

EXPERIMENTAÇÃO EM REPRODUÇÃO CAPRINA

PROJECTO A APRESENTAR

JOÃO SIMÕES

TÍTULO

Estudos de protocolos naturais ou associados de indução da ciclicidade e sincronização éstrica nas cabras e de protocolos de estimulação da actividade sexual em bodes da raça Serrana durante o período de anestro sazonal.

INTRODUÇÃO

Actualmente, existe a necessidade da redução, ou mesmo a abolição, da utilização de produtos hormonais, nomeadamente a progesterona, para a sincronização de estros em efectivos caprinos nos programas de inseminação artificial, no espaço da União Europeia confrontada com um excedente, no seu todo, de produtos de origem animal.

Nos países situados mais a Sul da Europa, como é o caso de Portugal, os caprinos exibem um anestro estacional (Mascarenhas *et al.*, 1995) à semelhança do que ocorre em países situados a latitudes mais elevadas. No entanto, no nosso país e na cabra da raça Serrana, a intensidade de anestro, que pode ser definida como a proporção de fêmeas que no período de anestro ovulam espontaneamente (Lindsay and Signoret cit. por Lassoued *et al.*, 1995), é baixa. Este carácter da sazonalidade permite a indução da ciclicidade e a sincronização dos estros unicamente através do efeito macho ou associado a implantes de P4 como demonstram os trabalhos efectuados por Delgadillo *et al.* (2002) no México e por Lassoued *et al.* (1995), na Tunísia. Outra vantagem desta fraca intensidade de anestro é a menor probabilidade da ocorrência de ciclos éstricos de curta duração (Lassoued *et al.*, 1995).

A probabilidade de existirem, em época de anestro, cabras cíclicas nos nossos rebanhos é elevada e que para que o efeito macho surja, as cabras devem apresentar obrigatoriamente anestro (ver os trabalhos de Delgadillo *et al.*, 2002). Estes factos significam, em nosso entender, poderem existir, fundamentalmente, dois protocolos (sem recurso a hormonas ou diminuindo o seu uso) de sincronização exequíveis em explorações:

- a) Utilização do efeito macho, em que, unicamente cabras em anestro prévio seriam beneficiadas. Seria necessário encontrar uma solução para as fêmeas cíclicas.
- b) Associação do efeito macho a um tratamento de curta duração de P4, modificando os protocolos actualmente em estudo, em ovinos, por Viñoles and Rubianes (1998) com o

objectivo de aumentar a sincronização dos estros e diminuir a ocorrência de ciclos éstricos de curta duração (Lassoued *et al.*, 1995). A aplicação do protocolo hormonal de curta duração têm ainda a vantagem de sincronizar fêmeas que embora se encontrem cíclicas, não é conhecida a sua situação.

Em trabalhos anteriores (Simões *et al.*, 2004) observámos na cabra da raça Serrana a ocorrência de uma nova ovulação a partir de ondas ovulatórias que apresentavam um início mais tardio que a última onda não ovulatória de um qualquer ciclo éstrico. Estes resultados sugeriram a existência de mecanismos reguladores com eventual destaque para a progesterona uma vez que a sua diminuição plasmática ocorreu por altura do início das ondas foliculares ovulatórias. Colocamos a hipótese de que se no momento da introdução da esponja impregnada com P4, se administrar 50 µg de cloprostenol (eventuais animais cíclicos), ao retirar a esponja após 5 dias, ocorre uma maior sincronização das ondas ovulatórias e consequentemente das ovulações.

Embora, nesses nossos estudos tenhamos caracterizado, na cabra da raça Serrana, a evolução ovárica durante ciclos éstricos induzidos ou de ocorrência natural, em época reprodutiva, torna-se necessário comparar esses resultados com as ocorrências similares em época de anestro em animais submetidos a protocolos de sincronização éstrica e ovárica com o objectivo de determinar o momento das ovulações e consequentemente o momento mais correcto da inseminação artificial em tempo fixo.

Além da determinação do momento das ovulações a partir da indução éstrica com o efeito macho ou associando este efeito a outros protocolos hormonais, não é do nosso conhecimento qualquer trabalho efectuado em caprinos ou mesmo em ovinos, que determine a origem e evolução das ondas foliculares e folículos ovulatórios durante estes efeitos ou durante a existência de ciclos éstricos de curta duração. Aliás, o aparecimento destes últimos tipos de ciclos são um entrave evolutivo da reprodução assistida em caprinos, principalmente em períodos de transição reprodutiva ou quando é aplicado o efeito macho (Lassoued *et al.*, 1995 e 1997 e Delgadillo *et al.*, 2002).

Por outro lado, é também necessário determinar à semelhança dos trabalhos de Flores *et al.* (2000) e de Delgadillo *et al.* (2002), se na nossa latitude, um tratamento simples de fotoperiodismo nos machos é suficiente para que estes apresentem uma actividade sexual (principalmente a libido) compatível com a função que deles se procura. De referir que o protocolo de fotoperiodismo de dias com 16 horas de luminosidade seguidos de dias com luminosidade natural (dias de curta duração) antes do solstício de verão é funcional. No entanto, como nos primeiros meses do ano os dias são crescentes, é necessário avaliar, nas

nossas latitudes se este protocolo é suficiente, isto é, se não existe interferência do incremento da duração desses dias. Alternativamente, podem utilizar-se, também, implantes de melatonina nos machos, uma vez que estimulam a sua actividade sexual (Delgadillo *et al.*, 2002).

São objectivos principais deste ensaio:

- Determinação do pico de LH e do momento da ovulação após implementação do efeito macho e/ou do tratamento hormonal de curta duração a fêmeas que apresentem estros e subestros.
- Observação da evolução folicular e dos mecanismos reguladores que ocorrem por efeito de cada um dos protocolos, isto é, a evolução e controlo das ondas ovulatórias.
- Determinação da taxa de ovulação e da taxa de concepção no primeiro estro.
- Determinação da evolução ovárica (folicular e lútea) e dos padrões hormonais que antecedem os ciclos éstricos de curta duração.
- Determinação do protocolo de estimulação de actividade sexual dos machos em época de anestro.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Terminologia

- Protocolo A – efeito macho.
- Protocolo B – colocação de uma esponja intra-vaginal impregnada de 45 mg de FCA, colocada 5 dias antes da introdução dos machos (dia 0). No dia da introdução da esponja, é aplicada 50 ug de cloprostenol por via IM e as esponjas são retiradas no momento da introdução dos bodes.
- Isolamento das fêmeas – é definido como a ausência de qualquer contacto visual, auditivo e olfactivo com qualquer macho púbere, incluindo pêlo dos animais.
- Tratamento DL – tratamento de fotoperiodismo de “dias longos”, constituído por um total de 16 horas de luminosidade por dia: entre as 6 e as 8 da manhã é aplicada uma intensidade luminosa de 300 watts ao nível dos olhos dos animais. Entre as 8 e as 18.00 horas é mantida a luminosidade diurna normal e entre as 18,00 e 22.00 horas é novamente aplicada a luminosidade artificial.

- Fêmeas em estro: fêmeas que se imobilizam perante a presença do macho. A aceitação da introdução do pénis é por nós considerado o início do estro.
- Ciclo éstrico – intervalo entre 2 períodos de ovulações.

2. Animais

2.1. Fêmeas

São utilizados 4 grupos de cabras com origem num grupo maior, de 60 fêmeas nulíparas e múltiparas, as quais são isoladas dos bodes a partir do dia 1 de Janeiro:

Grupo F1 – cabras em anestro submetidas ao protocolo A.

Grupo F2 – cabras em anestro submetidas ao protocolo B.

Grupo F3 – cabras cíclicas submetidas ao protocolo B.

Grupo FC – Grupo controlo constituído por 7 cabras e de origem aleatória no grupo maior. As fêmeas deste último grupo permanecem isoladas dos machos durante todo o ensaio.

Todas as fêmeas múltiparas deverão ter registado o último parto nos 12 a 6 meses, à data de introdução dos bodes, no rebanho.

2.2. Machos

Todos os bodes (inteiros, não vasectomizados) deverão ter uma idade superior a 12 meses, terem anteriormente mostrado libido e submetidos previamente a avaliação dos ejaculados. São constituídos 3 grupos:

Grupo MF – grupo constituído por 6 machos, submetido unicamente ao tratamento de fotoperiodismo.

Grupo MFM – Grupo constituído por 5 machos, submetido ao tratamento de fotoperiodismo e de melatonina.

Grupo MC – grupo controlo constituído por 5 machos, os quais são sujeitos a fotoperiodismo normal (condições ambientais normais).

3. Conduta dos animais, detecção de estros, colheita de amostras e exames ecográficos

O cronograma das principais intervenções encontra-se descrito na tabela 1.

Tabela 2. Sumário do delineamento do ensaio (cronograma).

Data	Acções a efectuar
1 de Outubro	Início do ensaio. Mensuração do peso corporal e peso / volume testicular cada duas semanas aos machos. Colheita semanal de sangue para análise de testosterona.
1 de Novembro	Constituição dos lotes dos Machos. Início do tratamento dos “dias longos” nos Grupos MF e MFM.
15 de Janeiro	Final do tratamento dos “dias longos” e início do tratamento dos “dias curtos” nos grupos MF e MFM. Implantes de melatonina ao grupo MFM Isolamento de todos os grupos de fêmeas relativamente aos machos.
20 de Fevereiro	Colheita bissemanal para a avaliação da ciclicidade das fêmeas.
8 de Março	Início de ecografias diárias (entre as 10 e 13 horas) a todas as fêmeas excepto grupo FC. Mudança de instalações do grupo FC. Início da colheita sanguínea diária (entre as 8 e 10 horas) e acondicionamento para análise de FSH, LH, inibina e estradiol, e progesterona aos grupos F1, F2 e F3.
10 de Março	Constituição do grupo F3 com cabras consideradas cíclicas por interpretação dos resultados da P4. Distribuição aleatória e das nulíparas e múltiparas pelos grupos F2 (8 animais) e F1 (restantes animais). Aplicação das esponjas e da prostaglandina (protocolo B) aos grupos F2 e F3
15 de Março	Final da avaliação testicular e do teor de testosterona. Retirada das esponjas e introdução dos Machos (8h). Registos do comportamento dos diferentes grupos de machos durante 3 dias consecutivos (4h/dia). Colheita de sangue para análise de LH cada 4h a partir das 8h e durante 72 horas. Colheita de sangue de LH cada 4h a partir do início do estro e exames ecográficos cada 8 horas após as 20 horas do início do estro e durante 24 h.
16 de Março	Exames ecográficos (cada 8 h) a partir das 8h a todos os animais que não tenham apresentado estro comportamental.
25 de Março	Fim de todas as colheitas sanguíneas e de exames ecográficos diários.
30 de Março	Contagem do número de corpos lúteos por ecografia.
10 de Maio	Final da colheita bissemanal de sangue para análise de P4.
Mai-Junho	Diagnóstico de gestação e contagem dos fetos por ecografia aos 40 dias após o último estro detectado.
Setembro	Confirmação do número de fetos ao parto. Final do ensaio.

3.1. Maneio dos machos e colheita de amostras

Os grupos de bodes MF e MFM são submetidos a um tratamento de “dias longos” durante 75 dias, com início em 1 de Novembro. Após 15 de Janeiro, procede-se ao isolamento das fêmeas e os 3 grupos de machos são mantidos em condições ambientais normais da época até à sua introdução no rebanho a 15 de Março. Neste dia, são colocados, a cada animal do grupo MFM, dois implantes de melatonina de 18 mg cada (Delgadillo *et al.*, 2002).

30 dias antes do início do tratamento de fotoperiodismo e até ao dia da sua introdução no rebanho, os machos de todos os grupos são pesados e o volume e peso testicular avaliados com um orchidómetro, cada 2 semanas. É efectuada uma colheita sanguínea em cada animal durante o mesmo período de tempo, com periodicidade de 1 semana, para a análise de testosterona.

No dia da introdução (sequenciada) dos bodes no rebanho (dia = 0) e durante 3 dias, o comportamento sexual é avaliado em cada animal duas vezes ao dia por períodos de 15 minutos e conforme a tabela 2.

Os bodes são equipados com arnês marcador e será permitida a cópula.

Tabela 1. Avaliação do comportamento dos machos.

Comportamento	Número de vezes (cada 30 min.)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Farejar da região ano-genital			
“Nudging” (Cortejar com o cotovelo)			
Monta			
Comportamento de <i>Flechman</i>			

3.2. Maneio das fêmeas, exames ecográficos e colheita de amostras

Todas as fêmeas são estritamente isoladas de qualquer bode a partir do dia 15 de Janeiro e durante 60 dias. A partir de 20 de Fevereiro (cerca de 3 semanas antes da introdução dos bodes) é efectuada em cada animal uma colheita bissemanal de sangue para a avaliação da ciclicidade a 10 de Março. A colheita bissemanal terminará dia 25 de Março. Esta duração tem com o objectivo a determinação da duração aproximada de um ciclo éstrico normal a partir da introdução dos machos no rebanho.

A 8 de de Março (D-7) será constituído e isolado o grupo FC: 7 cabras nulíparas e múltíparas escolhidas aleatoriamente. A partir deste dia e durante 18 dias (até D14) serão efectuadas colheitas diárias de sangue para análise de P4, E2, LH, FSH e inibina A com o objectivo de avaliar os padrões de cada uma destas hormonas, às restantes fêmeas. A partir deste dia e durante 18 dias, terá início a monitorização diária das estruturas ováricas, por via transrectal, através da técnica ecográfica por nós descrita. No grupo FC, será efectuada somente a determinação bissemanal de P4.

No dia 10 de Março (D-5) serão constituídos os grupos de fêmeas pela seguinte ordem: grupo F3 – todas as fêmeas que sejam consideradas cíclicas pela análise da concentração plasmática de P4; Grupo F2 e F1, restantes fêmeas nulíparas e múltíparas, escolhidas aleatoriamente para integração em ambos os grupos. O grupo F2 é constituído por 1/3 a 1/2 do número de animais de F1. Ao grupo F2 e F3 será aplicado o protocolo B.

No dia 0, às 8 horas as esponjas são retiradas aos grupos F2 e F3 e são introduzidos os machos. É iniciada (grupos F1, F2 e F3) a colheita de sangue, em cada fêmea, cada 4 hora para determinação de LH, até às 72 horas ou até 24 horas após o início do estro em cada animal.

De igual forma, é efectuado um exame ecográfico, cada 8 horas, a partir do dia 1 (8 horas) e durante 72 horas a todos os animais que não tenham apresentado estro ou até 24 horas após o início deste.

Os diagnósticos de gestação assim como a contagem dos fetos (Simões e Potes, 2001) serão efectuados por volta do dia 40 de gestação. A confirmação do número de fetos será efectuada na altura do parto dos animais.

4. Análise hormonais

O sangue colhido em tubos heparinizados é centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos e acondicionados a -60 °C.

- **Progesterona** – análise a ser efectuada por método de RIA –directo, utilizando um meio de fase sólida com I¹²⁵ (Coat-a-Count[®], DPC, Los Angeles, CA) segundo o método referido por Kubasik *et al.* (1984).
- **LH** – a ser efectuada por método de RIA, com antissoro de coelho anti-LH ovina (anti-oLH-L₃), descrito por Pelletier *et al.* (1968), validado para os caprinos por Chemineau *et al.* (1982) e revalidado, nos laboratórios do INRA em 1996.
- **FSH** – a ser efectuada por método de RIA, semelhante ao descrito para a LH.

- **17β-Estradiol** – determinada por método RIA, usando usando rádio-ligandos (I^{125}) conforme descrito por Taya *et al.* (1985).
- **Inibina A** – a ser efectuada por método ELISA descrito para uso humano (Groome *et al.*, 1996), modificado para ovinos (Knight *et al.*, 1998) e aplicado aos caprinos conforme o referido nos trabalhos Realizados por Medan *et al.* (2003).
- **Testosterona** – a der determinada por método de RIA conforme descrito por Garnier *et al.* (1978).

5. Exames ecograficos

Os exames ecograficos decorreram em tronco de contenção adequado, com os animais em posição de estação. Esta técnica, assim como a avaliação das estruturas ováricas, serão realizadas segundo a técnica por nós descrita (Simões *et al.*, 2004).

6. Análises estatísticas

Serão aplicadas as análises estatísticas adequadas aos dados obtidos, com recurso a programas informáticos específicos (SAS, 1999).

REFERÊNCIAS

1. Chemineau, P., Gauthier, D., Poirier, J.C. and Saumande J., 1982. Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17 beta and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology*, **17**, 313-323.
2. Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P. and Malpoux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J. Anim. Sci.*, **80**, 2780-2786.
3. Flores, J.A., Véliz, F.G., Perez-Villanueva, J.A., Martinez De La Escalera, G., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B. and Delgadillo, J.A., 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol. Reprod.*, **62**, 1409-1414.

4. Garnier, D.H., Cotta, Y and terqui, M., 1978. androgen radioimmunoassay in the ram: results of direct plasma testosterone and dehydroepiandrosterone measurement and physiological evaluation. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, **18**, 265-281.
5. Kubasik, N.P., Hallauer, G.D. and Brodows, R.G., 1984. Evaluation of a direct solid-phase radioimmunoassay for progesterone, useful for monitoring luteal function. *Clinical Chemistry*, **30**, 284-286.
6. Lassoued, N., Khaldi, G., Cognie, Y., Chemineau, P. and Thimonier, J., 1995. Effect of progesterone on ovulation length and duration of the ovarian cycle induced by the male effect in the Barbarine ewe and the local Tunisian goat. *Reprod. Nutr. Dev.*, **35**, 415-426.
7. Lassouet N., Khaldi, G., Chemineau, P., Cognie, Y. and Thimonier, J., 1997. Role of the uterus in early regression of corpora lutea induced by the ram effect in seasonally anoestrous Barbarine ewes. *Reprod. Nutr. Dev.*, **37**, 559-571.
8. Mascarenhas, R., Simões Nunes, A. and Robalo Silva, J., 1995. Cyclic reproductive activity and efficiency of reproduction in Serrana goats. *Anim. Reprod. Sci.*, **38**, 223-229.
9. Medan, M.S., Watanabe, G., Sasaki, K., Sharawy, S., Groome, N.P. and Taya, K., 2003. Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. *Biol. Reprod.*, **69**, 57-63.
10. Pelletier, J., Kann, G., Dolais, J. et Rosselin, G., 1968. Dosage radio-immunologique de l'hormone luteinizante plasmatique chez le mouton. Mise au point de la technique de dosage. *C. R. Sci. Paris*, t. 266, Série d, 2291-2294.
11. SAS, STATVIEW Reference, 1999. SAS Institute, Cary, NC.
12. Simões et al., 2004. Dados não publicados.
13. Simões, J. e Potes, J., 2001. Aplicação da ecografia no diagnóstico de gestação no 25º dia por via transrectal e no 35º dia por via transabdominal em caprinos de raça Serrana. *III Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, Porto, 6, 7 e 8 de Julho, pp. 545-547.
14. Taya, K., Watanabe, G. and Sasamoto, S., 1985. Radioimmunoassay for progesterone, testosterone and oestradiol-17 β using ¹²⁵I-iodohistamine radioligands. *Jpn. J. Anim. Reprod*, **31**, 186-197.
15. Viñoles, C. and Rubianes, E., 1998. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can. J. Anim. Sci.*, **78**, 429-431.