente utilizando o leitor TP-READER da Thermo Plate para leitura Elisa (Figura 16). A densidade óptica utilizada foi de 405 nm.

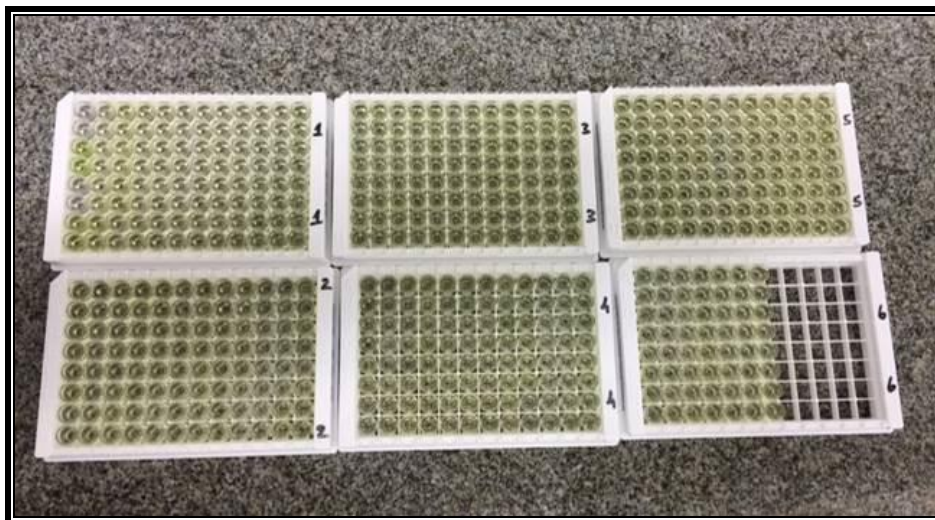


Figura 16 – Placas de EIA utilizadas para leitura de concentrações de ocitocina.
Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.5 Cálculos dos resultados

Os cálculos dos resultados para concentração de ocitocina nas amostras foram feitos utilizando um programa de análise denominado Enzo Life Science Oxytocin, disponível no endereço <http://www.myassays.com/>. A equação de curva utilizada foi de quatro parâmetros de curva logística. Os resultados foram informados na unidade de picograma por mililitro (pg/mL).

Os valores encontrados foram multiplicados por 0,90 para efeito de calibração do kit Elisa comercial da Enzo (Oxytocin EIA), conforme orientação descrita no manual.

4.5 Delineamento experimental

Foi utilizando delineamento em quadrado latino (QL 8x8) com oito tratamentos em oito dias (Quadro 05). As respostas são de fluxo continuado e foram realizadas em sete tempos. Os oito animais receberam os oito tratamentos, condição permitida segundo Sampaio (2007). O modelo experimental foi realizado conforme o quadro 05.

Quadro 05 – Modelagem de delineamento em QL 8x8 de novilhas Girolando submetidas a oito formulações contendo ocitocina sintética.

		Dias (colunas)							
Animais (linhas)		1	2	3	4	5	6	7	8
1		A	D	G	H	E	F	C	B
2		D	A	F	E	H	G	B	C
3		G	F	A	B	C	D	E	H
4		B	C	H	G	F	E	D	A
5		C	B	E	F	G	H	A	D
6		F	G	D	C	B	A	H	E
7		E	H	C	D	A	B	G	F
8		H	E	B	A	D	C	F	G

Notas: (A) Ocitocina em Água; (B) Ocitocina em PVA; (C) Ocitocina em CMC; (D) Ocitocina em Glicerina; (E) Ocitocina comercial injetável; (F) Ocitocina em DMSO. (G) Ocitocina em Propilenoglicol e (H) Ocitocina em Tween80.

4.6 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico InfoState, versão 2012, desenvolvido por pesquisadores da Universidade Nacional de Córdoba, Argentina. Foi realizada a análise de variância não paramétrica, utilizando o teste Kruskal Wallis.

Tal opção se deu em virtude de os valores encontrados para concentração plasmática de ocitocina não apresentarem distribuição normal, com diferentes coeficientes de variação nos tempos e tratamentos (dados heterocedásticos). Desta forma, foi identificada a necessidade de usar o método estatístico não paramétrico, conforme sugere Sampaio (2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram analisadas primeiramente a partir do plasma total, em virtude da suposta viabilidade deste método, conforme verificado na revisão de literatura, e do maior custo em usar o método de extração de ocitocina do plasma. O resultado desta primeira análise pelo método EIA, relativo a todas as formulações, pode ser visualizado no gráfico 01.

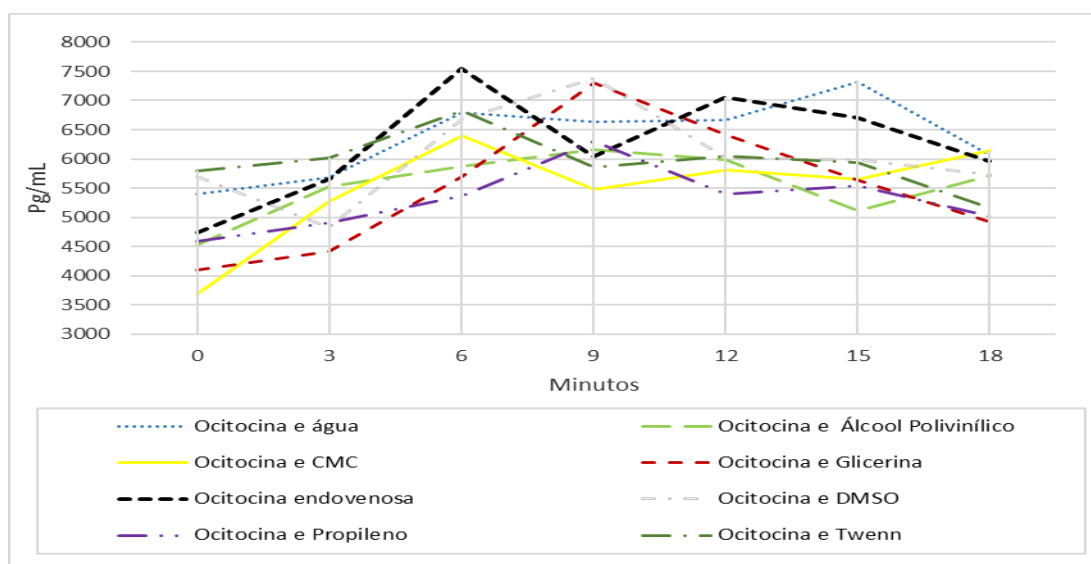


Gráfico 01 – Concentrações plasmáticas médias de ocitocina em pg/mL obtidas de amostras de plasma total (sem extração), de todas as formulações aplicadas contendo 10 UI de ocitocina conforme tempo após aplicação.

As concentrações plasmáticas médias de ocitocina obtidas com a aplicação de ocitocina endovenosa foram equivalentes às obtidas com as demais aplicações pela via vaginal ($p>0,05$). Isso não pareceu correspondente à realidade, já que a aplicação de ocitocina endovenosa deveria representar a concentração máxima e as demais aplicações de ocitocina pela via vaginal valores menores, pela necessidade de passar por processo de absorção até alcançar a corrente sanguínea.

Mesmo que, de acordo com Robinson (2014), 17 em 30 trabalhos (Quadro 03) tenham sido desenvolvidos com plasma sem extração, os resultados obtidos por este método geraram incertezas e dúvidas quanto a sua precisão. O valor de concentração plasmática basal média obtida neste experimento foi de 4.815,16 pg/mL, aproximadamente 1000 vezes maior do que o obtido na maioria dos trabalhos verificados na literatura sobre concentração de ocitocina em bovinos, divergindo inclusive de Szeto *et al.* (2011), que ao comparar os métodos de utilizar ou não a extração de ocitocina do plasma sanguíneo em trabalhos com humanos, encontrou resultados 100 vezes maiores que os obtidos em plasma com extração de ocitocina.

Em trabalhos com bovinos que não utilizaram o método de extração de ocitocina, a concentração basal encontrada foi de 270,53 e 574,87pg/ml em Gorewit, (1979) e Gorewit e Gassman, (1985) respectivamente¹⁵. Assim, os testes foram refeitos utilizando as amostras em duplicata e o método de extração de ocitocina do plasma pela coluna cromatográfica C-18 produzida pela empresa Watters.

Os novos resultados verificados foram diferentes daqueles obtidos na primeira leitura utilizando plasma total. A diferença entre os métodos existe, segundo Marnet, (1994), porque a utilização do método de extração prévia de ocitocina no plasma aumenta a sensibilidade do teste EIA de ocitocina.

Foi verificado na segunda leitura das amostras que a aplicação de 10 UI de ocitocina endovenosa alcançou concentrações médias muito maiores que as

¹⁵ Os valores originais em $\mu\text{U/ml}$ foram transformados para pg/mL multiplicando por 70, dividindo por 2,07. Segundo Gorewit, (1979), 2,0 $\mu\text{U/ml}$ de ocitocina equivale a 0,07ng/ml.

verificadas nos tratamentos de aplicação da mesma quantidade de ocitocina via mucosa vaginal ($p < 0,05$). As concentrações de ocitocina obtidas pelo método EIA de todas as formulações utilizadas neste trabalho, feitas com as amostras com extração da ocitocina do plasma, estão representadas no Gráfico 02.

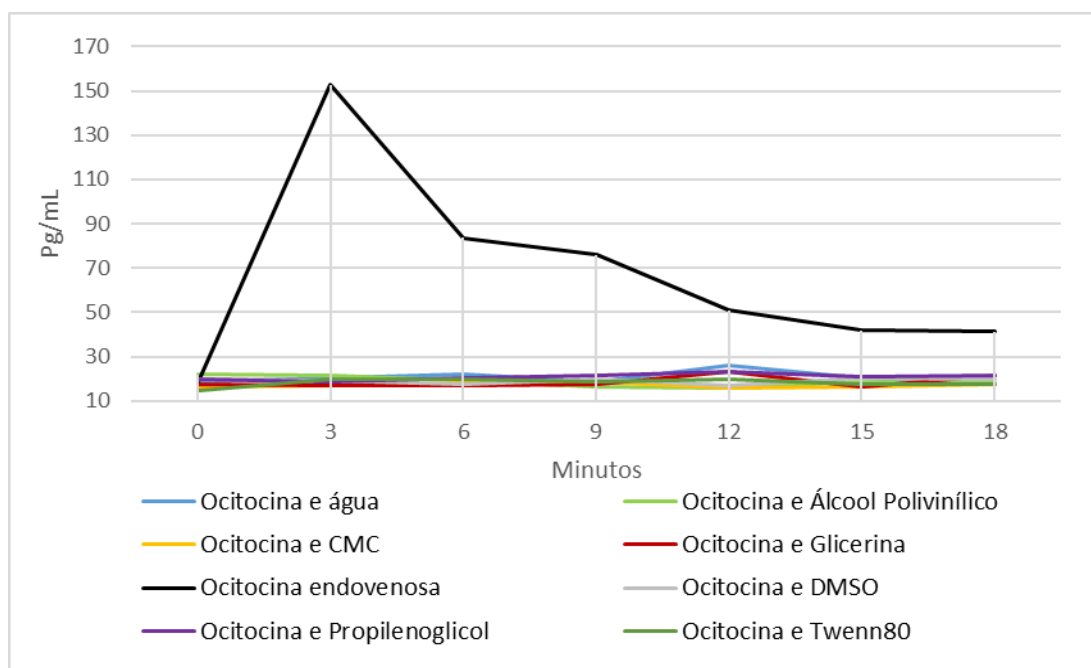


Gráfico 02 – Concentrações plasmáticas médias de ocitocina (pg/mL de plasma – com processo de extração) de todas as formulações contendo ocitocina conforme tempo após aplicação.

A concentração plasmática basal média de ocitocina encontrada foi de $18,33 \pm 2,18$ pg/mL. Este valor foi maior que o encontrado por Schams *et al.* (1984), $1,51 \pm 0,6$ pg/mL de plasma¹⁶ em trabalho com vacas da raça Pardo Suíço; por Bruckmaier *et al.*, (1993) que encontraram a concentração média de $1,5 \pm 0,3$ pg/mL¹⁷ em vacas Simental x Holandês Vermelho e Pardo Suíço e por Bruckmaier *et al.* (1997) com vacas Simental x Holandês Vermelho e Pardo Suíço, que encontraram concentração basal média de 6 ± 1 e 7 ± 1 pg/mL¹⁹. No entanto, a concentração basal foi menor que as encontradas por Porcionato *et al.* (2005) em vacas da raça Holandês, média de 20 pg/mL e em vacas mestiças Holandês x Zebu, média de 35 pg/mL.

¹⁶ Valores originais em pmol/L foram transformados para pg/mL multiplicando por 1007,19 e dividindo por 1000.

¹⁷ Valor original em ng/L que equivale a pg/mL.

A concentração basal de ocitocina plasmática depende da liberação endógena pela neurohipófise e/ou da liberação de ocitocina lútea. Entretanto, outros fatores parecem interferir nessa liberação. Em experimento com primatas (*Macaca mulatta*), Michopoulos *et al.* (2011) verificaram diferença na concentração basal de ocitocina dos animais em função da dominância. Fêmeas dominantes têm concentração maior que subordinadas. Uvnäs-Moberg *et al.* (2001) relataram diferenças na concentração basal de ocitocina em função do comportamento sexual em humanos (monogamia e satisfação sexual). Parceiros satisfeitos tem concentração mais elevada. Segundo Marnet *et al.* (1998) em trabalho realizado na França, observou-se diferença na concentração basal de ocitocina conforme a estação do ano, quando a concentração de ocitocina em ovelhas ordenhadas foi maior no outono que na primavera (27,5 pg/mL e 12 pg/mL, respectivamente).

É provável que outros fatores capazes de interferir na concentração plasmática de ocitocina ainda não tenham sido identificados ou estudados. Por exemplo, com referência a raça e idade. Quanto a raça, Porcionato *et al.* (2005) encontraram valor de ocitocina basal maior em vacas mestiças Holandês x Zebu do que em vacas Holandês ($p < 0,05$). Quanto a idade, nos trabalhos consultados sobre concentração plasmática de ocitocina, todos utilizaram animais adultos, nenhum com novilhas como foi feito neste experimento. Na fase experimental piloto deste trabalho, em um teste realizado para verificar os resultados do método de extração, foram medidas as concentrações basais de três animais, sendo duas vacas (uma Jersey, outra 7/8 Holandês) e uma novilha de 15 meses (mestiça Holandês x Zebu). As concentrações encontradas foram 8,05; 7,84 e 12,74 pg/mL respectivamente. Um minuto após aplicação de 10 UI de ocitocina a concentração obtida no plasma da novilha foi maior que a obtida em vacas, sendo 253,44; 203,76 e 413,19 pg/mL, na mesma ordem acima.

As concentrações de ocitocina plasmática elevadas obtidas com aplicação pela via endovenosa já eram previstas e pretendidas (Gráfico 03). Previstas porque a ocitocina foi aplicada em dose maior do que a necessária para ejeção do leite. Além

disso foi aplicada e medida diretamente no plasma. Pretendida para que a biodisponibilidade do fármaco aplicado via vaginal pudesse ser estimada.

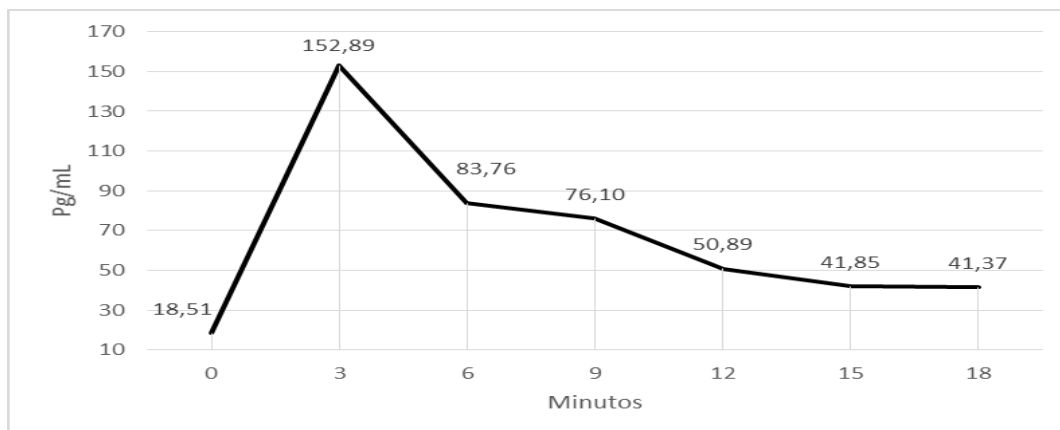


Gráfico 03: Concentração plasmática de ocitocina no plasma após aplicação de 10 UI pela via endovenosa

A ASC_{endovenosa} obtida pela aplicação de ocitocina foi de 1.306,30 pg/mL x minuto. A biodisponibilidade (F) desta via representa 100% por definição (Adams, 2003).

A concentração basal (tempo 0) obtida nos animais que receberam ocitocina endovenosa foi menor que nos demais tempos (3, 6, 9, 12 e 18 min) conforme se vê no Tabela 01 ($p < 0,05$).

As concentrações de ocitocina plasmática obtidas com a aplicação endovaginal das sete formulações testadas neste trabalho podem ser observadas no gráfico 04.

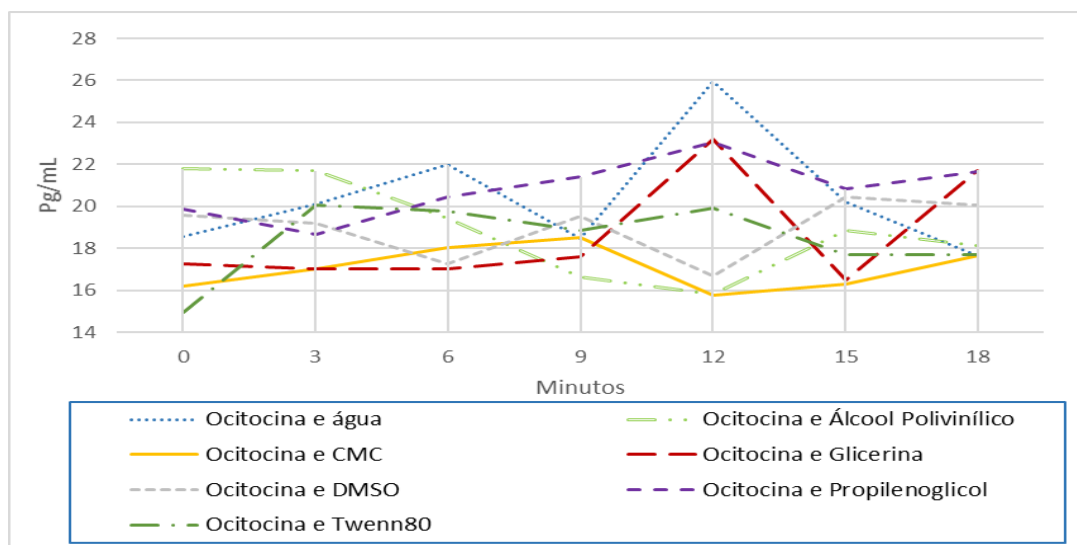


Gráfico 04 – Concentrações plasmáticas médias de ocitocina ao longo do tempo obtidas com aplicações de 2 ml (10 UI) das sete formulações pela via vaginal

Os valores na tabela 01 demonstram a concentração mediana de ocitocina obtida ao longo do tempo após aplicação das oito formulações utilizadas para os cálculos estatísticos.

Tabela 01: Valores descritivos da mediana (em pg/mL), concentração de ocitocina ao longo do tempo (em minutos), valores mínimos e máximos obtidos e número de repetições

Tratamento	Tempo em minutos						
	0	3	6	9	12	15	18
Ocitocina com Água	17,25 ^{aAB} (11,72 - 27,76) n=7	20,98 ^{aABC} (10,80 - 30,75) n=8	18,32 ^{aABC} (7,51 - 47,54) n=8	18,04 ^{aAB} (6,42 - 35,15) n=8	22,95 ^{aABCD} (11,48 - 62,47) n=8	18,84 ^{aAB} (7,51-37,04) n=8	17,13 ^{aAB} (7,32 - 31,66) n=8
Ocitocina com Álcool Polivinílico	20,77 ^{aABC} (5,73 - 40,84) n=8	24,44 ^{aABC} (6,24 - 34,51) n=8	15,41 ^{aAB} (11,25 - 37,56) n=8	15,27 ^{aAB} (8,08 - 28,17) n=8	13,86 ^{aAB} (9,50 - 24,60) n=8	16,43 ^{aAB} (3,31 - 39,72) n=8	19,21 ^{aAB} (4,16 - 33,06) n=8
Ocitocina com CMC	16,26 ^{aAB} (10,80 - 20,71) n=8	15,60 ^{aAB} (6,07 - 28,58) n=8	16,54 ^{aAB} (6,95 - 33,53) n=8	13,56 ^{aAB} (7,89 - 38,63) n=8	15,67 ^{aAB} (5,73 - 24,23) n=8	14,11 ^{aAB} (8,08 - 24,98) n=8	17,25 ^{aAB} (5,24 - 31,20) n=7
Ocitocina com Glicerina	15,54 ^{aAB} (9,71 - 27,34) n=8	20,38 ^{abAB} (4,46 - 22,07) n=8	15,25 ^{abAB} (7,51 - 27,76) n=8	16,25 ^{abAB} (10,58 - 32,12) n=8	23,51 ^{hBCDE} (12,20 - 34,01) n=8	15,75 ^{aAB} (7,14 - 31,66) n=8	23,10 ^{abABC} (10,36 - 30,75) n=8
Ocitocina endovenosa	18,77 ^{aAB} (12,44 - 27,34) n=8	146,66 ^{dF} (119,34 - 216,90) n=8	82,86 ^{cdF} (47,54 - 130,59) n=8	71,15 ^{bcF} (38,09 - 115,92) n=8	47,16 ^{bcEF} (27,34 - 103,14) n=8	36,55 ^{abCDEF} (14,20 - 76,74) n=8	36,12 ^{abDEF} (23,49 - 78,90) n=8
Ocitocina com DMSO	16,58 ^{aAB} (10,80 - 29,44) n=8	16,54 ^{aAB} (9,29 - 39,72) n=8	16,68 ^{aAB} (6,95 - 33,06) n=8	15,83 ^{aAB} (9,71 - 33,53) n=8	16,26 ^{aAB} (8,67 - 24,23) n=8	21,21 ^{aABC} (4,02 - 31,66) n=8	16,69 ^{aAB} (12,20 - 33,06) n=8
Ocitocina com Propilenoglicol	21,04 ^{aABC} (9,92 - 31,66) n=7	16,59 ^{aAB} (8,88 - 35,50) n=8	22,14 ^{aABC} (4,31 - 34,01) n=8	17,42 ^{aABC} (11,95 - 34,51) n=8	21,23 ^{aABCD} (11,48 - 40,28) n=8	20,55 ^{aABC} (13,43 - 26,54) n=8	19,40 ^{aABC} (12,68 - 41,41) n=8
Ocitocina com Tween80	15,85 ^{aA} (5,08 - 23,13) n=8	16,29 ^{aAB} (11,03 - 36,00) n=8	21,39 ^{aABC} (10,13 - 25,36) n=8	19,57 ^{aAB} (12,20 - 26,54) n=8	18,41 ^{aAB} (7,32 - 35,50) n=8	18,33 ^{aAB} (9,08 - 26,54) n=8	17,26 ^{aAB} (5,73 - 27,34) n=8

Notas:

1 - a, b, c, d nas linhas. Medianas com pelo menos uma letra minúscula em comum são equivalente ($p>0,05$).

2 - A, B, C, D, E, F nas colunas. Medianas com pelo menos uma letra maiúscula em comum são equivalentes ($p>0,05$).

As concentrações plasmáticas basais de ocitocina no tempo zero, antes das aplicações de todas as formulações, não diferiram ($p>0,05$). Foi observado que houve absorção de ocitocina quando a formulação de ocitocina em glicerina foi aplicada via vaginal, tendo sido verificada diferença entre os tempos 0 e 12 minutos

($p < 0,05$). O gráfico 05 demonstra a concentração plasmática média de ocitocina obtida com este tratamento ao longo do tempo.

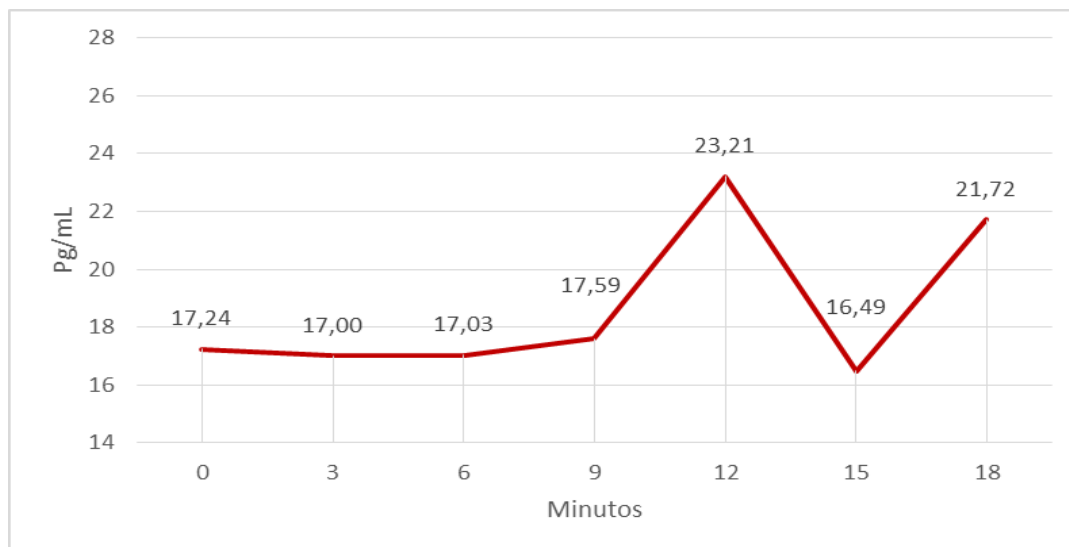


Gráfico 05 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em glicerina.

A concentração plasmática basal média de ocitocina nos animais que receberam as formulações de ocitocina e glicerina foi de $17,24 \pm 5,96$ pg/mL, alcançando no tempo 12 minutos após aplicação a concentração média de $23,21 \pm 6,74$ pg/mL. Verificou-se desta forma um acréscimo de 5,97 pg/mL na concentração média ($p < 0,05$). Schams *et al.* (1984) obtiveram máxima de ejeção do leite com acréscimo de 3,02 a 5,03 pg/mL¹⁸.

A ASC_{mucosa} obtida pela aplicação de ocitocina em glicerina foi de 332,35 pg/mL x minuto. Desta forma a biodisponibilidade (F) encontrada nesta formulação aplicada pela via vaginal foi de 25,44%.

A glicerina foi associada à ocitocina na formulação sugerida pela empresa Fagron BR, em informe técnico de formulação de spray nasal (Fagron, 2013). Segundo o informe, com esta associação a ocitocina é prontamente absorvida, entrando na circulação sistêmica. A glicerina é também um dos compostos utilizados como

¹⁸ Valores originais em pmol/L foram transformados para pg/mL multiplicando por 1007,19 e dividindo por 1000.

excipiente na formulação Syntocinon® spray nasal do Laboratório Novartis vendida comercialmente para humanos (Syntocinon®, 2015).

As análises estatísticas demonstraram também que as concentrações plasmáticas de ocitocina nos tempos 12 minutos foram iguais entre as formulações ocitocina em glicerina absorvida pela mucosa vaginal e a ocitocina endovenosa, que não passou pelo processo de absorção.

As concentrações plasmáticas obtidas com a aplicação vaginal das formulações de ocitocina em propilenoglicol estão demonstradas no gráfico 06.

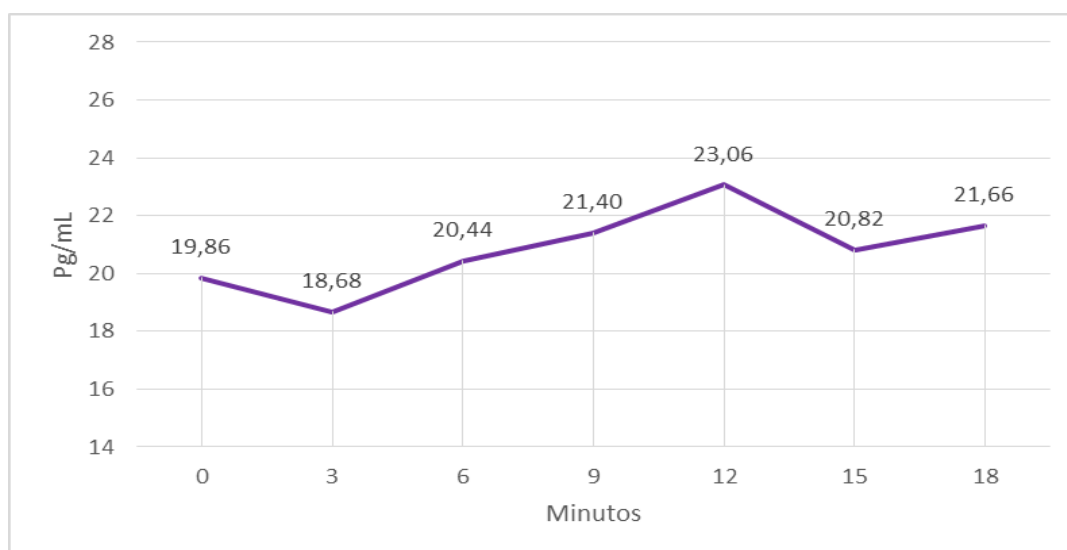


Gráfico 06 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em propilenoglicol.

A concentração plasmática basal média foi de $19,86 \pm 9,11$ pg/mL no tratamento em que foi realizada a aplicação de ocitocina em propilenoglicol, seguida pela concentração de $18,68 \pm 10,11$ pg/mL no tempo 3 minutos. A aplicação desta formulação alcançou valor máximo de $23,06 \pm 10,93$ pg/mL no tempo 12 minutos, valor bem próximo ao obtido no mesmo tempo pela aplicação de ocitocina em glicerina ($23,21$ pg/mL). No entanto, não houve diferença entre as concentrações médias de ocitocina ao longo do tempo para o tratamento pela aplicação de ocitocina em propilenoglicol ($p > 0,05$).

O propilenoglicol possui ação mucoadesiva. Assim como a glicerina, forma uma película no local de sua aplicação (Dodla e Vermurugan, 2013), aumentando o tempo de contato da ocitocina com a mucosa vaginal. Mais testes com este produto seriam necessários para verificar se outras concentrações ou dosagens poderiam aumentar a absorção de ocitocina desta associação.

As concentrações plasmáticas obtidas com a aplicação vaginal das formulações de ocitocina em água estão demonstradas no gráfico 07.

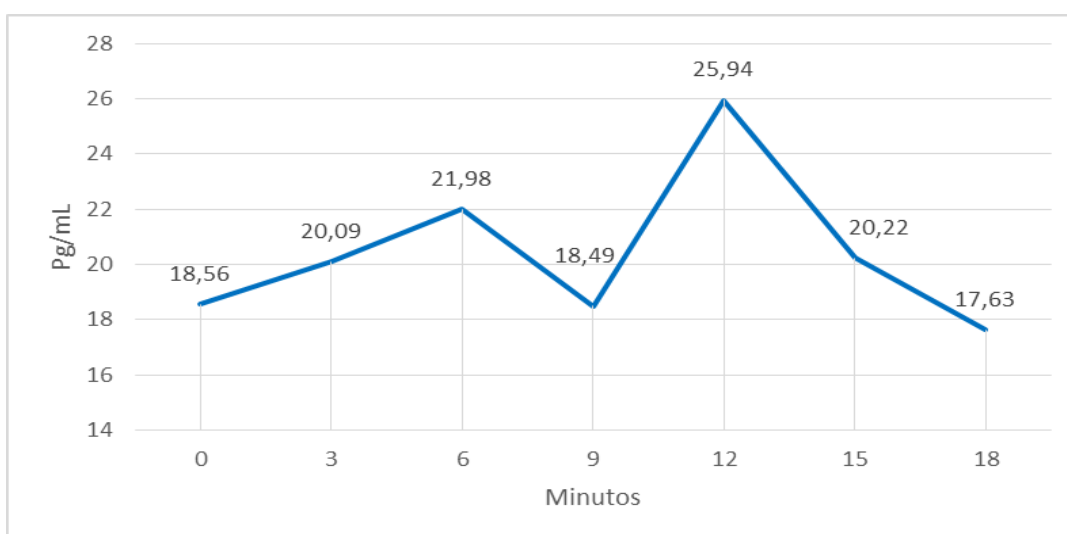


Gráfico 07 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em água.

A concentração plasmática basal média verificada no tratamento em que foi realizada a aplicação de ocitocina em água foi de $18,56 \pm 6,45$ pg/mL. No tempo 12 minutos, após aplicação desta formulação, a concentração média alcançou o valor máximo de $25,94 \pm 17,94$ pg/mL. Entretanto, a elevação de 7,38 pg/mL na concentração média de ocitocina comparada a concentração basal média não representou diferença em virtude do elevado coeficiente de variação ($p > 0,05$).

As concentrações plasmáticas nos tempos 0, 3, 6 e 9 minutos se parecem com as concentrações verificadas nos tratamentos em que foram aplicadas ocitocina em PVA, CMC, DMSO e Tween 80, em que possivelmente apenas a liberação de ocitocina endógena foi verificada. Mais testes com o tratamento pela aplicação de

ocitocina em água seriam necessários para confirmar se há absorção e em caso positivo, se esta aumentaria com o aumento da dose ou da concentração.

As concentrações plasmáticas obtidas com a aplicação vaginal das formulações de ocitocina em PVA, CMC, DMSO e Tween 80 estão demonstradas nos gráficos nos gráficos 08, 09, 10 e 11, respectivamente nesta ordem.

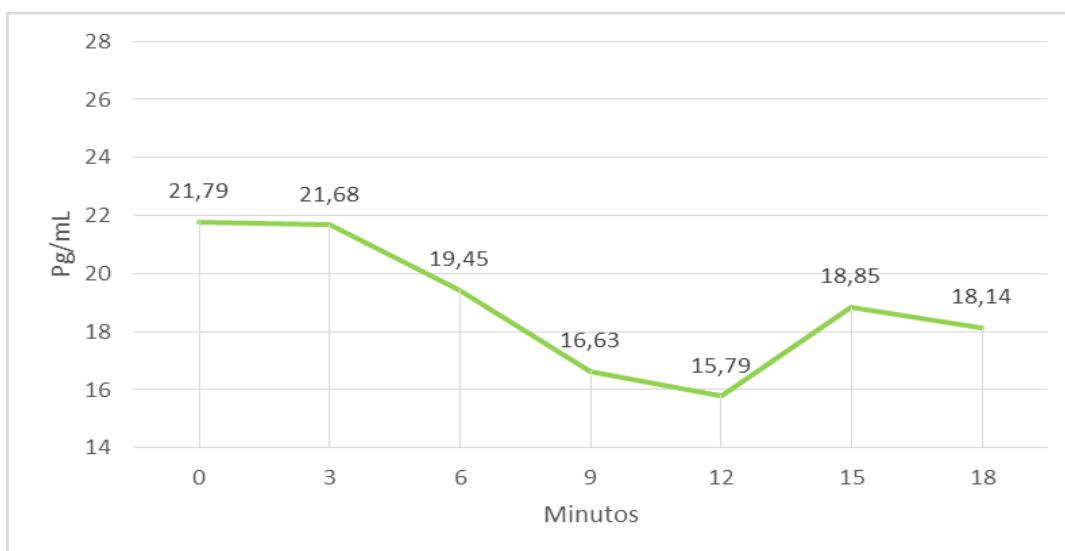


Gráfico 08 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em PVA.

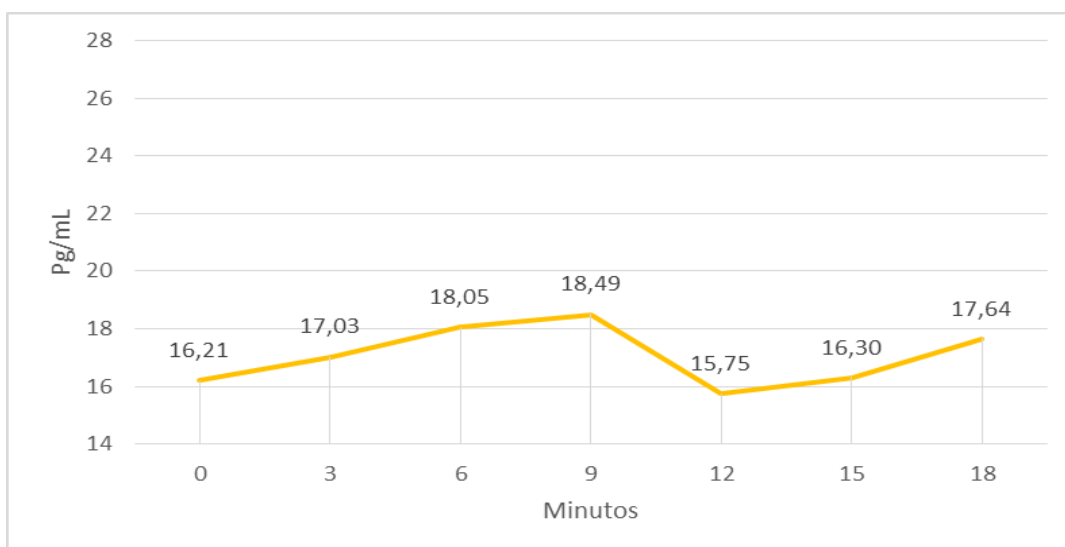


Gráfico 09 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) de formulação de ocitocina em CMC.

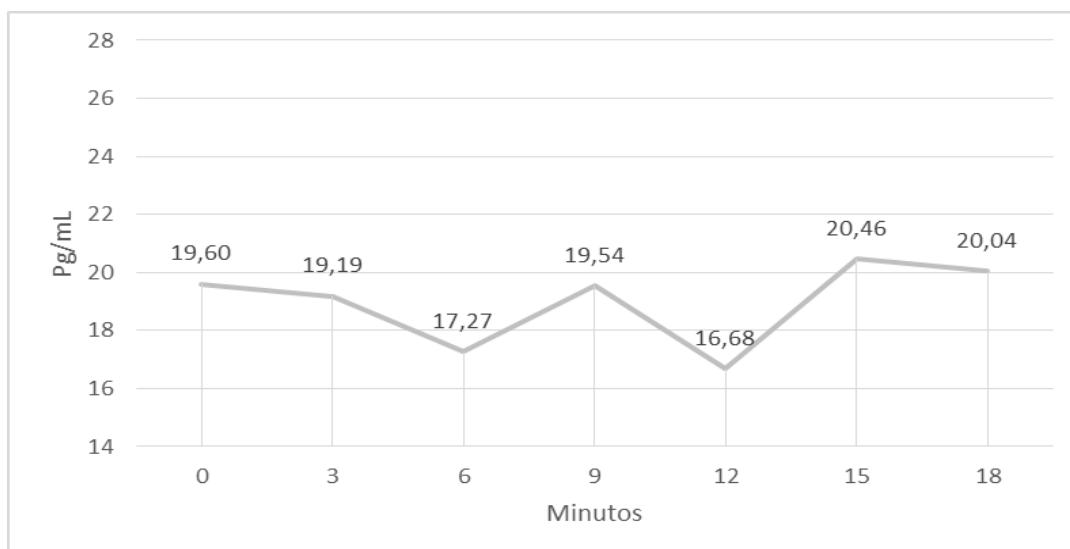


Gráfico 10 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) de formulação de ocitocina em DMSO.

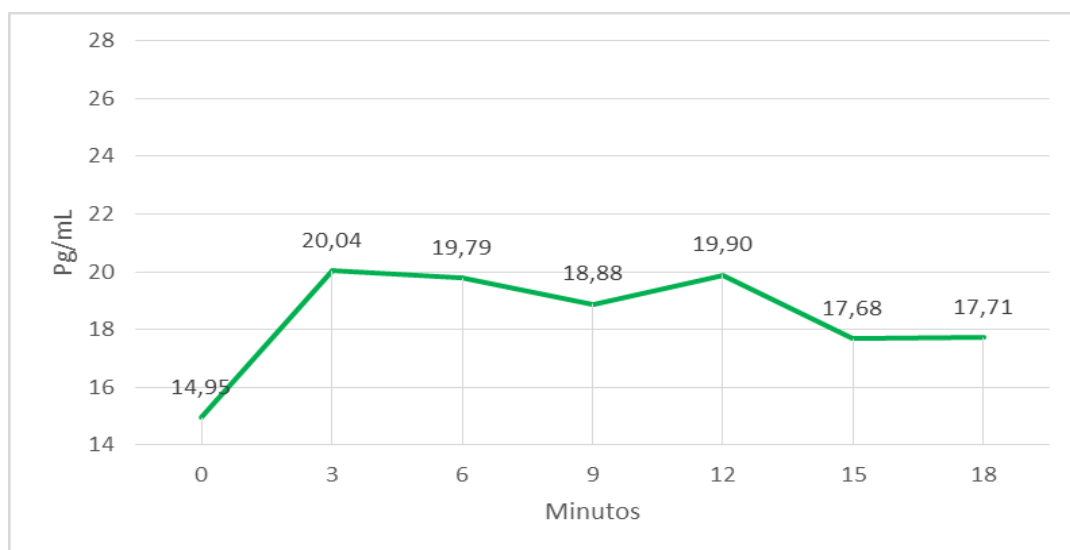


Gráfico 11 – Concentração plasmática média de ocitocina ao longo do tempo, obtida com aplicação vaginal de 2 ml (10 UI) da formulação de ocitocina em Tween 80.

Não houve diferença entre as concentrações plasmáticas médias de ocitocina ao longo do tempo ($p > 0,05$) nos tratamentos com a aplicação vaginal das formulações de ocitocina PVA, CMC, DMSO e Tween 80.

A concentração plasmática média máxima foi a basal no tratamento com aplicação de ocitocina em PVA, antes mesmo da aplicação da formulação. Nos tratamentos de ocitocina em CMC e DMSO, as concentrações máximas foram nos tempos 9 e

15 minutos, com pequenos acréscimos na concentração plasmática média em comparação com a basal. No tratamento de ocitocina em Tween 80, a concentração máxima foi no tempo 3 minutos. Prazo muito curto para atingir o pico da absorção pela via mucosa vaginal. O acréscimo foi de 5,09 pg/mL neste tratamento, e não representou diferença estatística ($p>0,05$).

No tratamento em que se aplicou ocitocina em DMSO, o comportamento verificado na curva e os valores observados até o tempo 18 minutos após aplicação sugerem que esta concentração possa ser de origem endógena, de forma semelhante ao que foi observado nos tempos 0, 3 e 6 e 9 minutos após aplicação de ocitocina em água e com a aplicação da formulação de ocitocina em PVA, CMC e Tween-80.

A ocitocina endógena é liberada em pulsos no leito capilar e eliminada pelo fígado e rins. Seria possível que, se tivesse sido estabelecido um grupo controle sem nenhum estímulo de liberação endógena ou aplicação exógena de ocitocina, ter-se-ia chegado a resultados mais conclusivos com relação a estes quatro últimos tratamentos.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados demonstraram que houve absorção pela via mucosa vaginal da formulação ocitocina em glicerina. O pico de concentração plasmática de ocitocina ocorreu 12 minutos após aplicação.
- O aumento da concentração plasmática de ocitocina atingido com a aplicação da formulação ocitocina com glicerina, de acordo com a literatura, seria suficiente para conseguir a ejeção do leite em vacas.
- Mais testes com aplicação dos tratamentos de ocitocina em propilenoglicol e em água, com outras concentrações e dosagens, seriam necessários para que se pudesse confirmar sua atuação como facilitadores ou não de absorção de ocitocina pela mucosa vaginal.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Até onde se conseguiu revisar na literatura, este trabalho tratou de um tema ainda não discutido, qual seja, a administração de ocitocina pela via mucosa vaginal. Por ser inédito o tema, trouxe mais perguntas do que respostas. Nas palavras de George Bernard Shaw, “a ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

Talvez mais importantes do que as conclusões acima apresentadas, sejam os caminhos apontados para os estudos necessários à complementação das mesmas. A continuidade destes estudos reforçará a viabilidade do uso da via vaginal como alternativa para a aplicação de ocitocina.

Os resultados foram obtidos em animais jovens, não lactantes nem gestantes. Novos testes em animais em lactação, com necessidade de aplicação de ocitocina exógena, por exemplo, confirmariam se o resultado obtido resolve os problemas de ejeção de leite. Mesmo em caso afirmativo, outras concentrações e dosagens poderiam ser testadas, com vistas a buscar a solução ideal.

Assim, pensa-se que será possível estabelecer a eficácia e a eficiência da utilização desta alternativa, e dar uma resposta efetiva ao problema que motivou o desenvolvimento deste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, H. R. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003, p. 18-19.

AKERS, R. M. *Lactation and mammary gland*. USA: Blackwell Publishing, 2002, p. 54-56.

ALVAREZ, F. J.; SAUCEDO, G.; ARRIAGA, A.; PRESTON, T. R. Effect on milk production and calf performance of milking cross bred european/zebu cattle in the abstinence or presence of the calf, and of rearing their calves artificially. *Tropical Animal Production*, v.5, p. 25-37, 1980.

AMADO, M. A. Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconvenientes. Repositório Científico do Instituto Politécnico de Viseu, *Revista Millenium*, nº 26, Jun-2002. Disponível em : <http://hdl.handle.net/10400.19/621>, acessado em 01.08.2016.

ARAÚJO, W. A. G.; CARVALHO, C. G. V.; MARCONDES, M. I. *et al.* Ocitocina exógena e a presença do bezerro sobre a produção e qualidade do leite de vacas mestiças. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 49, p. 465-470, 2012.

ASIJA, R.; KUMAWAT, J. K.; SHARMA, D. Mucoadhesive drug delivery system: a review. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics 1*, v. 12, p. 01-08, 2013.

ATTWOOD, A. T.; FLORENCE, Z. R. *Princípios físicos-químicos em farmácia*. 2ª ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, 2011, p. 505-510.

BAR-PELED, U.; MALTZ, E. BRUCKENTAL *et al.* Relationship between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 2726-2736, 1995.

BARTELS, A.; ZEKI, S. The neural correlates of maternal and romantic love. *NeuroImage*, v. 21, p. 1155-1166, 2004.

BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 3432-3451, 1992.

BELO, C. J., BRUCKMAIER, R. M. Suitability of low-dosage oxytocin treatment to induce milk ejection in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 63-69, 2010.

BJÖRKSTRAND, E.; AHLENIUS, S.; SMEDH, U.; UVNÄS-MOBERG, K. The oxytocin receptor antagonist 1-deamino-2-D-Tyr-(Oet)-4-Thr-8-Orn-oxytocin inhibits effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on plasma levels of insulin, cholecystokinin and somatostatin. *Regulatory Peptides*, v. 63, p. 47-52, 1996a.

BJÖRKSTRAND, E.; ERIKSSON, M.; UVNÄS-MOBERG, K. Evidence of a peripheral and central effect of oxytocin on pancreatic hormone release in rats. *Neuroendocrinology*, v. 63, p. 377-383, 1996b.

BJÖRKSTRAND, E.; HULTING, A. L.; UVNÄS-MOBERG, K. Evidence for a dual function of oxytocin in control of growth hormone secretion in rats. *Regulatory Peptides*, v. 69, p. 1-5, 1997.

BOCHINI, J. C.; ALVISI, R. D.; NEGRÃO, J. A. *et al.* Central and peripheral oxytocin profiles during milking in ewes. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 51, p. 68-77, 2014.

BRUCKMAIER, R. M.; MAYER, H.; SCHAMS, D. Effects of α - and β -adrenergic agonists on intramammary pressure and milk flow in dairy cows. *Journal Dairy Research*, v. 58, p. 411-419, 1991.

BRUCKMAIER, R. M.; SCHAMS, D.; BLUM, J. W. Aetiology of disturbed milk ejection in parturient primiparous cows. *Journal of Dairy Research*, v. 59, p. 479-489, 1992.

BRUCKMAIER, R. M.; SCHAMS, D.; BLUM, J. W. Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings: concentration of oxytocin, prolactin, cortisol, and b-endorphin. *Journal of Dairy Research*, v. 60, p. 449-456, 1993.

BRUCKMAIER, R. M.; ROTHENANGER, E.; BLUM, J. W. Measurement of mammary gland cistern size and determination of the cisternal milk fraction in dairy cows. *Milchwissenschaft*, v. 49, p. 543–546, 1994a.

BRUCKMAIER, R. M.; RITTER, C.; SCHAMS, D.; BLUM, J. W. Machine milking of dairy goats during lactation: udder anatomy, milking characteristics, and blood concentrations of oxytocin and prolactin. *Journal of Dairy Research*, v. 61, p. 457-466, 1994b.

BRUCKMAIER, R. M.; SCHAMS, D.; BLUM, J. W. Continuously elevated concentrations of oxytocin during milking are necessary for complete milk removal in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, v. 61, p. 323-334, 1994c.

BRUCKMAIER, R. M.; WELLNITZ, O.; BLUM, J. W. Inhibition of milk ejection in cows by oxytocin receptor blockade, α -adrenergic receptor stimulation and in unfamiliar surroundings. *Journal of Dairy Research*, v. 64, p. 315–325, 1997.

BRUCKMAIER, R. M.; BLUM, J. W. Oxytocin release and milk removal in ruminants. *Journal Dairy Science*, v. 81, p. 939-949, 1998.

BRUCKMAIER, R. M. Chronic oxytocin treatment causes reduced milk ejection in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, v. 70, p. 123-126, 2003.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman* – 12^a ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012, p. 482, 1103 – 1129, 1209 - 1210.

CALDAS, R. P.; MADALENA, F. E. Ordenha com ou sem bezerro. In: MADALENA, F. E.; MATOS, L. L.; HOLANDA JR., E. V. Produção de leite e sociedade. *Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*: Belo Horizonte, p. 243-260, 2001.

CAMPOS, O. F.; LIZIEIRE, R. S.; DERESZ, F.; *et al.* Sistemas de aleitamento natural controlado ou artificial. 1. Efeitos na performance de vacas mestiças holandês-zebu. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 22, p. 413-422, 1993.

- CARTER, C. S. Oxytocin and sexual behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 16, p. 131-144. 1992.
- CHOUDHURY, A.; DAS, S.; KAR, M. A review on novelty and potentiality of vaginal drug delivery. *International Journal of Pharm Tech Research*, v. 3, p. 1033-1044, 2011.
- COMBELLAS, J.; TESORERO, M.; GABALDÓN, L. Effect of calf stimulation during milking on milk yield and fat content of *Bos indicus* X *Bos taurus* cows. *Livestock Production Science*, v. 79, p. 227-232, 2003.
- DAL MONTE, O.; NOBLE, P. L.; TURCHI, J. *et al.* CSF and blood oxytocin concentration changes following intranasal delivery in macaque. *PLoS ONE*, v. 9(8), p. 01-06, 2014.
- DAVIES, C. J.; HILL, J. R.; EDWARDS, J. L.; *et al.* Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 267-280, 2004.
- DEVARAJAN, K.; RUSAK, B. Oxytocin levels in the plasma and cerebrospinal fluid of male rats: effects of circadian phase, light and stress. *Neuroscience Letters*. v. 367, p. 144-147, 2004.
- DODLA, S.; VELMURUGAN, S. Buccal penetration enhancers an overview. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 6, p. 39-47, 2013.
- DUKES, H. H., SWENSON, M. J.; REECE, W. *Fisiologia dos animais domésticos*. 12^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006, p. 644-661.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. *Tratado de Anatomia Veterinária*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996, p. 551-552.
- EIPPER, B.; MAINS, R. E. Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocrine Reviews*, v. 1, p. 27, 1980.

EURELL, J. A. *Histologia veterinária de Dellmann*. 6ª ed. Barueri, São Paulo: Editora Manole, 2012, p. 273-274.

EV-UFMG. *Professores da Escola investigam surto de Trypanossomose bovina em Minas Gerais*. Site da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Notícias. Em 13 de Agosto de 2014. Disponível em: http://www.vet.ufmg.br/noticias/exibir/1943/professores_da_escola_investigam_surto_de_trypanossomose_bovina_em_mi#.V9CL4PkrLIU, acessado em 01.08.2016

FAGRON: ocitocina spray, Informe Técnico Empresa Multinacional Holandesa. Filial São Paulo: 2013. Disponível em: <http://www.farmabin.com.br/files/OXITOCINA.pdf>, acessado em 02.01.2014.

FJELLESTAD-PAULSEN, A.; LUNDIN, S. Metabolism of vasopressin, oxytocin and their analogues [Mpa1, D-Arg8]-vasopressin (dDAVP) and [Mpa1, D-Tyr(Et)2, Thr4, Orn8]-oxytocin (antocin) in human kidney and liver homogenates. *Regulatory Peptides*, v. 67, p. 27-32, 1996.

FLINT, D. J.; KNIGHT, C. H. Interactions of prolactina and growth hormone in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. *Jornal Mammary Gland biol. Neoplasia*, v. 2, p. 41-48, 1997.

FRANDSON, R. D., WILKE, W. L., FAILS, A. D. *Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003, p. 182-189.

FUCHS, A. R.; BEHRENS, H.; HELMER, H.; *et al.* Oxytocin and Vasopressin receptors in bovine endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology*, v. 127, p. 629-636, 1990.

FUCHS, A. R.; HELMER, H.; CHANG, S. M.; FIELDS, M. J. Concentration of oxytocin receptors in the placenta and fetal membranes of cows during pregnancy and labour. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 96, p. 775-783, 1992.

FUCHS, A. R.; IVELL, R.; FIELDS, P. A.; *et al.* Oxytocin receptors in bovine cervix: Distribution and gene expression during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 700-708, 1996.

GALINARI, G. C. F. *Leucose enzoótica bovina: isolamento de amostras brasileiras do vírus e obtenção de antígeno* 2014. 39p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GAY, J.; Epidemiology Concepts for Disease in Animal Groups. Initial draft 8/98 Initial HTML draft 5/99 Last updated May 01, 2009. Disponível em <http://www.vetmed.wsu.edu/courses-jmgay/EpiMod2.htm>, acessado em 01.10.2010.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. *Physiological reviews*, v. 81, p. 629-683, 2001

GIOSO, M. M.; COSTA, E. P.; FERNANDES, C. A. C. *et al.* Angioarquitetura venosa do órgão genital da fêmea bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, p. 715-719, 2005.

GOREWIT, R. C. Method for determining oxytocin concentration in unextracted sera; Characterization in lactating cattle. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, v. 160, p. 80-87, 1979.

GOREWIT, R. C.; SAGI, R. Effect of exogenous oxytocin on production and milking variables of cows. *Journal of Dairy Science*, v. 67, p. 2050-2054, 1984.

GOREWIT, R. C.; GASSMAN, K. B. Effects of duration of udder stimulation on milking dynamics and oxytocin release. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 1813-1818, 1985.

GRIZELJ, J.; KATANA, B.; DOBRANIC', T.; *et al.* The efficacy of milk ejection induced by luteal oxytocin as a method of early pregnancy diagnostics in cows. *Acta Veterinária*, v. 60, p. 551-561, 2010.

GUILLEMIN, R.; VARGO, T.; ROSSIER, J.; *et al.* beta-Endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. *Science* v. 197, p. 1367–1369, 1977.

HADLEY, M. E. *Endocrinology*. 4^a ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1996, p. 102-105, 127-140.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7^a ed. São Paulo: Editora Manole Ltda., 2004, p. 26-28; 37-39.

JOHANSSON, B., UVNÄS-MOBERG, K., KNIGHT, C., SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Effect of feeding before, during and after milking on milk production and the hormones oxytocin, prolactin, gastrin and somatostatin. *Journal of Dairy Science*, v. 66, p. 151-163, 1999.

JUNQUEIRA, F. S.; MADALENA, F. E.; REIS, G. L. Ordenha de F1, Manual e Mecânica, com ou sem bezerro. ENCONTRO DE PRODUTORES DE GADO LEITEIRO F1, 5^o, 2004, Belo Horizonte, *Anais FEPMVZ Editora*, p. 45-73, 2004.

KHUDAYER, A. R. N. Hydrogen ion concentration (PH) of vagina and vaginal secretion and its relations with different reproductive states in cows. *Brazilian Journal of Veterinary Research*, v. 6, p. 11-17, 2007.

KNIGHT, C. H.; PEAKER, M.; WILDE, C. J. Local control of mammary development and function. *Reproduction*, v. 3, p. 104-112, 1998.

KOWALSKI, W. B., DIVEKY, L., MEHENDALE, R. *et al.* Effect of pregnancy on the metabolic clearance rate and the volume of distribution of oxytocin in the baboon. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. v. 274, p. 791-795, 1998.

LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *Veterinary Record*, v. 139, p. 465-471, 1996.

LOLLIVIER, V.; MARNET, P. G. Galactopoietic effect of milking in lactating Holstein cows: Role of physiological doses of oxytocin. *Livestock Production Science*, v. 95, p. 131-142, 2005.

MACUHOVA, J.; TANCIN, V.; BRUCKMAIER, R. M. Effects of oxytocin administration on oxytocin release and milk ejection. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 1236–1244, 2004.

MADALENA, F. E.; ABREU, C. P.; SAMPAIO, I. B. M.; *et al.* Práticas de cruzamentos em fazendas leiteiras afiliadas à cooperativa central de produtores rurais de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 26, p. 924-934, 1997.

MADILL, S.; TROEDSSON, M. H.; ALEXANDER, S. L.; *et al.* Simultaneous recording of pituitary oxytocin secretion and myometrial activity in oestrous mares exposed to various breeding stimuli. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 56, p. 351-361, 2000.

MARNET, P. G. Subpicogram determination of oxytocin by an enzyme immunoassay using acetylcholinesterase as label. *Journal of Immunoassay*, v. 15, p. 35-53, 1994.

MARNET, P. G.; NEGRÃO, J. A.; LABUSSIÈRE, J. Oxytocin release and milk ejection parameters during milking of dairy ewes in and out of natural season of lactation. *Small Ruminant Research*, v. 28, p. 183-191, 1998.

MARNET, P. G.; McKUSICK, B. C. Regulation of milk ejection and milkability in small ruminants. *Livestock Production Science*, v. 70, p. 125-133, 2001.

MARTINS, V. M. V.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; VASCONCELOS, A. C.; *et al.* Placental maturation and expulsion in Holstein and Nelore cows. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, p. 157-167, 2004.

MAYER, H.; LEFCOURT, A. M. Failure of cortisol injected prior to milking to inhibit milk ejection in dairy cattle. *Journal of Dairy Research*, v. 54, p. 173–177, 1987.

MICHOPOULOS, V.; CHECCHI, M.; SHARPE, D. WILSON, M.E. Estradiol effects on behavior and serum oxytocin are modified by social status and polymorphisms in the serotonin transporter gene in female rhesus monkeys. *Hormones and Behavior*, v. 59, p. 528-535, 2011.

MITCHELL, B. F.; FANG, X.; WONG, S. Metabolism of oxytocin in rat uterus and placenta in late gestation. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 807-812, 1997.

MOLINA, P. E. *Fisiologia endócrina*. São Paulo: Editora AMGH, 2014, p. 34-38.

MOLLO, A.; VERONESI, M. C.; CAIROLI, F.; SOLDANO, F. The use of oxytocin for the reduction of cow placental retention, and subsequent endometritis. *Animal Reproduction Science*, v. 48, p. 47-51, 1997.

MORIT, M.; VIGH, S.; MIYATA, A.; *et al.* Oxytocin is the major prolactin releasing factor in the posterior pituitary. *Endocrinology*, v. 126, p. 1009-1013, 1990.

MUKASA-MUGERWA, E.; TEGEGNE, A.; FRANCESCHINI, R. Influence of suckling and continuous cow-calf association on the resumption of post-partum ovarian function in *Bos indicus* cows monitored by plasma progesterone profiles. *Reproduction Nutrition Development*, v. 71, p. 241-247, 1991.

NEGRÃO, J. A.; MARNET, P. G. Effect of calf suckling on oxytocin, prolactin, growth hormone and milk yield in crossbred Gir x Holstein cows during milking. *Reproduction Nutrition Development*, v. 42, p. 373-380, 2002.

NEVILLE, M. C.; McFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 7, p. 49-66, 2002.

NORMAN, A. W.; JITNACK, G. *Posterior pituitary hormones*. 2ª ed. San Diego: Academic Press., 1997. 558p.

NOSTRAND, S. D.; GALTON, D. M.; ERB, H. N.; BAUMAN, D.E. Effects of daily exogenous oxytocin on lactation Milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 2119-2127, 1991.

OCITOCINA FORTE UCB: ocitocina. RT Thaís Marino Silva Girio – CRMV-SP 17 469. Jaboticabal: UCBVET Saúde Animal, 1978. Bula de remédio. Disponível em: <http://www.ucbveter.com/produto/12/26/ocitocina-forte-ucb>, acessado em 12.10.2015.

OCITOCINA VITALFARMA: ocitocina. RT Tatiane de Souza Urias - CRMV: CRF MG 12.676. São Sebastião do Paraíso: Vitalfarma, 1996. Bula de remédio. Disponível em: <http://bulavet.ideiasuteis.com.br/m/1654>, acessado em 12.10.2015.

OCITOVET: ocitocina. RT Cassio R. Murin – CRMV-SP 6.473. Jacareí: Vetecia Laboratórios de Produtos Veterinários, 2004. Bula de remédio. Disponível em: <http://www.ceva.com.br/Produtos/Lista-de-Produtos/OCITOVET>, acessado em 12.10.2015.

OLIVEIRA, L. H. *Manejo de ordenha sobre o desempenho produtivo e reprodutivo de vacas F1 Holandês-Gir*. 2010. 66p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PALOMARES, R. A.; GUTIÉRREZ, J. C.; PORTILLO, G. *et al.* Oxytocin treatment immediately after calving does not reduce the incidence of retained fetal membranes or improve reproductive performance in crossbred zebu cows. *Theriogenology*, v. 74, p. 1414-1419, 2010.

PATEL, A.; PATEL, J. Vagina as an application site for drug delivery. *Indian Journal of Novel Drug Delivery*, v. 4, p. 17-23, 2012.

PETERSSON, M.; ALSTER, P.; LUNDEBERG, T.; UVNÄS-MOBERG, K. Oxytocin causes a long-term decrease of blood pressure in female and male rats. *Physiology & Behavior*, v. 60, p. 1311-1315, 1996.

PLACENTEX: ocitocina. RT Vânia N. A. de Carvalho – CRF-SP 32.871. São Paulo: Agener União Saúde Animal, 1983. Bula de remédio. Disponível em: <http://bulavet.ideiasuteis.com.br/m/3492>, acessado em 12.10.2015.

PORCIONATO, M. A. F.; NEGRÃO, J. A.; LIMA, M. L. P. Produção de leite, leite residual e concentração hormonal de vacas Gir x Holandesa e Holandesa em ordenha mecânica exclusiva. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, p. 820-824, 2005.

PORCIONATO, M. A. F.; NEGRÃO, J. A.; PAIVA, F. A. Morfometria e distribuição de leite alveolar e cisternal na glândula mamária de vacas Holandesa e Girolanda. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p. 287-292, 2009.

RAND-LUBY, L., POMMIER, R. F., WILLIAMS, S. T. *et al* Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. *Annals of Surgery*, v. 224, p. 583-590, 1996.

RASMUSSEN, M. D.; FRIMER, E. S. The influence of premilking teat preparation and attachment delay on milk yield and milking performance. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 2131-2141, 1992.

RIBEIRO, E. L. A.; MIZUBUTI, I. Y.; ROCHA, M. A. *et. al.* Uso da ocitocina na estimativa da produção e composição de leite de ovelhas Hampshire Down. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, p. 1833-1838, 2004.

ROBINSON, K. J. *The role of oxytocin in the maternal behaviour of the grey seal*. 2014. 54p. Tese (PHD em Filosofia) – Escola de Biologia da Universidade de ST Andrews Escócia, Reino Unido.

RUEGG, P. Uso de um novo teste rápido para contagem de células somáticas. In: ANAIS DO X CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS. UberlândiaMG: mar. 2006, Anais p.222-229.

- SAKUMOTO, R.; ANDO, Y.; OKUDA, K. Progesterone release of bovine corpus luteum in response to oxytocin in different culture systems. *Journal of Reproduction and Development*, v. 42, p. 199-204, 1996.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 3^a ed. 2007, p. 264.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Editora Manole Ltda., 2007. p. 314.
- SAWYER, W. H.; MANNING, M. Synthetic analogs of oxytocin and the vasopressin. *Annual Review of Pharmacology*, v. 13, p. 5-17, 1973.
- SCHAMS, D.; MAYER, H.; PROKOPP, A.; WORSTORFF, H. Oxytocin secretion during milking in dairy cows with regard to the variation and importance of a threshold level for milk removal. *Journal of Endocrinology*, v. 102, p. 337-343, 1984.
- SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B. et al. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *Journal of Animal Science*, v. 68, p. 799-816, 1990.
- SPENCER, T. E.; BECKER, W. C.; GEORGE, P. et al. Ovine interferon- τ regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. *Biology of Reproduction*, v. 53, p. 732-745, 1995.
- SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology*, v. 137, p. 1144-1147, 1996.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011, p. 340-342.

STANDRING, S. *Gray's Anatomia*. 40^a ed. London: Elsevier Health Sciences Brazil, 2010, p. 1089, 1281.

STELWAGEN, K.; Effect of milking frequency on mammary functioning and shape of the lactation curve. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. E204-E211, 2001.

STOCK, S.; UVNÄS-MOBERG, K. Increased plasma levels of oxytocin in response to afferent electrical stimulation of the sciatic and vagal nerves and in response to touch and pinch in anaesthetised rats. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 132, p. 29-34, 1988.

SYNTOCINON®: ocitocina. RT Flavia Regina Pegorer – CRF-SP 18.150. São Paulo: Novartis, 2015. Bula de remédio. Disponível em: <https://portal.novartis.com.br/UPLOAD/ImgConteudos/2762.pdf>, acessado em 15.09.2015.

SZETO, A.; McCABE, P.M.; NATION, D.A. *et al.* Evaluation of enzyme immunoassay and radioimmunoassay methods for the measurement of plasma oxytocin. *Psychosomatic medicine*, v. 73, p. 393-400, 2011.

TANCIN, V.; MACUHOVA, L.; SCHAMS, D.; BRUCKMAIER, R.M. The importance of increased levels of oxytocin induced by naloxone to milk removal in dairy cows. *Veterinarni Medicina*, v. 51, p. 340-345, 2006.

THEODORIDOU, A.; ROWE, A. C.; PENTON-VOAK, I. S.; ROGERS, P. J. Oxytocin and social perception: Oxytocin increases perceived facial trustworthiness and attractiveness. *Hormones and behavior*, v. 56, p. 128-132, 2009.

THOMAS, C. S.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; BROSREKAR, M. R.; BRUCKMAIER, R. M. Mammary cisternal size, cisternal milk and milk ejection in Murrah buffaloes. *Journal of Dairy Science*, v. 71, p. 162-168, 2004.

TOPS, M.; BULSMAN-PIJLMAN, F. T.; BOKSEM, M. A.; *et al.* Cortisol-induced increases of plasma oxytocin levels predict decreased immediate free recall of unpleasant words. *Frontiers in Psychiatry*. v. 16, p. 43, 2012.

TURKER, S., ONUR, E., OZER, Y. Nasal route and drug delivery systems. *Pharmacy world and Science*, v. 26, p. 137-142, 2004.

UVNÄS-MOBERG, K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology*, v. 23, p. 819-835, 1998.

UVNÄS-MOBERG, K.; JOHANSSON, B.; LUPOLI, B.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Oxytocin facilitates behavioural, metabolic and physiological adaptations during lactation. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 72, p. 225-234, 2001.

UVNÄS-MOBERG, K. *Oxitocina, la hormona de la calma, el amor y la sanación*. Barcelona: Ediciones Obelisco, 2009, p. 19- 21.

VERBALIS, J. G.; MCCANN, M. J.; MCHALE, C. M.; STRICKER, E. M. Oxytocin secretion in response to cholecystokinin and food: differentiation of nausea from satiety. *Science*, v. 232, p. 1417-1419, 1986.

VIKER, S. D.; LARSON, R. L.; KIRACOFÉ, G. H. *et al.* Prolonged postpartum anovulation in mastectomized cows requires tactile stimulation by the calf. *Journal Animal Science*, v. 71, p. 999-1003, 1993.

WATSON, E. D.; NIKOLAKOPOULOS, E.; GILBERT, C.; GOODE, J. Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. *Theriogenology*, v. 51, p. 855-865, 1999.

WINDLE, R. J.; SCHANKS, N.; LIGHTMAN, S. L.; INGRAM, C. D. Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology*, v. 138, p. 2829-2834, 1997.

WRIGHT, D. M. Evidence for a spinal site at which opioids may act to inhibit the milk-ejection reflex. *Journal of Endocrinology*, v. 106, p. 401-407, 1985.