UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LAURINDA AUGUSTO

**Desenvolvimento reprodutivo de cabritas Saanen
submetidas ao efeito macho no período peri-púbere**

Pirassununga
2015

LAURINDA AUGUSTO

**Desenvolvimento reprodutivo de cabritas Saanen
submetidas ao efeito macho no período peri-púbere**

"Versão corrigida"

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

Área de Concentração:
Qualidade e Produtividade
Animal

Orientador:
Prof. Dr. João Alberto Negrão

Pirassununga
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

A923d Augusto, Laurinda
Desenvolvimento reprodutivo de cabritas Saanen
Submetidas ao efeito macho no período peri-púbere /
Laurinda Augusto. -- Pirassununga, 2015.
95 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão.

1. Puberdade 2. Efeito do macho 3. Cabritas
4. Saanen. I. Título.

Esta obra é dedicada:

Aos meus filhos:

Marsin (acompanhante nesta jornada) e Estelino

Pelo carinho e motivação ao longo do percurso;

Ao meu esposo:

Helio Alberto Coutinho de Sousa

*Pela compreensão e incentivo em mais esta etapa da minha carreira, que
apesar da distância esteve sempre presente, concedendo apoio moral
que muito contribuiu para a realização deste projeto.*

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq-Brasil, MCT-Moçambique e a UEM-Moçambique por terem tornado possível o programa de doutorado que deu origem a presente tese. À Seção de Cooperação Internacional da FZEA pelo apoio prestado na legalização da minha estada do Brasil.

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão pelo acolhimento, sábia orientação e apoio na execução do programa.

Aos colegas do laboratório Alice Deléo Rodrigues, Ana Paula Rodrigues Gaíato, e Gabriela Facholi Bomfim pela agradável convivência e ajuda durante a realização do experimento. Aos colegas Augustín Silva, Atanásio Serafim Vidane, Fábio Sergio Cury, Carmen Garrine e Lizabeth Paucar pela contribuição na coleta de amostras.

As técnicas do Laboratório de Fisiologia Animal - FZEA/USP Sandra Aparecida de Oliveira e Giovana Krempel Merighe pela contribuição nas análises laboratoriais, ao técnico do laboratório de histologia Nilton Pedro dos Santos pela ajuda na coleta e identificação histológica dos órgãos e ao técnico do biotério António Fernandes dos Santos pela ajuda no manejo dos animais.

À Carmen Garrine e as filhas pela calorosa recepção, amizade e companheirismo ao longo dos três anos de convivência em Pirassununga; à Renata Contí e a família pela amizade, apoio e agradável convivência durante a minha permanência em Pirassununga. À Alice Deléo Rodrigues, Lizabeth Paucar, Carolina Yumi, Orfa Paucar e Rosa Zimba pela convivência e amizade.

Enfim, a todos que de uma maneira ou de outra contribuíram na execução deste projeto.

E a Deus pela vida e saúde

Muito obrigada

RESUMO

Augusto, L. **Desenvolvimento reprodutivo de cabritas Saanen submetidas ao efeito macho no período peri-púbere**. 95 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O efeito macho, principal fator social associado a reprodução, é muito usado na estimulação da atividade cíclica durante o anestro em espécies sazonais. Há também referência da sua influência sobre a puberdade podendo acelerar idade em que esta ocorre, particularmente em suínos e ratos. O presente projeto tinha como objetivo estudar o efeito da exposição de cabritas Saanen peri-púbere ao efeito macho sobre o desenvolvimento reprodutivo em particular no padrão de comportamentos associados ao cio, perfil de estrógeno e progesterona e na expressão do gene kiss1, receptores de kisspeptinas, estrógeno e progesterona no hipotálamo, hipófise e ovário. No experimento 1, 29 cabritas Saanen entre $142,72 \pm 10,61$ dias idade e $24,9 \pm 4,26$ kg de peso, foram distribuídas aleatoriamente entre três tratamentos: 1) exposição ao macho sexualmente ativo (grupo macho); 2) exposição a fêmea androgenizada (grupo fêmea) e; 3) controle (grupo controle). Observação diária de comportamentos associados ao cio e coletas de sangue para determinação dos níveis de estradiol e progesterona foram realizadas de maio a outubro. Os grupos macho e fêmea registraram mais comportamentos associados ao cio que os animais do grupo controle. A interação social teve efeito sobre a posição da cauda, aspecto da vulva, vocalizar e deixar montar. Houve diferenças significativas entre os grupos nas médias de estradiol. O grupo macho registrou médias de estradiol superiores ao grupo controle. Houve interação grupo*coleta no perfil de progesterona. Os grupos macho e fêmea registraram médias significativamente mais altas comparado ao grupo controle durante o experimento. No experimento 2, 16 cabritas Saanen com $138,37 \pm 3,59$ dias de idade e $22,75 \pm 2,43$ kg de peso foram distribuídas aleatoriamente entre dois tratamentos: 1) exposição ao macho sexualmente ativo (grupo macho) e; 2) controle (grupo controle). Foram realizadas observações diárias de comportamentos associados ao cio, coletas de sangue duas vezes por semana para determinação dos níveis de estradiol e

progesterona e coleta de tecidos hipotalâmico, hipofisário e ovárico (antes e 60 dias depois da exposição ao macho) para determinar a expressão do gene kiss1, receptores de kisspeptinas, estradiol e progesterona. Não houve diferença entre grupos no comportamento deixar montar. O grupo macho registrou maior frequência de comportamento montar, contudo o grupo fêmea registrou maior frequência na alteração do aspecto da vulva, deslocar e interagir. Foram encontradas diferenças significativas entre grupos para perfil de progesterona, a expressão de kiss1, kiss1R, ER α , ER β e PR no hipotálamo, expressão de ER α na hipófise e ER α , ER β e PR no ovário. Em conjunto, os resultados encontrados indicam que o nível de expressão de mRNA das moléculas estudadas varia entre animais sexualmente imaturos e maduros e é influenciado pela fase de desenvolvimento folicular em animais pós-pubere.

Palavras-chave: puberdade, efeito macho, cabritas, Saanen

ABSTRACT

Augusto, L. **Reproductive development in Saanen goat kids subject to the male effect during the peri-pubertal period** 95 f. PhD Thesis - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Male effect, major social factor associated to reproduction, is mainly used to stimulate cyclic activity during anestrus period in seasonal breeder species. There are references to the influence of male effect on puberty where it can advance the age at which puberty occurs. The present project aimed to study the effect of exposure of peri-pubertal Saanen goat kids to the male effect on Sexual maturation, in particular, estrus associated behaviors, estrogen and progesterone profiles and expression of kiss1 gene, kisspeptin receptor, estradiol receptor and progesterone receptor in the hypothalamus, pituitary and ovary. In the first experiment, 29 Saanen kids with $142,72 \pm 10,61$ days of age and $24,9 \pm 4,26$ kg weight were randomly assigned to three treatments namely: 1) exposure to active male (male group), 2) exposure to androgenized female (female group) and 3) control (control group). Daily observation to record estrus associated behaviors and weekly blood collections for estradiol and progesterone levels determination were made from May to October. Animals subjected to the male effect (active male or female) registered more estrus associated behavior than the control group. Social interaction had effect on tail position, vulva aspect, vocalization and mounts acceptance. There were significant differences among groups on estradiol levels. The male group registered higher estradiol concentrations than the control group. There was interaction group*collection on progesterone concentrations. Animals from the female group had significantly higher progesterone means in most collections than the other groups. The male group had statistically higher progesterone averages than the control group. In the second experiment, 16 Saanen kids at age of $138,37 \pm 3,59$ days and $22,75 \pm 2,43$ kg weight were randomly assigned to exposure to 1) active male (male group) and 2) control (control group). Animals were twice daily observed for 1 h: 30 minutes for registration of estrus associated behavior and twice weekly blood samples were collected for estradiol and progesterone assessment.

Hypothalamic, pituitary and ovarian tissue samples were obtained before and sixty days after exposure to male effect for assessment of expression levels for kiss1 gene, kisspeptin receptor (kiss1R), estradiol receptor (ER) and progesterone receptor (PR). There were no differences among groups for standing mount. The male group registered higher frequency for mounting, however, the control group registered higher frequency for swelling vulva, restlessness and interacting. Progesterone concentrations and mRNA expression of kiss1, kiss1R, ERs and PR in the hypothalamus, ER α in the pituitary, ER α , ER β and PR in the ovaries were significantly different among groups. The results suggest that mRNA expression of studied molecules differs between sexually immature and mature animals and the mRNA expression is influenced by the cyclic stage in post-pubertal animals.

Keywords: puberty, male effect, goat kids, Saanen

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I:

1. Frequência de pulsos de LH antes e depois da puberdade19
2. Representação esquemática da síntese dos esteroides a partir de colesterol no ovário.....24
3. Modelo de controle metabólico da puberdade pelos hormônios periféricos e circuitos envolvidos na regulação de GnRH.....30
4. Fluxograma dos tratamentos (ano 1).....42
5. Fluxograma dos tratamentos (ano 2).....43
6. Comportamento da fêmea androgenizada perante fêmea em cio.....43

Capítulo II:

1. Frequência de comportamentos de cio em cabritas Saanen submetidas a diferentes manejos de estimulação de cio63
2. Número de observações de cio e concentrações de progesterona e estradiol de todas as cabritas experimentais (ano 1)64
3. Perfil comportamental em cabritas Saanen submetidas a diferentes manejos de estimulação de cio (ano 1)65
4. Concentrações médias de progesterona e estradiol em cabritas do grupo macho, fêmea e controle66
5. Concentrações médias de progesterona e estradiol em cabritas observadas em cio (ano 1)68

Capítulo III:

1. Gel de agarose com as moléculas estudadas.....79
2. Frequência de comportamentos de cio em cabritas Saanen submetidas a diferentes manejos de estimulação de cio.....81

3. Número de observações de cio e concentrações de progesterona e estradiol de todas as cabritas experimentais (ano 2).....	82
4. Concentrações médias de progesterona e estradiol em cabritas do grupo macho e controle.....	83
5. Concentrações médias de progesterona e estradiol em cabritas observadas em cio (ano 2).....	84
6. Expressão relativa de kiss1, kiss1R, ER e PR no hipotálamo aos 5 e 9 meses de idade.....	85
7. Expressão relativa de RNAm de kiss1 e kiss1R no hipotálamo em cabritas Saanen submetidas ao efeito macho.....	86
8. Expressão relativa de RNAm de ER e PR no hipotálamo em cabritas Saanen submetidas ao efeito macho.....	87

LISTA DE TABELAS

Capítulo I:

1. Comportamentos e alterações físicas pesquisadas.....45
2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores.....47

Capítulo II:

1. Comportamentos e alterações físicas pesquisadas (ano 1)59
2. Resumo de observações comportamentais de cio das cabritas (ano 1)..60

Capítulo III:

1. Comportamentos e alterações físicas pesquisadas (ano 2)76
2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores.....78
3. Resumo de observações comportamentais de cio das cabritas (ano 2)..80
4. Tamanho de folículos e expressão de RNAm de PR, ER α e ER β 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>3α-HSD</i>	3 α -hidroxisteroide dehidrogenase
<i>4-DIONE</i>	4-androstenediona
<i>5α-DIONE</i>	5 α -androstenediona
<i>5α-red</i>	5 α -redutase
<i>5-DIOL</i>	5-androstene-3 β -diol
<i>17α-OHPREG</i>	17 α -hidroxipregnenolona
<i>17α-OHPROG</i>	17 α -hidroxiprogesterona
<i>17β-HSDn</i>	Tipo n 17 β -hidroxisteroide dehidrogenase
<i>CaCl₂</i>	Cloreto de cálcio
<i>Crtc1</i>	Creb1-regulated transcription coativator-1
<i>CYP11A1</i>	Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide1
<i>CYP17A1</i>	Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide1
<i>DHEA</i>	Dehidroepiandrosterona
<i>DHT</i>	Dehidrotestosterona
<i>E1</i>	Estrona
<i>E2</i>	Estradiol
<i>EB</i>	Energia bruta
<i>EE</i>	Etrato Etéreo
<i>ELISA</i>	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
<i>FDN</i>	Fibra em detergente neutro
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
<i>GPR54</i>	G protein couple receptor 54
<i>i.m.</i>	Intramuscular
<i>i.v.</i>	Intravenosa
<i>MgCl₂</i>	Cloreto de magnésio
<i>MgSo₄</i>	Sulfato de magnésio
<i>mL</i>	Mililitro
<i>mm</i>	Milímetro
<i>mM</i>	Micromoles
<i>MM</i>	Matéria metabolizável
<i>mRNA</i>	RNA mensageiro

<i>MS</i>	Matéria seca
<i>mTOR</i>	Mammalian target of rapamycin
<i>ng</i>	Nanograma
<i>pb</i>	Pares de bases
<i>PB</i>	Proteína bruta
<i>pg</i>	Picograma
<i>pH</i>	Potencial Hidrogeniônico
<i>PREG</i>	Pregnenolona
<i>PROG</i>	Progesterona
<i>qRT-PCR</i>	Quantitative reverse transcriptase PCR
<i>Tris-HCl</i>	Tris(hidroxilamina) aminometano, ácido clorídrico
<i>U</i>	Unidades interacionais
<i>μL</i>	Microlitro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1. Introdução	15
2. Revisão da Literatura	17
2.1. Regulação da puberdade na fêmea	17
2.2. O ciclo estral e os esteroides gonadais na cabra	20
2.2.1. Síntese e liberação dos esteroides sexuais	23
2.2.2. Regulação da síntese e liberação de GnRH pelo estradiol 17 β	25
2.2.3. Regulação da síntese e liberação de GnRH pela progesterona.....	26
2.3. Fatores metabólicos, ambientais e sociais e a reprodução na fêmea	27
2.3.1. Metabolismo	27
2.3.2. Fotoperíodo	30
2.3.3. Interação social	33
2.4. O papel das kisspeptinas no controle do sistema secretório GnRH.....	36
3. Objetivos e Hipóteses	40
3.1. Objetivos específicos	40
4. Descrição do Projeto	41
4.1. Animais e tratamentos.....	41
4.1.1. Manejo dos animais.....	41
4.1.2. Tratamentos	42
4.2. Coleta de dados e amostras.....	44
4.2.1. Observação do comportamento	44
4.2.2. Coleta e processamento do sangue	44
4.2.3. Coleta de órgãos	45
4.3. Dosagem hormonal	45
4.4. Quantificação da expressão do gene kiss1, kiss1R, ER e PR	46
4.4.1. Extração de RNA.....	47
4.4.2. Síntese do cDNA por transcrição reversa (RT)	47
4.4.3. Análise da expressão gênica pela PCR quantitativa (qRT-PCR)	48
5. Processamento de dados, Resultados e Discussão	48
6. Referências	49

CAPÍTULO II. PERFIL COMPORTAMENTAL E HORMONAL DE CABRITAS SAANEN SUBMETIDAS AO EFEITO MACHO NO PERÍODO PERIPÚBERE	56
RESUMO.....	56
1. Introdução	57
2. Material e métodos.....	58
2.1. Animais e tratamentos.....	58
2.2. Coleta de dados e amostras.....	59
2.3. Dosagem hormonal	60
2.4. Análise estatística	61
3. Resultados e discussão.....	61
4. Conclusões.....	68
5. Referências	69
CAPÍTULO III. EXPRESSÃO DE KISS1, KISS1R, ER E PR EM CABRITAS ..	56
RESUMO.....	73
Introdução	74
Material e métodos.....	75
Animais e tratamentos.....	75
Coleta de dados, amostras e análises	76
<i>Comportamento</i>	76
<i>Coleta de sangue e dosagem hormonal</i>	77
<i>Coleta de tecidos e quantificação da expressão do RNA</i>	78
<i>Análise estatística</i>	80
Resultados e discussão	80
Referências	90
CAPÍTULO IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

CAPÍTULO I. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

Os caprinos são encontrados em diferentes regiões climáticas, desde os trópicos ao ártico sendo criados em sistemas de produção diversificados, com importância econômica considerável em muitas regiões. A adaptabilidade dos caprinos a ambientes extremos (boa adaptação ao estresse calórico e bom aproveitamento da pastagem) fazem da espécie a melhor opção para produção animal em regiões climáticas com grande variabilidade de condições ambientais (DEVENDRA; COOP, 1982).

Em regiões tropicais os caprinos são bastante comuns e são principalmente usados para produção de carne e em pequena escala para produção de leite, pele e pelos (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011). A maioria das raças caprinas usadas para a produção leiteira nos trópicos é originária de climas temperados e, como na região de origem, apresentam algum grau de estacionalidade reprodutiva (DELGADILLO, 2011). Este fato, além de condicionar a disponibilidade do leite e seus derivados no mercado em determinados períodos do ano, pode influenciar a ocorrência da puberdade devido a relação desta com a época de nascimentos em espécies sazonais (FREITAS et al., 2004; FIOL; QUINTANS; UNGERFELD, 2010).

É amplamente reconhecida a influência dos fatores genéticos, ambientais (nutrição e fotoperíodo) e sociais sobre a regulação da puberdade e o controle reprodutivo como um todo (FREITAS et al., 2004; CASTELLANO et al., 2009; FIOL; QUINTANS; UNGERFELD, 2010; ROA et al., 2010; FLANAGAN; WEBB; STOWERS, 2011). O efeito dos fatores ambientais (FREITAS et al., 2004; MARTIN; RODGER; BLACHE, 2004) e sociais (GELEZ; FABRE-NYS, 2004; FIOL, QUINTANS; UNGERFELD, 2010) pode resultar em antecipação ou atraso na puberdade com consequência direta na eficiência reprodutiva do rebanho. Deste modo, práticas de manejo reprodutivo visando a acelerar a puberdade e aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho são relevantes do ponto de vista econômico.

O controle da atividade reprodutiva, incluindo a manipulação da idade à puberdade, pode ser feito à base do uso de hormônios, manipulação da alimentação e da luz e uso do “efeito macho”. Atualmente, o uso de hormônios é a prática mais comum devido a sua praticidade (FIOL, QUINTANS; UNGERFELD, 2010). Contudo, há uma preocupação crescente, entre consumidores de produtos de origem animal, com uma produção que minimize ou evite totalmente tratamentos hormonais nos animais e preservem, dessa forma, a saúde humana (MARTIN et al., 2004; SCARAMUZZI; MARTIN, 2008). Além disso, o uso de hormônios torna a produção bastante onerosa, por isso, a massificação de métodos alternativos como o estímulo sócio-sexual emerge como estratégia interessante no manejo de uma criação livre de hormônios.

Com o ressurgimento do efeito macho no meio científico devido ao seu potencial como um método de manejo sustentável para o controle reprodutivo (SCARAMUZZI; MARTIN, 2008; DELGADILLO, 2011), há já alguma referência ao seu efeito na aceleração da puberdade, incluindo a aceleração do desenvolvimento dos órgãos genitais, em ratos (FLANAGAN et al., 2011). Porém, existem resultados inconsistentes em algumas espécies (CHEMINEAU et al., 2008). Além disso, há referência de que o odor masculino não é efetivo na ativação da secreção de LH em animais “inexperientes” na espécie ovina (GELEZ; FABRE-NYS, 2004). Assim, o presente projeto tinha por objetivo estudar o efeito da estimulação sexual pelo “efeito macho” durante o período peri-púbere no desenvolvimento do eixo reprodutivo em cabritas Saanen, uma das raças usadas para produção leiteira no Brasil.

2. Revisão da Literatura

Nesta revisão da literatura serão abordados os mecanismos neuroendócrinos que regulam a puberdade e o ciclo estral bem como os principais fatores que podem influenciar esses processos fisiológicos importantes da vida reprodutiva da fêmea.

2.1. Regulação da puberdade na fêmea

A vida reprodutiva da fêmea compreende vários estágios. Ela começa na puberdade, sendo este um período importante, pois representa o culminar de uma série de eventos neuroendócrinos e morfológicos que levam o animal a aquisição da competência reprodutiva (SENGER, 2003). Deste modo, a idade e a época em que a puberdade ocorre são importantes para o manejo reprodutivo, pois afetam a reprodução como um todo influenciando a idade ao primeiro parto com impacto subsequente na vida reprodutiva e produtiva do animal.

Na fêmea, a puberdade pode ser definida, do ponto de vista neuroendócrino, como a ativação do sistema secretório do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) que estimula a liberação de gonadotrofinas e a atividade das gônadas e, em termos funcionais, com a ocorrência do primeiro cio seguido de ovulação e fase lútea de duração normal (SENGER, 2003; VALASI et al., 2012).

A ativação da síntese e secreção do GnRH é essencial para a reprodução, ela resulta de uma complexa interação de mecanismos regulatórios de origem interna e externa. Embora não esteja claramente elucidado como essa integração de informação ocorre, se reconhece que não se trata de um único gatilho ou sinalizador exclusivo que estimula esse processo, mas sim de um conjunto de sinais que interagem para alterar o padrão de síntese e liberação de GnRH que resulta no início da atividade cíclica ovariana (FOSTER et al., 2006).

A alteração no padrão de liberação do GnRH durante a puberdade é controlada por mecanismos esteroide-dependentes e esteroide-independentes. O primeiro mecanismo envolve mudanças na sensibilidade à regulação por

retroalimentação dos neurônios do GnRH pelos estrógenos (FOSTER et al., 2006; VALASI et al., 2012). O segundo mecanismo envolve o efeito dos fatores metabólicos (SENGER, 2003; CASTELLANO et al., 2009), ambientais (SUNDERLAND et al., 1995) e sociais (SENGER, 2003; FIOL, QUINTANS; UNGERFELD, 2010) na síntese e liberação de GnRH.

De acordo com Senger (2003) as secreções ondulatória e tônica ou pulsátil de GnRH respondem a retroalimentação positiva e negativa do estradiol respectivamente. Assim, embora o centro de secreção ondulatória tenha capacidade de responder a retroalimentação positiva pelos estrógenos desde antes da puberdade, este permanece quiescente, pois os níveis circulantes de estradiol, mesmo que presentes, não são suficientes para estimulá-lo. O autor argumenta ainda que, nessa condição de baixos níveis de estradiol, a sensibilidade à retroalimentação negativa do centro de secreção tônica a esse hormônio encontra-se aumentada o que resulta em baixos níveis de GnRH e consequentemente de gonadotrofinas (SENGER, 2003).

Próximo à puberdade, a sensibilidade do centro de secreção tônica à retroalimentação negativa pelos estrógenos diminui levando a que mais GnRH seja liberado, e consequentemente, mais gonadotrofinas cheguem ao ovário para estimular o desenvolvimento folicular e aumento gradual da síntese de estrógeno, influenciando assim na ativação do centro ondulatório que gera a onda de GnRH necessária para estimular a onda pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) como se ilustra na figura 1 (SENGER, 2003; VALASI et al., 2012).

Foster et al. (2006) reportam que a alteração da sensibilidade hipotalâmica aos estrógenos parece ser o principal mecanismo envolvido na iniciação da puberdade. Pois, segundo esses autores, em ovinos (espécie capaz de produzir, desde o nascimento, pulsos de GnRH de alta frequência, similares as do animal adulto) a expressão dessa capacidade depende da redução da sensibilidade a retroalimentação inibitória exercida pelos estrógenos no período pré-púbure. Na fêmea ovina, foi constatado que a remoção das gônadas três semanas após o nascimento resulta em aumento da amplitude e frequência de pulsos de GnRH após administração de altas doses de estrógenos (EBLING,

2005). Adicionalmente, nesses modelos experimentais com gonadectomia neonatal, foi possível verificar que uma fonte exógena de estrógeno administrada cronicamente em dose baixa inibiu a ativação do sistema secretório do GnRH até certa idade, depois da qual deixou de ser efetivo a semelhança do que ocorre na puberdade (FOSTER et al., 2006).

Considera-se que a ativação do sistema secretório GnRH que ocorre na puberdade é recorrente de forma periódica ao longa da vida reprodutiva em espécies sazonais e que provavelmente envolva os mesmos mecanismos neuroendócrinos que regulam a passagem da fase anestríca à atividade sexual nestas espécies, pois algumas semelhanças no perfil hormonal podem ser observadas (SMITH; CLARKE, 2010). Estes mesmos autores apontam, a título de exemplo, que tanto na fêmea pré-púbere quanto na fêmea sazonal adulta em anestro os pulsos de LH estão presentes, mas sua amplitude e, particularmente, a frequência estão marcadamente diminuídas. Por essa razão, seus níveis são insuficientes para estimular o desenvolvimento folicular e aumentar de forma sustentável a concentração de estradiol para ativar o mecanismo de onda pré-ovulatória.

Figura 1- Frequência de pulsos de LH antes e depois da puberdade (SENGER, 2003)

Embora os componentes básicos e alguns dos principais elementos regulatórios do eixo reprodutivo (hipotálamo – hipófise – gônadas) sejam bem

conhecidos, as bases neuroendócrinas que mediam a mudança de sensibilidade hipotalâmica à retroalimentação negativa pelos estrógenos na puberdade ainda não foram completamente elucidadas e tem sido motivo de estudos nas últimas décadas (ROA et al., 2011; VALASI et al., 2012). Esses estudos concentram-se particularmente nos circuitos neuronais, bem como nos fatores hormonais responsáveis pela dinâmica de liberação da GnRH no hipotálamo. Nesse sentido, várias moléculas têm sido identificadas como intermediárias da ação dos esteroides sexuais na secreção do GnRH (vide capítulo 2.2.2)

Entre os mecanismos esteroide-independentes, a necessidade de reservas energéticas mínimas como fator regulador da função reprodutiva é conhecida (CASTELLANO et al., 2009). Além do fator metabólico, fortemente associado à nutrição, o fotoperíodo em espécies sazonais (SUNDERLAND et al., 1995) e a interação social (FIOL; QUINTANS; UNGERFELD, 2010; FLANAGAN; WEBB; STOWERS, 2011) também participam na regulação da puberdade. A influência dos fatores ambientais e sociais na puberdade e reprodução em geral será discutida mais adiante.

Independentemente do exposto acima, reconhece-se a forte influência da genética na determinação da idade à puberdade que faz com que animais da mesma espécie e raças distintas criadas sob mesmas condições alcancem a puberdade em momentos diferentes (SENGER, 2003; ROA et al., 2010). Estas diferenças podem estar relacionadas com diferenças raciais de origem genética na curva de crescimento e no padrão de deposição de gordura corporal.

Em suma, o desenvolvimento, maturação e ativação dos neurônios do GnRH hipotalâmicos depende de vários mecanismos e fatores, deste modo, a puberdade resulta da interação entre todos ou alguns desses intervenientes (FOSTER et al., 2006; SMITH; CLARKE, 2010).

2.2. O ciclo estral e os esteroides gonadais na cabra

Os ovários dos mamíferos possuem um reservatório de folículos primitivos ou primordiais formado durante a vida fetal, que são folículos que não estão em crescimento, com uma única camada de células da granulosa. Esses folículos,

gradualmente deixam este estágio transformando se em folículos em crescimento (FORTUNE; YANG; MURUVI, 2010). Segundo estes autores, o estabelecimento do reservatório de células primordiais e a gradual transformação destas em folículos em desenvolvimento são processos críticos para a reprodução na fêmea, porém pouco se sabe sobre os mecanismos que iniciam qualquer desses processos em especial em mamíferos não roedores.

Nos ruminantes domésticos, durante grande parte do período antes da puberdade, os folículos primordiais são gradualmente ativados, iniciam o crescimento, mas regridem antes de atingir a fase de seleção e dominância (NOAKES; PARKINSON; ENGLAND, 2001; SENGGER, 2003). Isso ocorre porque os níveis de estradiol não são suficientes para estimular a secreção de GnRH e consequentemente das gonadotrofinas necessárias para manter o crescimento e promover a maturação folicular (SENGGER, 2003).

A partir da puberdade, momento caracterizado pela ocorrência da primeira ovulação, a fêmea apresenta atividade ovariana cíclica que será contínua ou restrita ao período reprodutivo (em espécies sazonais), enquanto não ocorrer gestação (NOAKES; PARKINSON; ENGLAND, 2001; SENGGER, 2003). Nas espécies sazonais, a atividade cíclica ovariana ocorre em período específico do ano dependente de a reprodução ocorrer em dias curtos ou longos.

A cabra é uma espécie sazonal de dias curtos, ou seja, ela apresenta atividade cíclica no período do ano com dias curtos. A sazonalidade reprodutiva na cabra varia de intensidade de acentuada à nula dependendo do afastamento da região equatorial (AMOAHA et al., 1996; WALKDEN-BROWN; RESTALL, 1996). Em climas temperados (latitude $>40^\circ$), os caprinos demonstram severa estacionalidade reprodutiva (AMOAHA et al., 1996). Ao contrário, em latitudes subtropicais (23° a 40°) raças locais ou adaptadas apresentam atividade cíclica ao longo do ano. Por outro lado, raças importadas de regiões temperadas demonstram variações na atividade sexual desde fraca à acentuada estacionalidade reprodutiva em latitudes subtropicais (WALKDEN-BROWN; RESTALL, 1996).

As diferenças no padrão do comportamento reprodutivo entre as regiões temperadas e tropicais estão relacionadas com as diferenças entre a duração da luz do dia nas diferentes estações do ano nessas regiões. Essa diferença varia em função da latitude diminuindo em direção ao equador pelo que sua influência na reprodução varia de intensidade e duração na mesma direção, ou seja, diminui em direção ao equador (CARCANGIU et al., 2005).

Durante o período de inatividade reprodutiva, à semelhança do que se verifica no período pré-púbere, ocorre desenvolvimento folicular sem que ocorra recrutamento devido à inatividade hipotalâmica (SENGER, 2003; CRUZ; RONDINA; FREITAS, 2005). Em termos neuroendócrinos, o retorno a atividade cíclica em espécies sazonais pode ser comparado a ativação do sistema secretório GnRH que ocorre na puberdade.

Na fase reprodutiva, a cabra apresenta ciclos estrais enquanto não ocorrer gestação. O ciclo estral da cabra dura em média 20 a 21 dias, porém os ciclos tendem a ser irregulares ou curtos no começo da época reprodutiva (NOAKES; PARKINSON; ENGLAND, 2001; SENGHER, 2003) ou quando a ovulação é induzida (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011). Ainda segundo os últimos autores, é característica da cabra a ocorrência de alta frequência de ciclos curtos.

Durante grande parte do ciclo estral, vários grupos de folículos chegam até folículos antrais (em ondas foliculares), mas devido ao bloqueio exercido pela progesterona no hipotálamo (retroalimentação negativa), estes entram em atresia. Somente quando tal bloqueio é removido pela ação da prostaglandina F_{2α} (luteólise), rapidamente ocorre recrutamento de vários folículos antrais, seleção, dominância, maturação e ovulação (SENGER, 2003).

Do ponto de vista neuroendócrino, as modificações ocorridas durante o ciclo estral estão relacionadas com os hormônios do eixo reprodutivo, em particular aos esteroides gonadais. Os esteroides gonadais, em particular, estradiol e progesterona controlam a atividade reprodutiva na fêmea através da retroalimentação positiva e negativa, respectivamente, na secreção de GnRH e das gonadotrofinas (SENGER, 2003). O estradiol e a progesterona atuam em

momentos distintos do ciclo, ou seja, em duas fases distintas do ciclo estral, nomeadamente: folicular e lútea (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011).

Embora o estradiol tenha atuação ainda na fase pré-púbere na maturação do eixo reprodutivo, o momento da puberdade se torna singular no sentido de ser a primeira ocasião que ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, produção de gametas (ovulação) e manifestação de comportamento sexual (EBLING, 2010). Assim, o estradiol produzido pelo folículo e a progesterona produzida pelo corpo lúteo podem ser usados como referência para indicar a o início da atividade cíclica reprodutiva na fêmea.

2.2.1. Síntese e liberação dos esteroides sexuais

Os hormônios esteroides são moléculas que tem o mesmo núcleo de carbono chamado ciclopentanoperhidrophenantreno com 4 anis designados A, B, C e D nos quais os carbonos estão enumerados em ordem específica (SENGER, 2003; THOMAS; POTTER, 2013).

Os principais esteroides gonadais na fêmea (progesterona e estradiol) são sintetizados no ovário principalmente a partir de colesterol proveniente da corrente sanguínea [figura 2] (VAN, 2013) e em pequena escala a partir de acetyl coenzima-A precursor de colesterol (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009). Os principais produtos iniciais dessa síntese são a progesterona e o esteroide sexual masculino (testosterona), porém, quase a totalidade da testosterona e grande parte da progesterona são convertidas em estrógenos (E_1 e E_2) pelas células da granulosa na fase folicular (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009).

Figura 2- Representação esquemática das vias de síntese dos esteroides a partir de colesterol no ovário em animais, tamanho da seta representa importância relativa da reação, setas em preto indicam vias que ocorrem em todos os mamíferos (CONLEY; BIRD, 1997; BOBES et al., 2003; VAN, 2013). Figura adaptada de VAN (2013).

Os esteroides sexuais são responsáveis pela promoção de mudanças no trato genital que levam à maturação sexual na puberdade. Além de participar ativamente na maturação do eixo reprodutivo (discutido no capítulo 2.1), os estrógenos são necessários para o desenvolvimento pós-natal dos órgãos reprodutivos (LUBAHN et al., 1993). Em ratos com uma mutação provocada no receptor de estradiol, Lubahn et al. (1993) verificaram a ocorrência de anomalias no desenvolvimento no útero (hipoplásia) e ovários (hiperemia). Além disso, os mesmos autores observaram que nesses animais não foram registrados aumento do peso do útero e cornificação do epitélio vaginal que ocorreu em animais não mutantes após tratamento com estradiol. A mutação provocada no receptor de estradiol também afeta o desenvolvimento da glândula mamária (PEDRAM et al., 2014).

Na fêmea adulta, os esteroides sexuais são responsáveis pela regulação da atividade cíclica ovariana. O estradiol e a progesterona atuam através de retroalimentação positiva e negativa, respectivamente, na síntese e liberação do GnRH, último elemento na cascata neuronal que controla a síntese e liberação de gonadotrofinas hipofisárias (HERBISON; PAPE, 2001; NESTOR et al., 2013).

2.2.2. Regulação da síntese e liberação de GnRH pelo estradiol 17 β

Nos mamíferos, o estradiol regula a síntese e liberação de GnRH através de retroalimentação positiva e negativa, sendo que os dois mecanismos atuam nos neurônios GnRH por vias diferentes. O estradiol atua diretamente através do receptor ER β (EVANS et al., 1997) ou indiretamente através do receptor ER α (Wintermantel et al., 2006) nos neurônios GnRH para estimular a onda pré-ovulatória de GnRH e LH e atua indiretamente através do receptor ER α para inibir a amplitude do pulso de GnRH (NESTOR et al., 2013).

Durante grande parte do ciclo estral, o estradiol exerce ação inibitória na atividade dos neurônios do GnRH que resulta em baixos níveis circulantes de GnRH e gonadotrofinas (SENGER, 2003). A ação inibitória do estradiol na secreção e liberação do GnRH e LH ocorre através de mediadores eferentes uma vez que os neurônios do GnRH não dispõem do receptor de estradiol ER α (OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013). Assim, várias substâncias têm sido confirmadas como intermediárias da ação retroalimentação do estradiol na síntese e liberação de GnRH como GABA, Glutamato, β -endorfina (KELLY; QIU, 2010) e kisspetinas (POPA; CLIFTON; STEINER, 2008; OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013).

Na fase final de desenvolvimento folicular, os níveis de estradiol aumentam significativamente (GAAFAR; GABR; TELEB, 2005; KHANUM; HASSUN; KAUSAR, 2008). Esse aumento dos níveis de estradiol atua nos neurônios do GnRH estimulando a síntese e liberação de GnRH (EVANS et al., 1997). Tendo em conta que o pulso de GnRH e LH que antecede a ovulação é precedido por um aumento de níveis circulantes de estradiol, sua detecção pode ser usada para indicar a ocorrência de ovulação.

O primeiro aumento na concentração plasmática de estradiol ocorre ao redor da puberdade e está relacionado com a mudança de sensibilidade do centro de secreção tônica de GnRH que resulta em aumento da concentração de GnRH e LH, originando a primeira onda desses hormônios, característica da puberdade (EVANS; O'DOHERTY, 2001). Durante grande parte do ciclo, a concentração de estradiol em caprinos fica em torno de 10 pg/mL, mas aumenta

rapidamente na fase final do desenvolvimento folicular até atingir níveis plasmáticos em torno de 40pg/mL sendo inferior a 8 pg/mL durante o anestro (CHEMINEAU et al., 2010).

2.2.3. Regulação da síntese e liberação de GnRH pela progesterona

A progesterona regula a síntese e liberação de GnRH através da retroalimentação negativa. A semelhança do que ocorre com o efeito inibidor do estradiol através do receptor $ER\alpha$, os neurônios do GnRH estão desprovidos de receptor de progesterona (PR) (SKINNER; CARATY; ALLINGHAM, 2001). Assim, os mesmos autores sugerem que a progesterona exerce retroalimentação negativa na síntese e liberação de GnRH e evita o efeito estimulador de níveis elevados de estradiol nos neurônios do GnRH de forma indireta.

Evidências recentes indicam a intermediação da orphanina (OFQ) na ação da progesterona sobre os neurônios do GnRH em ovelhas, já que os neurônios da OFQ na região pré-óptica possuem receptores $ER\alpha$ e PR (NESTOR et al., 2013). Por outro lado, há evidências de que a secreção de noreadrenalina, um dos neurotransmissores envolvidos no controle do GnRH e LH, também é controlado pela progesterona (HELENA; SZAWKA; ANSELMO-FRANCI, 2009).

A progesterona é parte da cascata de bio-degradação de colesterol no ovário. Porém, grande parte da progesterona é convertida em estradiol pelas células da granulosa na fase folicular. Contudo, na fase lútea a produção de progesterona é tão grande que mesmo convertida consegue ser liberada em grandes quantidades para a corrente sanguínea (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009). Por isso, o aumento de níveis circulantes de progesterona é indicativo da presença de corpo lúteo, resultado da ovulação.

Os níveis de progesterona na cabra durante o anestro são inferiores a 0,5 ng/mL, aumentam gradualmente após a ovulação para alcançar níveis máximos entre 4 a 8ng/mL, variáveis de acordo com o número de corpus lúteos, cerca de

6 dias depois (SMITH, 1986; GAAFAR; GABR; TELEB, 2005; KHANUM; HASSUN; KAUSAR, 2008; BASZCZYK et al., 2009). A concentração de progesterona permanece acima de 1 ng/mL durante grande parte do ciclo estral promovendo retroalimentação negativa no hipotálamo e hipófise inibindo a secreção ondulatória de LH e FSH (CHENTOUF et al., 2011).

2.3. Fatores metabólicos, ambientais e sociais e a reprodução na fêmea

2.3.1. Metabolismo

A importância da nutrição na regulação da atividade reprodutiva em particular na fêmea é inquestionável. Estudos comprovam a dependência da ocorrência da puberdade e da atividade cíclica/fertilidade em função da ingestão de nutrientes com ênfase para a energia dietética (MARTIN et al., 2004; ROLLAND; MOENTER, 2011). Segundo Martin et al. (2004), o plano nutricional oferecido aos animais no período pré-puberdade, pode proporcionar um ganho de peso que pode influenciar (antecipar ou atrasar) a ocorrência da puberdade.

A função reprodutiva demanda muita energia (particularmente na fêmea) e não é essencial para a sobrevivência do indivíduo. Senger (2003) argumenta que apesar de o custo metabólico para o desenvolvimento folicular, ovulação e transporte do óvulo ser baixo, a gestação e a lactação demandam muita energia, sendo por isso, incompatíveis com a grande demanda energética para manter o metabolismo e crescimento em animais pré-púbere.

À medida que o animal cresce, há uma redução da energia necessária para manter as funções vitais permitindo que a energia excedente do metabolismo possa ser direcionada para outras funções fisiológicas. Essa energia excedente é convertida em depósitos de gordura que sinaliza no sistema nervoso central para a ativação do sistema secretório do GnRH (SENGER, 2003; CASTELLANO et al., 2009).

Há evidências de que o sistema nervoso central (neurônios GnRH) é modelado pelos níveis circulantes de glicose (ROLLAND; MOENTER, 2011). Esse sistema de detecção direta dos níveis sanguíneos de glicose pelos

neurónios do GnRH, está associado a outros mecanismos indiretos de informação metabólica do organismo no controle da atividade reprodutiva (KINOSHITA et al., 2003; ROLLAND; MOENTER, 2011).

O controle metabólico da função gonadotrófica envolve vários hormônios e sem dúvida a leptina, hormônio dos adipócitos, joga um papel essencial na regulação hipotalâmica da função reprodutiva (SENGER, 2003; AHIMA; OSEI, 2004; TENA-SEMPERE, 2007). Contudo, sabe-se que o controle metabólico da reprodução é mais complexo, pois, não atua apenas a nível central. O útero, as gônadas e a glândula mamária absorvem e respondem, em parte, de forma autônoma a hormônios e substratos metabólicos circulantes (MARTIN et al., 2004).

Postula-se que a energia excedente das funções vitais é convertida em depósitos de gordura e essas reservas energéticas em forma de adipócitos sinalizam ao nível central através da leptina para a ativação do sistema GnRH (SENGER, 2003). Porém, o mesmo autor ressalta que o grau de deposição de gordura em si não é suficiente para estimular a puberdade, pois é importante que esteja associado à maturidade corporal. Essa ação da leptina também é observada na restauração da função reprodutiva depois de um período de fome severa (AHIMA; OSEI, 2004).

A ação da leptina sobre a função reprodutiva foi descoberta casualmente quando se constatou que indivíduos com obesidade mórbida tinham deficiência deste hormônio e que apresentavam também hipogonadismo e infertilidade, como consequência de não terem iniciado a puberdade e que a administração de leptina nesses indivíduos foi capaz de estimular a puberdade e prevenir a esterilidade (TENA-SEMPERE, 2007). Porém, o mesmo autor realça que o papel da leptina no controle da reprodução é mais proeminente em fêmeas devido à demanda energética da gestação e lactação, uma vez que alguns machos com deficiência de leptina não apresentam transtornos reprodutivos.

Mais do que um efeito estimulador, a leptina tem um papel permissivo (facilitador) sobre a puberdade e a fertilidade (TENA-SEMPERE, 2007). Assim, a presença de reservas energéticas é imprescindível, mas somente elas, não

são suficientes para iniciar a puberdade e manter a competência reprodutiva uma vez que tentativas de antecipar a puberdade com administração de leptina em roedores produziram resultados inconsistentes (TENA-SEMPERE, 2007; CASTELLANO et al., 2010).

O papel permissivo da leptina na função hipotalâmica sugere um efeito indireto sobre os neurônios GnRH através de moduladores de vias aferentes (QUENNEL et al., 2009). Isto significa que os neurônios GnRH não são capazes de detectar diretamente níveis circulantes de leptina, servindo portanto como tradutores (efetores) da resposta central da informação metabólica que lhes é transmitida por sensores metabólicos a nível superior (CASTELLANO et al., 2010). Ademais, parece que a ação da leptina não se restringe ao hipotálamo já que seus receptores foram encontrados na hipófise e nos ovários, o que sugere também ação direta nesses órgãos (TENA-SEMPERE, 2007).

Outros hormônios periféricos originários de tecidos que participam no metabolismo têm sido implicados na regulação metabólica da função reprodutiva. Recentemente, a ghrelina hormônio sintetizado no estômago emergiu como possível sinalizador metabólico no controle da função reprodutiva. A ghrelina é um hormônio com função orexigénica (antagônica a leptina) atuando ao nível do hipotálamo como sinalizador de deficiência energética (TENA-SEMPERE, 2007).

Estudos relativos à ação da ghrelina no controle gonadotrófico revelaram que sua administração central resulta na supressão da secreção pulsátil de LH em animais pré-púbere, fêmeas cíclicas e animais gonadotomizados (TENA-SEMPERE, 2007). Há ainda evidências da ação de ghrelina a nível periférico como na hipófise e gônadas suprimindo a secreção de LH e FSH e a esteroidogênese (MUCCIOLI et al., 2011).

A participação da leptina e da ghrelina na regulação metabólica central da reprodução (figura 3) é comprovadamente reconhecida. Ainda assim, os mecanismos envolvidos nesse processo são, ainda hoje, motivo de vários estudos. A descoberta do papel das kisspeptinas como mediadores metabólicos da atividade dos neurônios GnRH representou um salto no entendimento dos

mecanismos moleculares envolvidos nesse controle, uma vez que a ausência de receptores de leptina nos neurônios GnRH tinha sido evidenciada (DANIEL et al., 2013).

Figura 3 – Modelo de controle metabólico da puberdade pelos hormônios periféricos e os circuitos centrais envolvidos na regulação da atividade dos neurônios GnRH (ROA et al., 2010)

A expressão do *kiss1* (gene que codifica as kisspeptinas) no hipotálamo é regulada por hormônios sinalizadores do estado metabólico do organismo. Nesse sentido, o papel da leptina no aumento da expressão mRNA *kiss1* (TENA-SEMPERE, 2010) e a habilidade de ghrelina em reduzir significativamente a expressão desse gene (MUCCIOLI et al., 2011), confirmam o papel das kisspeptinas no controle reprodutivo.

2.3.2. Fotoperíodo

Ao longo do processo evolutivo das espécies, mecanismos endógenos evoluíram em função dos fatores ambientais. Para garantir sucesso reprodutivo, um dos mecanismos desenvolvidos para permitir que a gestação e os nascimentos aconteçam em períodos favoráveis a sobrevivência da cria e da

mãe (disponibilidade de nutrientes e condições ambientais) é a sazonalidade reprodutiva (MARTIN et al., 2004).

Os caprinos são encontrados em diferentes regiões climáticas, desde os trópicos ao ártico, tendo desenvolvido diferentes estratégias reprodutivas para garantir a sua sobrevivência e, em particular, de suas crias. Em climas temperados (latitude $>40^\circ$), os caprinos demonstram severa estacionalidade reprodutiva (AMOA et al., 1996). Ao contrário, em latitudes subtropicais (23° a 40°) raças locais ou adaptadas apresentam atividade cíclica ao longo do ano, enquanto que raças importadas de regiões temperadas demonstram variações na atividade sexual desde fraca à acentuada estacionalidade reprodutiva (WALKDEN-BROWN; RESTALL, 1996).

Nas espécies sazonais, a época reprodutiva numa raça em condições específicas é fixa ao longo dos anos. Assim, ocorre sincronização da atividade reprodutiva entre fêmeas (atividade ovulatória) e machos (qualidade e volume do ejaculado) através de mecanismos complexos relacionados ao ambiente externo (CHEMINEAU et al., 2010).

A duração do fotoperíodo (luz do dia) parece constituir o principal fator que controla a estacionalidade reprodutiva nas raças sensíveis (SENGER, 2003). Porém, em raças adaptadas que habitam zonas com grande variabilidade no padrão de disponibilidade de alimentos (regiões semiáridas) a resposta ao fotoperíodo é fortemente alterada por outros fatores ambientais (MARTIN et al., 2004). Em espécies de reprodução em dias curtos (ovinos e caprinos), a glândula pineal, na ausência de luz por períodos mais longos (noites longas), produz melatonina em níveis adequados para reativar o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas ao retorno a atividade cíclica (SENGER, 2003).

O efeito do fotoperíodo na reprodução também pode ser observado na ocorrência da puberdade. Independente da época de nascimento, a puberdade é sincronizada para o período reprodutivo específico da raça em sua região (SUNDERLAND et al., 1995). Os mesmos autores reportam que em cordeiros, a exposição a uma sequência de fotoperíodo longo seguido de fotoperíodo curto é necessária para que a puberdade ocorra, porém, a resposta a essa exposição

também é dependente da idade em que os animais são expostos a esta sequência.

Os mecanismos neuroendócrinos envolvidos na transdução do sinal fotoperiódico no eixo reprodutivo não estão claramente elucidados. Chemineau et al. (2008) sugerem que uma mudança na potência da retroalimentação negativa dos estrógenos (maior durante o anestro) parece ser o elemento chave deste sistema. A mudança na potência da retroalimentação negativa dos estrógenos resulta na alteração da pusiabilidade do fator liberador de LH e pode ser derivada, em parte, pela variação sazonal no transporte de estradiol para o sistema nervoso central através da alteração da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (THIERY et al., 2006).

Estudos recentes estabelecem a ligação entre os mecanismos moleculares de geração do ritmo circadiano e a transdução do sinal fotoperiódico. Segundo Ikegami e Yoshimura (2012), o relógio circadiano parece influenciar todas as cascatas de transdução de sinal de fotorreceptores à produção neuroendócrina sendo observadas alterações nos níveis de expressão dos genes do relógio circadiano relacionados ao fotoperíodo. Ademais, segundo os mesmos autores, os níveis de melatonina em diferentes fotoperíodos podem ser influenciados por variações no perfil de expressão de genes circadianos.

Por outro, há evidências do efeito da modulação do fotoperíodo na percentagem de neurônios que expressam o gene *kiss1* em ovelhas (CHALIVOIX et al., 2010) e da possível intervenção da kisspeptina na ação da melatonina sobre a secreção e liberação de GnRH (POPA; CLIFTON; STEINER, 2008; CHALIVOIX et al., 2010). Estas evidências podem indicar que o efeito do fotoperíodo na secreção e liberação do GnRH é intermediado pela melatonina através dos neurônios *kiss1* como acontece com a leptina.

Embora seja consenso que a influência do fotoperíodo na reprodução varia de intensidade e duração em função da latitude e que a disponibilidade de alimentação se torna o fator mais limitante em raças locais ou adaptadas aos trópicos, outros fatores como a genética podem influenciar na intensidade e duração do anestro estacional em cabras (CARCANGIU et al., 2005;

CHEMINEAU et al., 2010; ZARAZAGA et al., 2010). Nesse sentido, Carcangiu et al. (2005) sugerem uma relação entre a concentração de melatonina e o tamanho da glândula pineal sugerindo que estas sejam responsáveis pelas diferenças raciais observadas em animais criados nas mesmas condições ambientais.

Por outro lado, foi verificado que nos animais de sazonalidade marcada, um ciclo anual rítmico endógeno, similar ao relógio circadiano, é capaz de gerar períodos alternados de repouso e atividade sexual independentemente do fotoperíodo já que os mesmos podem ser observados experimentalmente expondo os animais a um fotoperíodo artificial constante por no mínimo dois anos (CHEMINEAU et al., 2010). Isto quer dizer que os animais deixam de responder a tratamentos de luz de duração prolongada.

Os fatos acima sustentam uma forte influência genética sobre a sazonalidade reprodutiva e podem provavelmente explicar a persistência de estacionalidade em raças originárias de climas temperados mesmo quando criadas em climas subtropicais e condições nutricionais adequadas.

2.3.3. Interação social

A comunicação entre animais da mesma espécie com vista à coordenação de comportamentos e da atividade reprodutiva é conhecida há bastante tempo. Essa informação é transmitida exclusivamente ou conjuntamente através do estímulo olfatório, auditivo, visual ou tátil (REKWOT et al., 2001).

Animais do mesmo sexo ou sexo oposto produzem feromônios, substâncias químicas liberadas pela urina, fezes ou glândulas subcutâneas que podem ser percebidas através do sistema olfatório por outros animais da mesma espécie e influenciam sua atividade reprodutiva (GELEZ; FABRE-NYS, 2004). De acordo com os mesmos autores, os feromônios são constituídos por um ou mais compostos que atuam em animais da mesma espécie mediando uma ação específica através da indução de resposta genética pré-programada não imitável por outro estímulo.

Dependendo do contexto biológico, a interação social pode resultar na inibição da atividade reprodutiva de alguns indivíduos ou na estimulação e sincronização neuroendocrinológica e comportamental (GELEZ; FABRE-NYS, 2004). Embora seja reconhecida a influência do tamanho do grupo de fêmeas no estímulo (SENGER, 2003; FIOL; QUINTANS; UNGERFELD, 2010) e da dominância na inibição (REKWOT et al., 2001) da atividade ovulatória de outras fêmeas, o estímulo sócio-sexual mais estudado é o efeito macho.

2.3.3.1. Efeito macho

Nas espécies sazonais, a exposição de fêmeas a machos ativos estimula o sistema reprodutivo neuroendócrino à ovulação fora da época reprodutiva. O fenômeno provavelmente evoluiu em ungulados para evitar assincronia entre sexos na época de reprodução (DELGADILLO et al., 2009). Este fenômeno, conhecido há mais de 60 anos, só voltou a ganhar espaço científico devido ao seu potencial como um método “ambientalmente sustentável”, barato e prático para o controle da atividade reprodutiva nessas espécies.

Esse fenômeno, denominado “efeito macho”, pode ser induzido por machos sexualmente ativos (FIOL; QUINTANS; UNGERFELD, 2010; DELGADILLO et al., 2011), fêmeas e machos castrados androgenizados (MELLADO e HERNANDEZ, 1996; KAKUMA et al., 2007) e pela exposição a odores masculinos da mesma espécie (OKAMURA et al., 2010; MURATA et al., 2011) ou de outra espécie (DELGADILLO et al., 2009).

Em fêmeas sazonais, a introdução do macho sexualmente ativo fora da época reprodutiva estimula a secreção de LH (resposta de curto prazo) seguida de ovulação, resposta de longo prazo (GELEZ; FABRE-NYS, 2004). Segundo os mesmos autores, o pulso de LH resultado da exposição ao macho pode ser observado em poucos minutos, enquanto que a secreção de FSH não ocorre tão rapidamente. Os mesmos autores reportam também que na cabra, 60% das fêmeas apresentam comportamento sexual e ovulação relacionados ao aumento do pulso de LH imediato a exposição, e, 75% das fêmeas que ovulam

apresentam uma fase lútea curta que resulta numa segunda ovulação 5 dias depois da exposição ao macho.

O efeito da exposição ao macho fora da época reprodutiva é influenciado, entre outros fatores, pela duração e intensidade do anestro na raça estudada. Em raças de estacionalidade reprodutiva acentuada a resposta ao efeito macho parece ser condicionada a proximidade da estação reprodutiva (HAWKEN; BEARD, 2009). Porém, a resposta pode ser incrementada pela exposição dessas fêmeas ao macho em coabitação com fêmeas cíclicas (DELGADILLO et al., 2009). Esta constatação indica que a fraca resposta a exposição ao macho parece não estar associada ao fator genético.

A resposta neuroendócrina ao efeito macho, fenômeno bastante reportado em espécies sazonais fora da época reprodutiva, parece ser somente parcialmente replicada em fêmeas cíclicas uma vez que há referência a um limiar de progesterona durante a fase lútea acima do qual o efeito macho é reduzido ou nulo (DELGADILLO et al., 2009). Contudo, esses autores afirmam que o fenômeno é “efetivo” na sincronização da atividade cíclica na cabra com alta proporção de ocorrência de ovulações dentro de 6 dias, porém o mecanismo neuroendócrino ainda não está claro.

Uma vez que a resposta a exposição ao feromônio é o aumento da secreção de LH, se considera que o alvo central da sinalização pelo feromônio seja o sistema gerador da onda de GnRH (GELEZ; FABRE-NYS, 2004; MURATA et al., 2009). Segundo Okamura et al. (2010), isso torna ímpar o mecanismo de ação do feromônio já que a maioria de fatores externos e internos inibem a atividade de geração da onda pré-ovulatória de GnRH. E mais, indica que o mecanismo de ação do feromônio é similar ao mecanismo de ativação do centro de secreção da onda pré-ovulatória que ocorre na puberdade e na reativação da atividade cíclica em fêmeas sazonais e pode significar que a ação do feromônio depende do grau de sensibilidade do centro de secreção tônica a retroalimentação negativa pelos estrógenos.

Apesar de que outros mecanismos de estimulação como a visão, audição e aprendizado possam ser necessários para uma resposta efetiva ao efeito

macho, considera-se que o sistema olfatório seja principal mecanismo, já que a ovulação pode ser induzida pela exposição à lã ou pêlo na ausência do carneiro e do bode respectivamente (OKAMURA et al., 2010).

Nos mamíferos os estímulos olfatórios são recebidos e integrados por dois sistemas, o sistema olfatório principal e o acessório. Estes sistemas, anatomicamente separados, possuem receptores e mecanismos centrais próprios (GELEZ; FABRE-NYS, 2004). Estudos moleculares em ratos mostram projeções nervosas originárias dos sistemas olfatório e vomeronasal diretamente nos neurônios GnRH na região pré-ótica e podem estar implicados na ação dos neurônios GnRH mediada pelo feromônio como a modulação do comportamento reprodutivo (OKAMURA et al., 2010). Por outro lado, em cabras, foi constatado que a sinalização do feromônio é transmitida aos neurônios kisspeptinas no núcleo arqueado hipotalâmico ativando-os a gerar o peptídeo, responsável pela indução de pulsos de GnRH (MURATA et al., 2011).

Com o ressurgimento do efeito macho no meio científico devido ao seu potencial como um método de manejo sustentável para o controle reprodutivo (SCARAMUZZI; MARTIN, 2008; DELGADILLO, 2011), há já alguma referência ao seu efeito na aceleração da puberdade, incluindo a aceleração do desenvolvimento dos órgãos genitais, em ratos (FLANAGAN et al., 2011). Porém, existem resultados inconsistentes em algumas espécies (CHEMINEAU et al., 2008). Além disso, há referência de que o odor masculino não é efetivo na ativação da secreção de LH em animais “inexperientes” na espécie ovina (GELEZ; FABRE-NYS, 2004).

2.4. O papel das kisspeptinas no controle do sistema secretório GnRH

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado a participação de várias moléculas no complexo processo regulatório de secreção e liberação de GnRH, principal elo de integração do eixo reprodutivo, entre elas as kisspeptinas.

Kisspeptinas são peptídeos codificados pelo gene *kiss1* com afinidade pelo receptor Kiss1R (antes designado GPR54). O gene *kiss1* codifica uma

proteína de 145 aminoácidos que pode ser clivada em sequências de 54 aminoácidos. Esta, por sua vez, pode ser clivada em formas menores de 14, 13 e 10 aminoácidos todas, convenientemente, designadas kisspeptinas já que derivam do mesmo gene e conservam a mesma afinidade e atividade biológica (GIANETTI; SEMINARA, 2008; DE TASSIGNY; COLLDGE, 2010).

A descoberta da ação das kisspeptinas na regulação da secreção e liberação de GnRH resultou, da constatação por dois grupos distintos de pesquisadores, da ligação entre a mutação do receptor desses peptídeos com o hipogonadismo em humanos (POPA; CLIFTON; STEINER, 2008; OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013). Em ambos os estudos, os autores demonstraram que indivíduos com essa mutação apresentavam anomalias de desenvolvimento das características sexuais secundárias bem como baixos níveis de esteroides sexuais e gonadotrofinas, apesar de serem normossômicos e apresentarem glândula pituitária funcional (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003).

Estudos posteriores em ratos com mutação provocada no receptor GPR54 revelaram a mesma caracterização e similaridades com o distúrbio reportado em humanos, sugerindo que o receptor é necessário para iniciar e manter uma maturação sexual normal em mamíferos (GIANETTI; SEMINARA, 2008; POPA; CLIFTON; STEINER, 2008).

Em pouco tempo, vários estudos associaram as kisspeptinas ao controle reprodutivo resultando na caracterização desses peptídeos como reguladores primários dos neurônios GnRH no hipotálamo e um dos mais potentes estimuladores do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em diferentes espécies entre mamíferos e não mamíferos (CASTELLANO et al., 2010).

Atualmente, várias evidências confirmam o envolvimento das kisspeptinas na regulação da atividade reprodutiva desde a maturação ao funcionamento integral do eixo reprodutivo, incluindo o processo de diferenciação sexual do sistema nervoso, a determinação do momento da puberdade, a regulação da secreção gonadotrófica pelos esteroides gonadais e o controle da fertilidade por

fatores metabólicos, ambientais e sociais (POPA; CLIFTON; STEINER, 2008; ROA; NAVARRO; TENA-SEMPERE, 2011; KITAHASHI; PARHAR, 2013).

Nesse sentido, a descoberta do papel das kisspeptinas na intermediação molecular da ação dos esteroides gonadais (DE TASSIGNY; COLLEDGE, 2010; KITAHASHI; PARHAR, 2013; OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013), do metabolismo (DANIEL et al., 2013; KITAHASHI; PARHAR, 2013) e dos fatores ambientais (POPA; CLIFTON; STEINER, 2008; KITAHASHI; PARHAR, 2013) e sociais (POPA; CLIFTON; STEINER, 2008); MURATA et al., 2011) nos neurônios GnRH melhora o entendimento do complexo mecanismo de regulação do eixo reprodutivo, uma vez que, a título de exemplo, a ausência de receptores de estrógenos (ER α), progesterona e leptina nesses neurônios já há muito intrigava os pesquisadores (SKINNER; CARATY; ALLINGHAM, 2001; OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013).

Hoje se sabe que, a maioria dos neurônios GnRH expressa o receptor das kisspeptinas na ovelha (SMITH et al., 2009) e roedores (DE TASSIGNY; COLLEDGE, 2010). Por outro lado, os neurônios kiss1 expressam receptores de estrógenos ER α (FRANCESCHINI et al., 2006) e progesterona PR (SMITH et al., 2007). Tanto os esteroides gonadais (estrógeno, testosterona e progesterona) como hormônios metabólicos (leptina e ghrelina) e sinais fotoperiódicos (através da melatonina) influenciam a expressão do gene kiss1 (KITAHASHI; PARHAR, 2013).

A expressão do gene kiss1 e do receptor GPR54 foram objeto de várias pesquisas depois das descobertas reportadas anteriormente. Em ratos e macacos foi observado que tanto em machos como em fêmeas, a expressão de kiss1 no hipotálamo é baixa antes da puberdade e aumenta drasticamente no período maturação sexual (SHAHAB et al., 2005; POPA; CLIFTON; STEINER, 2008).

Em fêmeas adultas, a injeção intravenosa de kisspeptina aumentou a concentração de GnRH e paralelamente de LH na circulação em ovelhas e cabras (OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013). Num outro estudo realizado em cabras durante a fase lútea, a administração endovenosa de

kisspeptina rapidamente provocou aumento dos níveis de LH e FSH (HASHIZUME et al., 2010), semelhante ao que ocorre na indução do estro pelo efeito macho durante o anestro. Este resultado do Hashizume et al (2010) indica que provavelmente este mesmo efeito pode ser observado na ativação do sistema secretório GnRH na puberdade em fêmeas já que esse evento é comparável em termos neuroendócrinos a reativação do sistema secretório GnRH no anestro.

3. Objetivos e Hipóteses

O presente trabalho tinha como objetivo estudar o efeito da interação social através do efeito macho no período peri-púbere sobre a ativação do eixo reprodutivo em cabritas da raça Saanen. Para isso, foi testada a seguinte hipótese:

- A exposição de cabritas peri-púbere ao “efeito macho” acelera a ativação do eixo reprodutivo

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da exposição de cabritas peri-púberes ao macho ou fêmea androgenizada sobre o padrão de manifestação de comportamentos relacionados ao cio
- Avaliar o efeito da exposição de cabritas peri-púbere ao macho ou fêmea androgenizada sobre o perfil de estradiol e progesterona na puberdade
- Avaliar o efeito da exposição de cabritas peri-púbere ao macho sobre a expressão do gene kiss1 e dos receptores de kisspetina, estradiol, e progesterona na puberdade.

4. Descrição do Projeto

O projeto foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Animal, Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Campus de Pirassununga, situado a uma altitude de 634 metros, latitude 22° 00' 00" sul e longitude 45° 25' 42" oeste. O projeto foi desenvolvido em dois anos consecutivos, entre Maio e Outubro de 2012 (ano 1) e entre Junho e Setembro de 2013 (ano 2).

4.1. Animais e tratamentos

O projeto envolveu um total de 45 cabritas da raça Saanen. No primeiro ano foram usadas 29 (vinte e nove) cabritas, com idade entre $142,72 \pm 10,61$ dias e $24,9 \pm 4,26$ kg de peso, distribuídas aleatoriamente entre três tratamentos. No segundo ano foram usadas 16 cabritas com $138,37 \pm 3,59$ dias de idade e peso médio de $23,75 \pm 2,43$ kg, distribuídas aleatoriamente entre dois tratamentos.

4.1.1. Manejo dos animais

Todos os grupos experimentais foram alimentados com uma dieta cujo desempenho foi anteriormente comprovado para cabritas peri-púbere no laboratório (BOMFIM, 2012). O alimento sólido foi oferecido sob forma de ração completa, onde o volumoso usado foi a silagem de milho e o concentrado a base de milho grão triturado, óleo de soja, farelo de soja e núcleo mineral em uma relação concentrado/volumoso de 40:60 com base na matéria natural.

Antes do início do experimento todas as cabritas experimentais foram vermifugadas com 0,5mL de Cydectin® (solução injetável de Moxidectina a 1%, da empresa Fort Dodge) e foi realizada adaptação a ração durante uma semana. Durante o período experimental, os animais permaneceram alojados em baias separadas com cobertura, comedouros e bebedouros coletivos e livre acesso ao solário de piso cimentado. Para o acompanhamento do ganho de peso, os animais foram pesados quinzenalmente em uma balança eletrônica.

4.1.2. Tratamentos

As cabritas experimentais foram submetidas aos seguintes tratamentos:

1) grupo controle - sem contato visual e físico com o macho ou fêmea androgenizada; 2) grupo macho - contato com macho sexualmente ativo; 3) grupo fêmea androgenizada - contato com fêmea androgenizada (ano 2) (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Fluxograma dos tratamentos (ano 1)

As cabritas do grupo sujeito à presença do macho foram submetidas a uma exposição (contato) diária ao macho por um período de 60 minutos (ano 1) e 90 minutos (ano 2) do começo ao fim do experimento. Para o efeito, um macho ativo (cujo libido foi previamente testado) foi deslocado diariamente à baia das cabritas permitindo-se a interação entre ambos.

Figura 5. Fluxograma dos tratamentos (ano 2)

As cabritas do grupo fêmea (ano 1) foram submetidas à presença contínua de uma fêmea, previamente tratada com testosterona, durante todo o experimento. A fêmea foi androgenizada recebeu por via intramuscular 300 mg de testosterona por dois dias consecutivos, 300 mg nos dias 5 e 6 após a primeira aplicação, e posteriormente, 300 mg de testosterona a cada 4 dias até ao final do experimento (MELLADO; HERNANDEZ, 1996). O efeito foi comprovado pelo comportamento da fêmea tratada na presença de uma fêmea em cio (figura 6). As cabritas dos grupos controle permaneceram em baia isolada, sem contato visual e físico com o macho ao longo do experimento.

Figura 6. Comportamento da fêmea androgenizada perante fêmea em cio

4.2. Coleta de dados e amostras

Durante o experimento, foi feita a observação dos comportamentos/atividades associados à reprodução e foram coletadas amostras de sangue para dosagem de estradiol e progesterona em todos os grupos experimentais. No ano 2, além dos dados/amostras acima, foram registrados outros comportamentos/atividades e foram coletadas amostras de tecidos para quantificação da expressão de receptores de estradiol (ER), progesterona (PR), kisspeptinas (kiss1R) e do gene kiss1.

4.2.1. Observação do comportamento

Durante o período experimental, foi feita a observação diária dos animais em cada grupo para registro de alterações físicas, comportamentais e atividades associadas ao cio como alteração da coloração da mucosa vulvar, edema da vulva, posição da cauda, montar, deixar-se montar, vocalização característica, deslocar e interagir conforme descrição feita na figura 2. No ano 1, os animais foram observados por 60 minutos das 7h30min às 8h30min e todos os comportamentos/atividades foram registrados em ficha com anotação (1) para registro de ocorrência/alteração ou (0) sem ocorrência/alteração. No ano 2 o registro de comportamentos/atividades foi realizado a cada 5 minutos por 90 minutos das 7h30min às 9h00min e das 16h00min às 17h30min.

4.2.2. Coleta e processamento do sangue

A partir do início do experimento, os animais foram submetidos a coletas de sangue semanais (ano 1) e duas vezes/semana (ano 2) através de punção jugular, utilizando tubos para coleta de sangue a vácuo (9 mL) com heparina e agulha 25 x 8 mm. Durante a coleta, os tubos foram mantidos resfriados, em caixa isotérmica com gelo. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm, à temperatura de 15°C durante 17 minutos para obtenção das amostras de plasma. O plasma recuperado foi armazenado a -20°C em tubo de polipropileno de 5,0 mL para posterior dosagem hormonal.

Tabela 1: Comportamentos e alterações físicas pesquisadas.

Comportamento/ Alteração física	Descrição
Vocalizar	Emitir berros intermitentes, agudos, longos e frequentes.
Posição cauda	Movimentar/agitar a cauda erguida de um lado para outro, repetidas vezes.
Aspecto vulva	Presença de edema, muco e alteração da coloração da mucosa vulvar.
Montar	Saltar sobre outro animal, colocando suas patas dianteiras sobre o outro, com ou sem êxito repetidas vezes.
Deixar montar*	Permanecer parado quando outro animal monta-o.
Deslocar	Movimentar-se
Interagir	Realizar atividade junto a outra(s) cabrita(s)

* O animal é considerado no cio quando permanece parado quando montado por outro animal (conforme descrito por CHEMINEAU et al., 1992)

4.2.3. Coleta de tecidos

Para quantificar a expressão do gene *kiss1* (*kiss1*) e dos receptores de kisspeptina (*Kiss1R*), estradiol (ER) e progesterona (PR), seis animais experimentais (dois antes da exposição ao efeito macho e dois em cada grupo experimental ao final do período da exposição) foram sacrificados para a coleta do hipotálamo, da hipófise e dos ovários. Após insensibilização do animal com aplicação intravenosa de atropina, a eutanásia foi feita por injeção intracardíaca de solução saturada de sulfato de magnésio. Em seguida foi feita a abertura do animal para a coleta de hipotálamo e hipófise e ovários. Os tecidos foram imediatamente acondicionados em tubo de ensaio contendo solução RNAlater® (Invitrogen, Carlsbad, CA) e conservados a -80°C até o processamento.

4.3. Dosagem hormonal

A dosagem do estradiol foi feita pelo kit comercial para determinação de estradiol 17 β (*Enzo® Life Sciences*). As amostras foram submetidas à extração

com éter etílico na proporção de 1:5 e 1 mL de água deionizada, para evitar a interferência de proteínas séricas na dosagem. Depois da extração as amostras foram armazenadas a -20°C até a dosagem do estradiol. Antes da análise, as amostras foram reidratadas à temperatura ambiente com 250 mL de solução tampão fosfato. Foram usados 100 mL da solução recuperada para o teste em microplacas de ELISA, avaliando se sete pontos (0, 0.029, 0.117, 0.468, 1.875, 7.5, e 30 pg/mL) na curva padrão em duplicata. A leitura das placas foi efetuada em um leitor de microplacas de ELISA no comprimento de onda de 405 nm. O limite de detecção do teste foi de 28,5 pg/mL e o coeficiente de variação intra e inter ensaio de 5,1% e 6.1%, respectivamente.

Para a análise de progesterona foi usado o kit comercial Progesterone AccuBind™ Test System (*Monobind Inc., USA*). Foram usados 25 µL de plasma em microplacas de ELISA e foram avaliados 6 pontos (0, 0.3, 2, 5, 15, e 30 ng/mL) na curva padrão em duplicata. A leitura das placas foi efetuada em um leitor de microplacas de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. O limite de detecção do teste foi de 0.105 ng/mL e o coeficiente de variação intra e inter ensaio de 3,1% e 7,0%, respectivamente.

4.4. Quantificação da expressão do gene kiss1, kiss1R, ER e PR

Para a quantificação da expressão do gene Kiss1 (kiss1), receptores de kisspeptinas (kiss1R), estradiol (ER) e progesterona (PR) as amostras dos tecidos coletados foram submetidas à extração do ácido ribonucleico (RNA), síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) através da reação de transcrição reversa (RT) e amplificação das moléculas de interesse através de reações em cadeia da polimerase (PCR) a partir de oligonucleotídeos iniciadores já conhecidos para cada molécula (Tabela 3).

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores. GAPDH (controle endógeno)

Gene		Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' → 3')	Código no GenBank	Fragmento (pb)
GAPDH	Direto	5'-GGTGATGCTGGTGCTGAG-3'	AJ431207	181
	Reverso	5'-TGACAATCTTGAGGGTGTTG-3'		
ERβ	Direto	5'-GCCTCCATGATGATGTCCTTGA-3'	NM_001285688	117
	Reverso	5'-GAGCCGCACTTGGTCGTA-3'		
PR	Direto	5'-TGCAGGACATGACAACAGCA-3'	XM_005689375	123
	Reverso	5'-TTCCGAAAACCTGGCAGTG-3'		
Kiss1	Direto	5'-ACGTGCTGCTTTCTGCGCAGCT-3'	NM_001285710	78
	Reverso	5'-TGGGCGCCACCTTTTCCAAGGT-3'		
Kiss1R	Direto	5'-TACATCCAGCAGGTCTCGGTG-3'	GU142846	71
	Reverso	5'-ACGTACCAGCGGTCCACGCT-3'		

4.4.1. Extração de RNA

Para extração do RNA total dos tecidos estudados foi usado o kit de extração de RNA PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Antes de iniciar a extração, a solução de RNALater (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi descartada. O protocolo seguiu-se com a lise das células na presença de isotiocianato de guanidina, um sal caotrópico capaz de proteger o RNA de RNases endógenas. Após homogeneização, adicionou-se etanol e então a amostra foi processada através de uma coluna contendo membrana de sílica na qual o RNA se liga. As impurezas foram removidas por subseqüentes lavagens. Antes da transcrição reversa (RT), o RNA foi submetido à reação de degradação do DNA para evitar qualquer tipo de contaminação na reação de amplificação do fragmento de interesse na amostra em estudo. Para isso, o DNA foi degradado com 1 U da enzima DNase (Promega) em solução tamponada com 40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgSO₄ e 1 mM CaCl₂ durante 30 minutos a 37°C. Em seguida a DNase foi inativada (2 mM EGTA, pH 8,0) aquecendo o tubo de reação a 65°C durante 10 minutos.

4.4.2. Síntese do cDNA por transcrição reversa (RT)

O RNA total foi reversamente transcrito em um volume final de 20 µL empregando-se a enzima GoScript Reverse Transcriptase (Promega). O

protocolo iniciou-se com a incubação do RNA com 0,5 µg de oligonucleotídeo oligo-dT (Promega) por 5 minutos a 70°C. Em seguida, foi adicionado ao tubo de reação tampão 1X, 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP, 40 unidades de inibidor de RNases e 1,0 µL da enzima transcriptase reversa. A reação foi conduzida a 42°C durante 60 minutos, seguindo por 15 minutos a 70°C e resfriamento a 4°C.

4.4.3. Análise da expressão gênica pela PCR quantitativa (qRT-PCR)

O estudo da amplificação dos genes de interesse foi realizado pela técnica de qRT-PCR. O volume total de reação foi de 20 µL e foi composto de 1,0 µL de cDNA, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 10 µL Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contém todos os componentes necessários para a reação incluindo o fluoróforo Sybr Green I. Este corante fluorescente intercala à dupla-fita de DNA permitindo a quantificação do material genético amplificado. Através da quantificação da intensidade de fluorescência é possível estabelecer o número de cópias de DNA que é proporcional à intensidade de fluorescência obtida. Todas as reações foram realizadas no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em duplicata, tanto para o gene alvo como para o gene controle endógeno.

Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação ou curva de *melting* (Figura 1, capítulo III), que consiste em elevar gradualmente a temperatura (55°C a 95°C) promovendo a desnaturação do DNA, e assim, a redução repentina da emissão de fluorescência pelo Sybr Green. Esse resultado, expresso em graus Celsius, é característico de cada produto de PCR e varia conforme o tamanho e a composição do fragmento amplificado. Sendo assim, permite verificar a especificidade da reação, além de confirmar a ausência de formação de dímeros de *primers* ou qualquer outro produto inespecífico, que poderiam fornecer resultados falsos. Para o cálculo da expressão relativa dos genes alvo foi usada a fórmula $QR 2^{-\Delta\Delta C_T}$.

5. Processamento de dados, Resultados e Discussão

Vide capítulos II e III

6. Referências

- AHIMA, R. S.; OSEI, S. Y. Leptin signaling. **Physiology & Behavior**, Philadelphia, v. 81, n. 2, p. 223-241, 2004.
- AMOAHA, E. A. et al. Breeding season and aspects of reproduction of female goats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 4, p. 723-728, 1996.
- BLASZCZYK, B. et al. Plasma progesterone analysis by a time-resolved fluorescence antibody test to monitor estrous cycle in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 21, n. 1, p. 80-87, 2009.
- BOBES, R. J. et al. Metabolism of progesterone to estrogens and androgens by individual follicles of the goat ovary. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 233-242, 2003.
- BOMFIM, G. F. **Desempenho de cabritas Saanen submetidas a diferentes níveis de energia na dieta: perfil metabólico e hormonal**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2012.
- CARCANGIU, V. et al. Blood melatonin levels relating to the reproductive activity of Sarda does. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 7-13, 2005.
- CASTELLANO, J. M. et al. Kisspeptins: bridging energy homeostasis and reproduction. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1364, p. 129-138, 2010.
- _____. KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: Physiologic roles and putative physiopathological implications. **Peptides**, New York, v. 30, n. 1, p. 139-145, 2009.
- CHALIVOIX, S. et al. Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. **Journal of Neuroendocrinology**, Chichester, v. 22, n. 2, p. 110-118, 2010.
- CHEMINEAU, P. et al. Neuroendocrine and genetic control of seasonal reproduction in sheep and goats. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, p. 42-49, 2010.
- _____. Seasonality of reproduction in mammals: Intimate regulatory mechanisms and practical implications. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p. 40-47, 2008.
- CHENTOUF, M.; BISTER, J. L.; BOULANOUAR, B. Reproduction characteristics of North Moroccan indigenous goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 98, n. 1-3, p. 185-188, 2011.

CONLEY, A. J.; BIRD, I. M. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the Delta 5 and Delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 56, n. 4, p. 789-799, 1997.

CRUZ, J. F.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in Anglo-Nubian and Saanen goats raised in tropical climate. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 37, n. 5, p. 395-402, 2005.

DANIEL, J. A. et al. Hypothalamic integration of nutrient status and reproduction in the sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 48, p. 44-52, 2013.

DE ROUX, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 19, p. 10972-10976, 2003.

DE TASSIGNY, X. D. A.; COLLEDGE, W. H. The role of kisspeptin signaling in reproduction. **Physiology**, Bethesda, v. 25, n. 4, p. 207-217, 2010.

DELGADILLO, J. A. Environmental and social cues can be used in combination to develop sustainable breeding techniques for goat reproduction in the subtropics. **Animal**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 74-81, 2011.

DELGADILLO, J. A. et al. The 'male effect' in sheep and goats-Revisiting the dogmas. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 200, n. 2, p. 304-314, 2009.

_____. The ovulatory response of anoestrous goats exposed to the male effect in the subtropics is unrelated to their follicular diameter at male exposure. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 4, p. 687-691, 2011.

DEVENDRA, C.; COOP, I. E. Ecology and distribution. In: COOP, I. E. (Ed.). **Sheep and goat production**. London: Elsevier Publishers, 1982. p. 1-14. (World Animal Science C1).

EBLING, F. J. P. The neuroendocrine timing of puberty. **Reproduction**, Bristol, v. 129, n. 6, p. 675-683, 2005.

_____. Photoperiodic regulation of puberty in seasonal species. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v. 324, n. 1-2, 2010.

EVANS, N. P. et al. Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 138, n. 12, p. 5408-5414, 1997.

- EVANS, A. C. O.; O'DOHERTY, J. V. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2001.
- FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M. T.; LEBOEUF, B. Reproductive cycle of goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, n. 3-4, p. 211-219, 2011.
- FIOL, C.; QUINTANS, G.; UNGERFELD, R. Response to biostimulation in peri-puberal beef heifers: influence of male-female proximity and heifer's initial body weight. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 74, n. 4, p. 569-575, 2010.
- FLANAGAN, K. A.; WEBB, W.; STOWERS, L. Analysis of male pheromones that accelerate female reproductive organ development. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e16660, 2011.
- FORTUNE, J. E.; YANG, M. Y.; MURUVI, W. The earliest stages of follicular development: follicle formation and activation. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, Nottingham, v. 67, p. 203-216, 2010.
- FOSTER, D. L.; JACKSON, L. M.; PADMANABHAN, V. Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 254-255, p. 109-119, 2006.
- FRANCESCHINI, I. et al. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. **Neuroscience Letters**, Shannon, v. 401, n. 3, p. 225-230, 2006.
- FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomy and physiology of farm animals**. 7. ed. Malden: Wiley-Blackwell, 2009.
- FREITAS, V. J. F. et al. Puberty in anglo-nubian and saanen female kids raised in the semi-arid of north-eastern Brazil. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 167-172, 2004.
- GAAFAR, K. M.; GABR, M. K.; TELEB, D. F. The hormonal profile during estrous cycle and gestation in Damascus goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 57, p. 85-93. 2005.
- GELEZ, H.; FABRE-NYS, C. The "male effect" in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. **Hormones and Behavior**, Maryland Heights, v. 46, n. 3, p. 257-271, 2004.
- GIANETTI, E.; SEMINARA, S. Kisspeptin and KISS1R: a critical pathway in the reproductive system. **Reproduction**, Bristol, v. 136, n. 3, p. 295-301, 2008.
- HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. 6. ed. Massachusetts, USA: A Lea & Febiger Book, 1993.

HASHIZUME, T. et al. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 37-41, 2010.

HAWKEN, P. A. R.; BEARD, A. P. Ram novelty and the duration of ram exposure affects the distribution of mating in ewes exposed to rams during the transition into the breeding season. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 111, n. 2-4, 2009.

HELENA, C. V. V.; SZAWKA, R. E.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Noradrenaline involvement in the negative-feedback effects of ovarian steroids on luteinising hormone secretion. **Journal of Neuroendocrinology**, Chichester, v. 21, n. 10, p. 805-812, 2009.

HERBISON, A. E.; PAPE, J. R. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. **Frontiers in Neuroendocrinology**, Maryland Heights, v. 22, n. 4, p. 292-308, 2001.

KAKUMA, Y. et al. Androgen induces production of male effect pheromone in female goats. **Journal of Reproduction and Development**, Sendai, v. 53, n. 4, p. 829-834, 2007.

KINOSHITA, M. et al. A rat model for the energetic regulation of gonadotropin secretion: role of the glucose-sensing mechanism in the brain. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 25, n. 1, p. 109-220, 2003.

KELLY, M. J.; QIU, J. Estrogen signaling in hypothalamic circuits controlling reproduction. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1364, p. 44-52, 2010.

KHANUM, S. A.; HUSSAN, M.; KAUSAR, R. Progesterone and estradiol profiles during oestrous cycle and gestation in Dwarf goats (*Capra Hircus*). **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 28, n. 1, p. 1-4, 2008

KITAHASHI, T.; PARHAR, I. S. Comparative aspects of kisspeptin gene regulation. **General and Comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v. 181, p. 197-202, 2013.

LUBAHN, D. B. et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 23, p. 11162-11166, 1993.

MARTIN, G. B.; RODGER, J.; BLACHE, D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**, Clayton, v. 16, n. 4, p. 491-501, 2004.

MELLADO, M.; HERNANDEZ, J. R. Ability of androgenized goat wethers and does to induce estrus in goats under extensive conditions during anestrus and

breeding seasons. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 37-42, 1996.

MUCCIOLI, G. et al. Beyond the metabolic role of ghrelin: a new player in the regulation of reproductive function. **Peptides**, Philadelphia, v. 32, n. 12, p. 2514-2521, 2011.

MURATA, K. et al. Modulation of gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity by the pheromone in small ruminants. **Journal of Neuroendocrinology**, Chichester, v. 21, n. 4, p. 346-350, 2009.

MURATA, K. et al. Effects of brief exposure of male pheromone on multiple-unit activity at close proximity to kisspeptin neurons in the goat arcuate nucleus. **Journal of Reproduction and Development**, Sendai, v. 57, n. 2, p. 197-202, 2011.

NESTOR, C. C. et al. Evidence that orphanin fq mediates progesterone negative feedback in the ewe. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 154, n. 11, p. 4249-4258, 2013.

NOAKES, D. E.; PARKINSON, T. J.; ENGLAND, G. C. W. **Arthur's veterinary reproduction and obstetrics**. 8. ed. Amsterdam: Elsevier Limited, 2001.

OKAMURA, H. et al. Male effect pheromone tickles the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator. **Journal of Neuroendocrinology**, Chichester, v. 22, n. 7, p. 825-832, 2010.

OKAMURA, H.; YAMAMURA, T.; WAKABAYASHI, Y. Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: an overview of kisspeptin research in domestic animals. **Animal Science Journal**, Richmond, v. 84, n. 5, p. 369-381, 2013.

PEDRAM, A. et al. Membrane-localized estrogen receptor alpha is required for normal organ development and function. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 29, n. 4, p. 482-490, 2014.

POPA, S. M.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 70, p. 213-218, 2008.

QUENNEL, J. H. et al. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 150, n. 6, p. 2805-2812, 2009.

REKWOT, P. I. et al. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 65, n. 3-4, p. 157-170, 2001.

ROA, J. et al. Metabolic control of puberty onset: New players, new mechanisms. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v. 324, n. 1-2, 2010.

ROA, J.; NAVARRO, V. M.; TENA-SEMPERE, M. Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 85, n. 4, p. 650-660, 2011.

ROLLAND, A. V.; MOENTER, S. M. Regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by glucose. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, Kidlington, v. 22, n. 11, p. 443-449, 2011.

SCARAMUZZI, R. J.; MARTIN, G. B. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p. 129-136, 2008.

SEMINARA, S. B. et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 349, n. 17, p. 1614-1627, 2003.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. Washington: University Research & Technology Park: Current Conceptions, Inc., 2003. p. 363-368.

SHAHAB, M. et al. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 6, p. 2129-2134, 2005.

SKINNER, D. C.; CARATY, A.; ALLINGHAM, R. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: No colocalization with gonadotropin-releasing neurons. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 573-579, 2001.

SMITH, M. C. The Reproductive anatomy and physiology of the female goat. Michigan, USA: W.B. Saunders Company, 1986.

SMITH, J. T.; CLARKE, L. J. Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 324, n. 1-2, p. 102-109, 2010.

SMITH, J. T. et al. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 148, n. 3, p. 1150-1157, 2007.

_____. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 150, n. 12, p. 5530-5538, 2009.

SUNDERLAND, S. J. et al. Effect of photoperiod before and after birth on puberty in ewe lambs. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 53, n. 5, p. 1178-1182, 1995.

TENA-SEMPERE, M. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. **Neuroendocrinology**, Chichester, v. 86, n. 3, p. 229-241, 2007.

_____. Kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and physiopathological implications. **Annales d'Endocrinologie**, Paris, v. 71, n. 3, p. 201-202, 2010.

THIERY, J.-C. et al. Concentrations of estradiol in ewe cerebrospinal fluid are modulated by photoperiod through pineal-dependent mechanisms. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 41, n. 4, p. 306-312, 2006.

THOMAS, M. P.; POTTER, B. V. L. The structural biology of oestrogen metabolism. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 137, p. 27-49, 2013.

VALASI, I. et al. Management of pre-pubertal small ruminants: physiological basis and clinical approach. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 130, n. 3-4, p. 126-134, 2012.

VAN, L. T. Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 137, p. 176-182, 2013.

WALKDEN-BROWN, S. W.; RESTALL, B. J. Environmental and social factors affecting reproduction. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 6., 1996, Beijing. **Proceedings...** Beijing: International Academic Publishers, 2: p. 762-775. 2006.

ZARAZAGA, L. A. et al. Melatonin concentrations in the two jugular veins, and relationship with the seasonal reproductive activity in goats. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 74, n. 2, p. 221-228, 2010.

CAPÍTULO II. PERFIL COMPORTAMENTAL E HORMONAL DE CABRITAS SAANEN SUBMETIDAS AO EFEITO MACHO NO PERÍODO PERI-PÚBERE

RESUMO

O efeito macho é mais usado em fêmeas adultas fora da época reprodutiva, entretanto, alguns autores reportaram seu potencial na aceleração da puberdade em ratos e suínos. O presente trabalho tinha como objetivo avaliar o perfil de estradiol, de progesterona e os comportamentos associados ao cio, em cabritas submetidas à estimulação da atividade cíclica ovariana através do efeito macho durante o período peri-púbere. Um total de 29 cabritas de raça Saanen, com $142,72 \pm 10,61$ dias idade e peso médio de $24,9 \pm 4,26$ kg foram distribuídas aleatoriamente entre três tratamentos: exposição ao macho sexualmente ativo (grupo macho), exposição à fêmea androgenizada (grupo fêmea) e controle (grupo controle). Registros diários de comportamentos associados ao cio e coletas de sangue semanais para dosagem de estradiol e progesterona foram realizadas de Maio à Outubro. Os resultados comportamentais das cabritas mostram que os cios se concentraram entre os meses de Junho e Julho. As cabritas dos grupos macho e fêmea apresentaram maior frequência de comportamentos relacionados ao cio que as cabritas do grupo controle. Houve efeito do grupo na concentração de estradiol e progesterona, sendo que o grupo macho registrou médias de estradiol e progesterona superiores aos grupos fêmea e controle. Neste estudo, a frequência dos comportamentos relacionados ao cio, os níveis de progesterona e estrógeno das cabritas dos grupos macho são semelhantes ao perfil das cabras adultas. Conjuntamente, estes resultados indicam que o efeito macho acelerou a atividade cíclica ovariana e o comportamento de cio de cabritas peri-púberes. Assim, o macho ativo e a fêmea androgenizada podem ser usados para estimular a atividade cíclica em cabritas Saanen no período peri-púbere.

1. Introdução

A puberdade representa o culminar de uma série de eventos endócrinos que levam o animal a aquisição da competência reprodutiva (SENGER, 2003) assim, o conhecimento dos mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade e no desenvolvimento e maturação do eixo reprodutivo é imprescindível para um manejo reprodutivo adequado.

Estudos recentes indicam que o processo da puberdade é regulado por uma complexa rede de genes e vias neuronais que se interpõem e interagem (EBLING, 2005; FOSTER; JACKSON; PADMANABHAN, 2006; OJEDA et al., 2010). Nesse sentido, a síntese dos esteróides sexuais pelas gônadas é fundamental para maturação do eixo reprodutivo e desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (SENGER, 2003). De fato, o estradiol estimula a ocorrência da primeira onda de GnRH e LH que antecede a primeira ovulação na puberdade (FOSTER; JACKSON; PADMANABHAN, 2006; VALASI et al., 2012) sendo necessário para o normal desenvolvimento pós-natal do útero, ovários e glândula mamária (LUBAHN et al., 1993; PEDRAM et al., 2014).

Por outro lado, fatores ambientais (SUNDERLAND et al., 1995; MARTIN et al., 2004; ROLLAND; SCARAMUZZI; MARTIN, 2008; CASTELLANO et al., 2009; EBLING, 2010; MOENTER, 2011) e a interação social (REKWOT et al., 2001; GELEZ; FABRE-NYS, 2004; FIOL; QUINTANS; UNGERFELD, 2010) influenciam a idade em que a fêmea alcança a puberdade. A interação macho e fêmea, fenômeno designado “efeito macho” é utilizado em espécies sazonais como a ovelha e a cabra para estimular a atividade ovariana durante o período de inatividade sexual (GELEZ; FABRE-NYS, 2004; SCARAMUZZI; MARTIN, 2008; DELGADILLO, 2011; DELGADILLO et al., 2011) e para a sincronização de cios em fêmeas cíclicas (DELGADILLO et al., 2009).

Apesar do efeito macho ser mais conhecido na reativação da atividade cíclica ovariana em fêmeas adultas, alguns autores verificaram seu potencial na aceleração da puberdade principalmente em ratos (FLANAGAN et al., 2011) e suínos (EVANS; O'DOHERTY, 2001). Aparentemente, o efeito macho influencia o padrão de síntese e liberação de GnRH, elo essencial no desencadeamento

da puberdade e no controle reprodutivo pós-púbere (FOSTER; JACKSON; PADMANABHAN, 2006). Nas fêmeas em anestro, a resposta imediata ao efeito macho é a elevação de níveis de LH seguida de ovulação (GELEZ; FABRE-NYS, 2004). Assim, a utilização do efeito macho pode ser usada como estratégia de manejo para acelerar a puberdade e aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho, em particular em espécies sazonais (SCARAMUZZI; MARTIN, 2008; DELGADILLO, 2011).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito macho (macho sexualmente ativo ou fêmea androgenizada) no comportamento reprodutivo e perfil dos hormônios estradiol e progesterona em cabritas Saanen peri-púberes.

2. Material e métodos

2.1. Animais e tratamentos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Animal, Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Campus de Pirassununga, situado a uma altitude de 634 metros, latitude 22° 00' 00" sul e longitude 45° 25' 42" oeste, entre Maio e Outubro 2012.

Um total de vinte e nove cabritas da raça Saanen foram acompanhadas desde o nascimento. A partir de uma semana antes do início do experimento, as cabritas foram alimentadas com uma dieta a base de silagem de milho, grão de milho moído, óleo de soja e sais minerais. Aos $142,72 \pm 10,61$ dias idade e peso médio de $24,9 \pm 4,26$ kg as cabritas peri-púberes foram distribuídas aleatoriamente entre 3 tratamentos: 1) grupo macho - contato com macho sexualmente ativo; 2) grupo fêmea - contato com fêmea androgenizada; 3) grupo controle - sem contato visual e físico com o macho ou fêmea androgenizada.

As cabritas do grupo macho foram submetidas a uma exposição (contato) diária ao macho por um período de 60 minutos das 7h30min às 8h30min durante todo o experimento. Este tempo de exposição foi adotado para permitir um

contato vigiado entre o macho e as cabritas para evitar a cobertura. Assim, um macho ativo foi deslocado diariamente à baia das cabritas permitindo que houvesse contato físico e interação entre ambos.

As cabritas do grupo fêmea foram submetidas à presença contínua de uma fêmea, previamente tratada com testosterona, durante todo o experimento. A fêmea que foi androgenizada recebeu por via intramuscular 300 mg de testosterona por dois dias consecutivos, 300 mg nos dias 5 e 6 após a primeira aplicação, e posteriormente, 300 mg de testosterona a cada 4 dias até ao final do experimento (MELLADO; HERNANDEZ, 1996).

As cabritas do grupo controle permaneceram em baia isolada sem contato visual e físico com o macho ou fêmea androgenizada durante o período experimental.

2.2. Coleta de dados e amostras

O período experimental estendeu-se entre maio e outubro. Durante este período foram feitas as observações diárias dos animais de cada grupo por 60 minutos. Para cada grupo experimental foram registradas as alterações físicas e comportamentais associados ao cio, como aspeto e coloração da vulva, estado da cauda, montar ou deixar-se montar e vocalização (MONDAL; RAJKHOWA; PRAKASHI, 2006; BASZCZYK et al., 2009; ROELOFS, et al., 2005). Todos os comportamentos ou características físicas são descritos na Tabela 1 e foram registrados em ficha com anotação (1) para registro de ocorrência/alteração e (0) sem ocorrência/alteração.

Entre maio e outubro, os animais também foram submetidos a coletas de sangue semanais através de punção jugular, utilizando tubos para coleta de sangue a vácuo (9 mL) com heparina e agulha 25 x 8 mm. Durante a coleta, os tubos foram mantidos resfriados, em caixa isotérmica com gelo, até que fossem levados ao laboratório. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm, à temperatura de 15°C durante 17 minutos para obtenção das amostras de plasma. O plasma recuperado foi armazenado a -20°C em tubo de polipropileno de 5,0 mL para posterior dosagem hormonal.

Tabela 1: Comportamentos e alterações físicas pesquisadas.

Comportamento/ Alteração física	Descrição
Vocalizar	Emitir berros intermitentes, agudos, longos e frequentes.
Posição cauda	Movimentar/agitar a cauda erguida de um lado para outro, repetidas vezes.
Aspecto vulva	Presença de edema, muco e alteração da coloração da mucosa vulvar.
Montar	Saltar sobre outro animal, colocando suas patas dianteiras sobre o outro, com ou sem êxito repetidas vezes.
Deixar montar*	Permanecer parada quando outro animal a monta.

* O animal é considerado no cio quando permanece parado quando montado por outro animal (conforme descrito por CHEMINEAU et al., 1992)

2.3. Dosagem hormonal

A dosagem do estradiol foi feita pelo kit comercial para determinação de estradiol 17 β (*Enzo Life Sciences INT'L, Inc, USA*). As amostras foram submetidas à extração com éter etílico e água deionizada na proporção de 1:5. Depois da extração as amostras foram armazenadas a -20°C até a dosagem do estradiol. Para análise, as amostras foram reidratadas à temperatura ambiente com 250 μ L de solução tampão fosfato, 100 μ L desta solução foram adicionados as microplacas. A curva padrão utilizada tinha as seguintes concentrações 0, 0.029, 0.117, 0.468, 1.875, 7.5, e 30 pg/mL. A leitura das placas foi efetuada em um leitor de microplacas de ELISA no comprimento de onda de 405 nm. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 5,1% e 6.1%, respectivamente.

Para a análise de progesterona foi usado o kit comercial Progesterone AccuBind™ Test System (*Monobind Inc., USA*). Foram usados 25 μ L de plasma nas microplacas e foram avaliados 6 pontos (0, 0.3, 2, 5, 15, e 30 ng/mL) na curva padrão. A leitura das placas foi efetuada em um leitor de microplacas de

ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 3,1% e 7,0%, respectivamente.

2.4. Análise estatística

Após verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (*Proc Univariate*), os dados do comportamento e de dosagem hormonal foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento GLM do programa *Statistical Analysis System* (SAS) para medidas repetidas no tempo. Para cada parâmetro em estudo foram analisados o efeito do tratamento, do tempo (data de coleta) e da interação tratamento*coleta. Quando houve significância, as médias foram comparadas pelo teste de Fisher. Foi considerado um nível de significância de $P \leq 0,05$.

3. Resultados e discussão

Na tabela 2 apresenta-se o resumo de observações de cio dos três grupos experimentais durante o experimento. As cabritas dos grupos macho e fêmea apresentaram maior número de cios observados quando comparados ao grupo controle o que indica um período de ciclicidade maior nestes grupos. Entretanto, o intervalo entre as observações comportamentais de cio foi mais curto para as cabritas do grupo macho (17 ± 3 dias) comparadas aos grupos fêmea e controle (respectivamente, 21 ± 2 dias e 21 ± 6 dias).

Tabela 2: Resumo das observações comportamentais de cio* das cabritas dos grupos macho, fêmea e controle mensuradas entre 29/5 e 9/10.

Grupos	Cabritas em cio	Número de cios observados	Número de cios por cabrita	Intervalo entre cios
Macho	7 (70%)	56	8,0	17 ± 3 dias
Fêmea	7 (70%)	40	5,7	21 ± 2 dias
Controle	8 (88%)	11	1,4	21 ± 6 dias

* O animal é considerado no cio quando permanece parado quando montado por outro animal (conforme descrito por CHEMINEAU et al., 1992).

As cabritas dos grupos macho e fêmea apresentaram frequências semelhantes para a maioria dos comportamentos estudados (Figura 1). Porém,

quando comparado ao grupo controle, as cabritas dos grupos macho e fêmea apresentaram alteração no aspecto da vulva e maior frequência dos comportamentos deixar montar ($p \leq 0,05$), além de tendência para alteração na posição da cauda e vocalizar ($p \leq 0,10$). Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para o comportamento montar.

De modo geral, a interação social aumentou a frequência de comportamentos associados ao cio. Outros autores também reportaram que o efeito de machos ativos ou fêmeas androgenizadas alteram o perfil comportamental de cabras adultas durante e fora da época reprodutiva (MELLADO; HERNANDÉZ, 1996; RIVAS-MUÑOZ, et al., 2007), cabritas pós-púberes (LUNA-OROZCO et al., 2008; FERNÁNDEZ et al., 2011) e novilhas peri-púberes (FIOL; QUINTANS; UNGERFELD, 2010).

Figura 1: Número de comportamentos observados em cabritas Saanen expostas ao macho (grupo macho), fêmea androgenizada (grupo fêmea) e controle (grupo controle) entre maio e outubro. Grupos que possuem médias com letras diferentes, no mesmo comportamento, diferem estatisticamente entre si.

O perfil da somatória dos comportamentos estudados (Figura 2) mostra que os cios começam em maio e se concentraram entre os meses de Junho e Julho. Estes dados, confirmam a sincronização dos primeiros cios no período reprodutivo específico da espécie em determinada região geográfica (SUNDERLAND et al., 1995; DELGADILLO, 2011).

Figura 2: Número de observações comportamentais de cio (média $\pm$ epm) e concentrações de progesterona e estradiol (média $\pm$ epm) de todas as cabritas experimentais mensuradas entre 29/5 e 9/10. Médias com letras diferentes, diferem estatisticamente entre si.

Além disso, as concentrações de progesterona e estradiol também variaram ao longo do experimento em função da sazonalidade reprodutiva (MARTIN et al., 2004), apresentando no presente estudo, concentrações hormonais significativamente maiores entre junho e julho quando comparado à agosto, setembro e outubro (Figura 2).

Os níveis de estradiol encontrados neste estudo são semelhantes aos níveis reportados na literatura. Embora muito variáveis, os valores médios de estradiol reportados na literatura para cabras variam de 6 – 14 pg/mL durante a fase lútea, 30 – 90 pg/mL durante a fase folicular (BLASZCZYK; UDALA; GACZARZEWICZ, 2004; GAAFAR; GABR; TELEB, 2005; KHANUM; HUSSAN; KAUSAR, 2008; CHEMINEAU et al., 2010) e abaixo de 8 pg/mL durante o anestro (CHEMINEAU et al., 2010).

Do mesmo modo, mesmo considerando a grande variação entre as diferentes fases do ciclo, as médias de progesterona nas cabritas Saanen mensuradas neste estudo se assemelham as médias citadas na literatura, (SMITH, 1986; GAAFAR; GABR; TELEB, 2005; KHANUM; HUSSAN; KAUSAR, 2008; BASZCZYK et al., 2009).

Na Figura 3 observa-se que a maioria cabritas dos grupos macho e fêmea começaram a apresentar simultaneamente comportamento sexual, característico de cio. No caso do grupo controle, o número de cios observados simultaneamente é bem menor. Porém, as cabritas dos grupo fêmea apresentaram número intermediário de comportamentos simultâneo de cio. Outros autores (MELLADO; HERNANDÉZ, 1996) já haviam relatado que o comportamento de cios havia sido influenciado pela categoria do efeito macho.

Conjuntamente, os resultados comportamentais indicam que a fêmea androgenizada foi eficiente na estimulação do cio quando comparado ao grupo controle ($p>0,05$). Resultado semelhante foi reportado em cabras adultas durante e fora da época reprodutiva (MELLADO; HERNANDÉZ, 1996). Estes resultados também confirmam que o contato prévio com o macho não é fundamental para a resposta ao efeito do macho ativo ou fêmea androgenizada (LUNA-OROZCO et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2011).

Estes resultados resultam do fato de as cabritas dos grupos macho e fêmea terem apresentado número de ciclos semelhantes e bem mais numerosos que o grupo controle (Tabela 2). Isto indica que o uso de efeito macho ativo e fêmea androgenizada melhora a ciclicidade na primeira estação reprodutiva das cabritas, o que pode permitir que os animais, ao alcancem o peso ideal para a reprodução, possam ser cobertas ainda nessa estação reprodutiva.

Figura 3: Perfil comportamental de cabritas Saanen expostas ao macho (grupo macho), fêmea androgenizada (grupo fêmea) e controle entre maio e outubro. Somatória de atividades da semana iniciada na data indicada.

Além disso, houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos nas médias de estradiol (Figura 4), sendo que o grupo macho apresentou média de estradiol significativamente superior ao grupo controle. Assim, os resultados comportamentais e de estradiol sugerem que o grupo macho apresentou melhor atividade cíclica ovariana quando comparado ao grupo controle.

Deste modo, nossos resultados se assemelham a de outros autores usando o efeito macho para estimular a ciclicidade de cabras adultas, cabritas pós-pubere e novilhas (MELLADO; HERNÁNDEZ, 1996; RIVAS-MUÑOZ, et al., 2007; LUNA-OROZCO et al., 2008; FERNÁNDEZ et al., 2011; FIOL; QUINTANS; UNGERFELD, 2010).

Alguns autores argumentam que o desenvolvimento folicular na espécie caprina é caracterizado pela ocorrência de quatro ou mais ondas foliculares (Bobes et al., 2003; Cruz et al., 2005). Este fato pode explicar porque não houve interação grupo*coleta ao longo período experimental apesar da variação observada.

Figura 4: Concentração (média $\pm$ epm) de progesterona (ng/mL) e estradiol (pg/mL) mensuradas em cabritas Saanen dos grupos Macho, Fêmea e Controle entre 29/5 e 14/8. Grupos que possuem médias hormonais com letras diferentes, diferem estatisticamente entre si.

Em relação a progesterona, as cabritas do grupo macho apresentaram média significativamente maior que as cabritas do grupo fêmea, sendo que as cabritas do grupo fêmea apresentaram média de progesterona maior que as cabritas controle (Figura 4). Esta diferença de liberação de progesterona entre os grupos macho e fêmea, é contrária a argumentação de alguns autores, que afirmam não haver diferenças entre macho e fêmea androgenizada (MELLADO; HERNÁNDEZ, 1996). Mas, reforça a argumentação de outros autores (RIVAS-MUÑOZ, et al., 2007; BEDOS et al., 2010), que afirmam haver diferença significativa entre exposição contínua e descontínua ao efeito macho.

Embora a progesterona tenha sido influenciada significativamente pelos tratamentos, durante o ciclo estral as cabritas dos diferentes grupos experimentais apresentam perfis hormonais semelhantes (Figura 5). Em geral, o

efeito significativo dos grupos macho e fêmea androgenizada está associado ao número de cabras que entraram em cio.

Figura 5: Concentração (média $\pm$ epm) de progesterona (ng/mL) e estradiol (pg/mL) em cabritas dos grupos macho, fêmea e controle observadas em cio comportamental (dia 0) a cada de 14, 21 e 28 dias.

Além disso, os dados de perfil hormonal das cabritas observadas em cio (Figura 5) confirmam, como já relatado na Tabela 2, que houve uma variação na duração de ciclos entre os grupos experimentais.

Ciclos mais curtos (17 ± 3 dias) foram observados no grupo macho e ciclos mais longos (até 21 ± 6 dias) foram observados nos grupos fêmea e controle. Essa variação na duração de ciclos entre fêmeas submetidas a diferentes formas de efeito macho não foi reportada em trabalhos anteriores realizados com cabras adultas, cabritas pós-púbere e novilhas (MELLADO; HERNÁNDEZ, 1996; RIVAS-MUÑOZ, et al., 2007; LUNA-OROZCO et al., 2008; FERNÁNDEZ et al., 2011; FIOL; QUINTANS; UNGERFELD, 2010). Contudo, há referência da ocorrência de alta frequência ciclos curtos na espécie caprina quando a ovulação é induzida (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011).

Conjuntamente, os níveis de estradiol e progesterona estão de acordo com as observações dos comportamentos associados ao cio, em particular ao comportamento deixar montar. Nesse sentido, os grupos submetidos ao efeito macho (grupos macho e fêmea) registraram frequências de comportamentos associados ao cio e níveis hormonais típicos de animais que apresentaram maior ciclicidade e maior número de cios que o grupo controle.

4. Conclusões

Os resultados deste estudo indicam que a interação social através do efeito macho (grupos macho e fêmea) alterou o perfil de comportamentos associados ao cio, e, o perfil de estradiol e progesterona em cabritas Saanen no período peri-púbere. Assim, o efeito macho pode ser usado para estimular a atividade cíclica em cabritas Saanen no período peri-púbere.

5. Referências

BEDOS, M. et al. Four hours of daily contact with sexually active males is sufficient to induce fertile ovulation in anestrus goats. **Hormones and Behavior**, Maryland Heights, v. 58, n. 3, p. 473–7, 2010.

BLASZCZYK, B.; UDALA, J.; GACZARZEWICZ, D. Changes in estradiol, progesterone, melatonin, prolactin and thyroxine concentrations in blood plasma of goats following induced estrus in and outside the natural breeding season. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 51, p. 209-219. 2004.

BLASZCZYK, B. et al. Plasma progesterone analysis by a time-resolved fluorescence antibody test to monitor estrous cycle in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 21, p. 80-87, 2009.

BOBES, R. et al. Metabolism of progesterone to estrogens and androgens by individual follicles of the goat ovary. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 233-242, 2003.

CHEMINEAU, P. et al. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 8, p. 299-312, 1992.

CRUZ, J. F.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in anglo-nubian and saanen goats raised in tropical climate. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 37, p. 395–402, 2005.

DELGADILLO, J. A. Environmental and social cues can be used in combination to develop sustainable breeding techniques for goat reproduction in the subtropics. **Animal: An International Journal of Animal Bioscience**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 74–81. 2011.

DELGADILLO, J. A. et al. The ovulatory response of anoestrous goats exposed to the male effect in the subtropics is unrelated to their follicular diameter at male exposure. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 4, p. 687–91, 2011.

DELGADILLO, J. A. et al. The “male effect” in sheep and goats: revisiting the dogmas. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 200, n. 2, p. 304–314, 2009.

DELGADILLO, J. A. et al. Male goat vocalizations stimulate the estrous behavior and LH secretion in anestrus goats that have been previously exposed to bucks. **Hormones and Behavior**, Maryland Heights v. 62, n. 4, p. 525–30, 2012.

EBLING, F. J. P. The neuroendocrine timing of puberty. **Reproduction (Cambridge, England)**, Cambridge, v. 129, n. 6, p. 675-83, 2005.

EBLING, F. J. P. Photoperiodic regulation of puberty in seasonal species. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v. 324, n. (1-2), p. 95-101, 2010.

EVANS, A. C.; O'DOHERTY, J. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2001.

FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M. T.; LEBOEUF, B. Reproductive cycle of goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, n. 3-4, p. 211-219, 2011.

FERNÁNDEZ, I. G. et al. Lack of sexual experience does not reduce the responses of LH, estrus or fertility in anestrus goats exposed to sexually active males. **Hormones and Behavior**, Maryland Heights, v. 60, n. 5, p. 484-8, 2011.

FIOL, C.; QUINTANS, G.; UNGERFELD, R. Response to biostimulation in peripuberal beef heifers: influence of male-female proximity and heifer's initial body weight. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 74, n. 4, p. 569-75, 2010.

FLANAGAN, K. A.; WEBB, W.; STOWERS, L. Analysis of male pheromones that accelerate female reproductive organ development. **PloS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e16660, 2011.

FOSTER, D. L.; JACKSON, L. M.; PADMANABHAN, V. Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v. 254-255, p. 109-19, 2006.

GAAFAR, K. M.; GABR, M. K.; TELEB, D. F. The hormonal profile during estrous cycle and gestation in Damascus goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 57, p. 85-93. 2005.

GELEZ, H.; FABRE-NYS, C. The "male effect" in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. **Hormones and Behavior**, Maryland Heights, v. 46, n. 3, p. 257-71, 2004.

KHANUM, S. A.; HUSSAN, M.; KAUSAR, R. Progesterone and estradiol profiles during oestrous cycle and gestation in Dwarf goats (*Capra Hircus*). **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 28, p. 1-4, 2008

LUNA-OROZCO, J. R. et al. Parity of female goats does not influence their estrous and ovulatory responses to the male effect. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 106, p. 352-360, 2008.

MARTIN, G. B. et al. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 231-45, 2004.

MELLADO, M.; HERNÁNDEZ, J. R. Ability of androgenized goat wethers and does to induce estrus in goats under extensive conditions during anestrus and breeding seasons. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 37–42, 1996.

MONDAL, M.; RAJKHOWA, C.; PRAKASHI, B. S. Relationship of plasma estradiol 17 β , total estrogen, and progesterone to estrus behavior in mithun (*Bos frontalis*) cow. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 66, p. 1392-1396, 2006.

OJEDA, S. R. et al. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v. 324, n. 1-2, p. 3-11, 2010.

REKWOT, P. I. et al. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 65, n. 3-4, p. 157–70, 2001.

ROELOFS, J. et al. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 74, p. 327-344, 2010.

ROELOFS, J. et al. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 63, p. 1366-1377, 2005.

ROLLAND, A. V.; MOENTER, S. M. Regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by glucose. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, Kidlington, v. 22, n. 11, p. 6. 2011

RIVAS-MUÑOZ, R. et al. Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 5, p. 1257–63, 2007.

SCARAMUZZI, R. J.; MARTIN, G. B. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, suppl. 2, p. 129–36, 2008.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Second Ed. Washington University Research & Technology Park: Current Conceptions, Inc., p. 363-368. 2003.

SUNDERLAND, S. J. et al. Effect of photoperiod before and after birth on puberty in ewe lambs. **Biology of Reproduction**, 53(5), 1178–82. 1995.

VALASI, I. et al. Management of pre-pubertal small ruminants: physiological basis and clinical approach. **Animal Reproduction Science**, 130(3-4), 126–34. 2012.

VÉLIZ F.G. et al. Maintaining contact with bucks does not induce refractoriness to the male effect in seasonally anestrous female goats. **Animal reproduction science**, v. 92, n. 3-4, p. 300–9, maio 2006.

CAPÍTULO III. EXPRESSÃO DE KISS1, KISS1R, ER E PR EM CABRITAS SAANEN SUBMETIDAS AO EFEITO MACHO NO PERÍODO PERI-PÚBERE

RESUMO

O papel da intermediação das kisspeptinas na regulação da puberdade e da reprodução em geral incluindo a intermediação da ação dos fatores ambientais e sociais já é consensual. Contudo, trabalhos associando a ação dos fatores sociais, em particular o efeito macho, no perfil hormonal e expressão de kisspeptinas no eixo reprodutivo em cabritas peri-púberes são escassos. O presente trabalho tinha como objetivo estudar o perfil de estradiol e progesterona e a expressão do gene kiss1 (kiss1), receptor de kisspeptinas (kiss1R), receptor de estradiol (ER) e receptor de progesterona (PR) no hipotálamo, hipófise e ovários em cabritas Saanen submetidas ao efeito macho no período peri-púbere. Dezesesseis cabritas Saanen entre 138,37 $\pm$ 3,59 dias de idade e peso médio de 22,75 $\pm$ 2,43 kg foram usadas. Sete cabritas foram submetidas a exposição diária de 1h 30 min a um macho sexualmente ativo durante 60 dias. Número igual de cabritas foi mantido isolado do contato com o macho e serviram de controle. Durante o período de exposição ao macho foram feitas coletas de sangue 2 vezes por semana para posterior dosagem de estradiol e progesterona. Seis cabritas (duas antes do começo do experimento e duas de cada grupo no final do experimento) foram sacrificadas para coleta de hipotálamo, hipófise e ovários para determinação da expressão de Kiss1, kiss1R, ER α , ER β e PR. As observações de comportamento de cio indicam que não houve diferenças entre grupos. A expressão do gene kiss1 e PR no hipotálamo aumentaram em função da idade das cabritas, sendo significativamente maior aos 9 meses quando comparado aos 6 meses de idade. Além disso, os níveis de progesterona, a expressão de kiss1 e PR no hipotálamo e ovário foram significativamente superiores no grupo macho quando comparado ao grupo controle. Do mesmo modo, o desenvolvimento folicular das cabritas peri-púberes foi influenciado pelo efeito macho. Em conjunto, esses resultados sugerem que o efeito macho acelerou o desenvolvimento das cabritas experimentais.

1. Introdução

A puberdade, culminar de eventos endócrinos que levam o animal a aquisição da competência reprodutiva (SENGER, 2003) é regulada por mecanismos neuroendócrinos com a participação dos esteroides sexuais (FOSTER; JACKSON; PADMANABHAN, 2006; OJEDA et al., 2010; OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013).

Porém, ainda persistem algumas questões em relação aos mecanismos moleculares envolvidos na ação dos esteroides sexuais nos neurônios do GnRH. Pois, os neurônios do GnRH são desprovidos dos receptores de estrógeno e progesterona, ambos necessários para que o estrógeno e a progesterona exerçam o efeito de retroalimentação nestes neurônios (SKINNER; CARATY; ALLINGHAM, 2001; WINTERMANTEL et al., 2006; POPA; CLIFTON; STEINER, 2008; KITAHASHI; PARHAR, 2013; OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013). Nas últimas décadas, várias substâncias têm sido confirmadas como intermediárias da retroalimentação do estradiol na síntese e liberação de GnRH em várias espécies animais como GABA, Glutamato, β -endorfina (KELLY; QIU, 2010) e kisspeptinas (POPA; CLIFTON; STEINER, 2008; OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013).

A descoberta do papel das kisspeptinas no desenvolvimento das características sexuais secundárias e maturação do eixo reprodutivo (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003) responde em parte as questões citadas anteriormente. No hipotálamo, o gene Kiss1 é expresso abundantemente em neurônios nos núcleos arqueado e anteroparaventricular em proximidade aos neurônios que sintetizam GnRH (DUNGAN; CLIFTON; STEINER, 2006). Os neurônios que sintetizam as kisspeptinas, ao contrário dos neurônios do GnRH, possuem receptores de estrógeno ER α (FRANCESCHINI et al., 2006) e progesterona (SMITH et al., 2007) dando indicação de que a ação dos esteróides pode ser mediada pelas kisspeptinas.

Em ovelhas e cabras, a administração endovenosa de kisspeptina provocou aumento significativo de níveis de LH em fêmeas em anestro

(HASHIZUME et al., 2010; OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013) comprovando o efeito estimulador destes peptídeos nos neurônios GnRH. Em cabras ovariectomizadas, foi constatado que a exposição ao feromônio (pêlos de um macho sexualmente ativo) estimulou a síntese da kisspeptina no núcleo arqueado hipotalâmico e a geração de pulsos de GnRH (MURATA et al., 2011). Esses resultados indicam que a indução de pulsos de GnRH que ocorre no retorno a ciclicidade após exposição ao macho pode ser igualmente mediada pelas kisspeptinas. Isso pode significar que na puberdade o efeito macho aumenta a expressão do gene kiss1 e do seu receptor no hipotálamo.

O presente trabalho tem como objetivo estudar a expressão do gene kiss1 (kiss1) e dos receptores de kisspeptinas (Kiss1R), estradiol (ER α e ER β) e progesterona (PR) no hipotálamo e ovários e sua relação com os níveis de estradiol e progesterona em cabritas submetidas ao efeito macho no período peri-púbere.

2. Material e métodos

2.1. Animais e tratamentos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Animal, Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Campus de Pirassununga, situado a uma altitude de 634 metros, latitude 22° 00' 00" sul e longitude 45° 25' 42" oeste, entre Junho e Setembro de 2013.

Um total de dezesseis cabritas da raça Saanen entre 138,37 $\pm$ 3,59 dias de idade e peso médio de 23,75 $\pm$ 2,43 kg foram usadas no experimento. A partir de uma semana antes do experimento, as cabritas foram alimentadas com uma dieta formulada a base de silagem, grão de milho moído, óleo de soja e sais minerais.

As cabritas foram distribuídas aleatoriamente entre dois tratamentos: exposição ao macho sexualmente ativo (grupo macho) e controle (grupo controle). As cabritas do grupo do macho foram submetidas a uma exposição

(contato) diária de 1h 30 minutos ao macho do começo ao fim do experimento. Para isso, um macho ativo foi deslocado diariamente à baia das cabritas permitindo se o contato e interação entre ambos. As cabritas do grupo controle permaneceram em baia isolada em outro galpão, sem contato visual e físico com o macho ao longo de todo o período experimental.

2.2. Coleta de dados, amostras e análises

Comportamento

A observação do comportamento dos animais teve a duração total de 3 horas diárias divididas em dois períodos: das 07h30min às 09h00min e das 15h30min às 17h00min. Antes de cada seção de observação do comportamento foram anotados o aspecto da vulva (presença de edema ou muco e coloração da mucosa vulvar). Em seguida foi feita a anotação dos comportamentos e atividades a cada 5 minutos. Foram registrados atividades e comportamentos diretamente associados ao cio: montar, deixar-se montar, deslocar e interagir. Todas as atividades e comportamentos relacionados ao cio pesquisados estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Atividades e comportamentos associados ao cio

Comportamento/ Alteração física		Descrição
Aspecto vulva		Presença de edema, muco e alteração da coloração da mucosa vulvar.
Montar		Saltar sobre outro animal, colocando suas patas dianteiras sobre o outro, com ou sem êxito repetidas vezes.
Deixar montar		Permanecer parado quando outro animal monta-o.
Deslocar		Movimentar-se
Interagir		Realizar atividade junto a outra(s) cabrita(s)

Coleta de sangue e dosagem hormonal

Durante o período experimental (junho a setembro), as cabritas foram submetidas a coletas de sangue duas vezes por semana através de punção jugular, utilizando tubos para coleta de sangue a vácuo (9 mL) com heparina e agulha 25 x 8 mm. Durante a coleta, os tubos foram mantidos resfriados, em caixa isotérmica. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm, à temperatura de 15°C durante 17 minutos para obtenção das amostras de plasma. O plasma recuperado foi armazenado a -20°C em tubo de polipropileno de 5,0 mL para posterior dosagem hormonal.

A dosagem do estradiol foi feita pelo kit comercial para determinação de estradiol 17 β (*Enzo® Life Sciences*). As amostras de plasma foram, primeiramente, submetidas à extração líquido/líquido na proporção 1:10 (plasma: éter etílico). Esta mistura foi colocada para secar em um concentrador de amostras (tipo speed vac) por 3 horas, posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20°C até a dosagem do estradiol. A recuperação das amostras pós-extração foi feita por reidratação à temperatura ambiente com 250 mL de solução tampão. Foram usados 100 mL da solução recuperada para o teste em microplacas de ELISA, avaliando sete pontos (0, 0.029, 0.117, 0.468, 1.875, 7.5, e 30 pg/mL) na curva padrão em duplicata. A leitura das placas foi efetuada em um leitor de microplacas de ELISA no comprimento de onda de 405 nm. Os coeficientes de variação intra e inter ensaio foram de 8,1% e 6,1%, respectivamente.

Para a análise de progesterona foi usado o kit comercial Progesterone AccuBind™ Test System (*Monobind Inc.*). Foram usados 25 μ L de plasma em microplacas de ELISA e foram avaliados 6 pontos (0, 0.3, 2, 5, 15, e 30 ng/mL) na curva padrão em duplicata. A leitura das placas foi efetuada em um leitor de microplacas de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os coeficientes de variação intra e inter ensaio foram de 3,1% e 7,0%, respectivamente.

Coleta de tecidos e quantificação da expressão do RNA

Para quantificar a expressão do gene kiss1 e dos receptores de kisspeptina, estradiol e progesterona, seis cabritas experimentais foram sacrificadas para a coleta do hipotálamo, da hipófise e dos ovários. Duas cabritas foram sacrificadas antes do início da bioestimulação para obtenção dos valores pré-experimentais. Outras quatro, duas em cada grupo experimental, foram sacrificadas ao final do período de bioestimulação para avaliação do efeito macho. Após insensibilização do animal com aplicação intravenosa de atropina, a eutanásia foi realizada por injeção intracardíaca de solução saturada de sulfato de magnésio. Em seguida foi feita a abertura do animal para a coleta de hipotálamo, hipófise e ovários. Os tecidos foram imediatamente acondicionados em tubo de ensaio contendo solução RNeasy® (Invitrogen, Carlsbad, CA) e conservados a -80°C até o processamento.

Para quantificar a expressão do gene Kiss1, receptores de kisspeptinas, estradiol e progesterona as amostras dos tecidos coletados foram submetidas à extração do ácido ribonucleico (RNA), síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) através da reação de transcrição reversa (RT) e amplificação dos genes de interesse através de reações em cadeia da polimerase (PCR) a partir de oligonucleótidos iniciadores desenhados a partir de dados do GenBank (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores. GAPDH (controle)

Gene		Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' → 3')	Código no GenBank	Fragmento (pb)
GAPDH	Direto	5'-GGTGATGCTGGTGCTGAG-3'	AJ431207	181
	Reverso	5'-TGACAATCTTGAGGGTGTTG-3'		
ER β	Direto	5'-GCCTCCATGATGATGTCCTTGA-3'	NM_001285688	117
	Reverso	5'-GAGCCGCACTTGGTCGTA-3'		
PR	Direto	5'-TGCAGGACATGACAACAGCA-3'	XM_005689375	123
	Reverso	5'-TTCCGAAAACCTGGCAGTG-3'		
Kiss1	Direto	5'-ACGTGCTGCTTTCCTGGCAGCT-3'	NM_001285710	78
	Reverso	5'-TGGGCGCCACCTTTTCCAAGGT-3'		
Kiss1R	Direto	5'-TACATCCAGCAGGTCTCGGTG-3'	GU142846	71
	Reverso	5'-ACGTACCAGCGGTCCACGCT-3'		

Para extração do RNA total dos tecidos estudados foi usado o kit PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Antes da transcrição reversa, o RNA foi submetido à reação de degradação do DNA com 1 U da enzima DNase (Promega) em solução tamponada com 40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgSO₄ e 1 mM CaCl₂ durante 30 minutos a 37°C, na sequência a reação foi inativada (2 mM EGTA, pH 8,0) por aquecimento a 65°C durante 10 minutos.

O RNA total reverso foi transcrito em 20 μ L empregando-se a enzima GoScript Reverse Transcriptase (Promega). O RNA foi incubado com 0,5 μ g de oligonucleotídio oligo-dT (Promega) por 5 minutos a 70°C. Em seguida, adicionou-se tampão 1X, 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP, 40 U de inibidor de RNases e 1,0 μ L da enzima transcriptase reversa. A reação foi conduzida a 42°C durante 60 minutos, seguido por 15 minutos a 70°C e resfriamento a 4°C.

O estudo da amplificação dos genes de interesse foi realizado pela técnica de qRT-PCR em 20 μ L composto de 1,0 μ L de cDNA, 0,4 μ M de cada oligonucleotídio iniciador e 10 μ L Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Todas as reações foram realizadas no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e anelamento e extensão a 60°C por 60 segundos. Cada amostra foi analisada em duplicata e as amplificações foram verificadas com a curva de dissociação para aferir a especificidade da reação. O tamanho dos produtos do qRT-PCR para cada molécula estudada foi confirmado por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (Figura 1). Para o cálculo da expressão relativa dos genes alvo foi usada a fórmula $QR 2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Figura 1. Gel de agarose com as moléculas estudadas

Análise estatística

Após verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE), os dados de dosagem hormonal e quantificação da expressão das moléculas estudadas foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento MIXED do programa *Statistical Analysis System* (SAS, 2011). Para cada parâmetro em estudo foram analisados o efeito do grupo (tratamento), do tempo (data de coleta) e da interação grupo*coleta. Quando houve significância, as médias foram comparadas pelo teste Fisher. Foi considerado um nível de significância de $P \leq 0,05$.

3. Resultados e discussão

As observações de comportamento de cio (Tabela 3) indicam que não houve diferenças entre grupos na percentagem de animais que registraram cios durante o experimento.

Tabela 3: Resumo das observações comportamentais de cio* das cabritas dos grupos macho e controle.

	Cabritas em cio	Cios	Cio/cabra	Intervalo cios (dias)	Coleta de sangue no cio
Grupo Macho	5 (71,4%)	15	3	21 $\pm$ 5 dias	7 (46%)
Grupo Controle	5 (71,4%)	12	2,4	24 $\pm$ 4 dias	4 (30%)

* O animal é considerado no cio quando permanece parado quando montado por outro animal (conforme descrito por CHEMINEAU et al., 1992).

As cabritas dos grupos macho e controle apresentaram número de cios muito próximos, o que indica que todos os animais experimentais tiveram ciclicidade semelhante. Entretanto, o intervalo entre as observações comportamentais de cio foi mais curto para as cabritas do grupo macho (21 $\pm$ 5 dias) comparadas as cabritas do grupo controle (24 $\pm$ 4 dias).

Porém, os dados comportamentais registraram diferenças significativas (Figura 2) entre grupos para os comportamentos montar, aspecto da vulva, deslocar e interagir. Para o comportamento montar, o grupo macho registrou maior frequência de comportamentos que o grupo controle. Contudo, para os

comportamentos aspecto da vulva, deslocar e interagir o grupo controle registrou maiores frequências que o grupo macho.

Figura 2: Frequência de comportamentos em cabritas Saanen expostas ao macho (grupo macho) e controle (grupo controle). Grupos que não compartilham a mesma letra no mesmo comportamento diferem estatisticamente entre si.

Estes resultados contraditórios sugerem que o efeito macho não influenciou adequadamente o comportamento das cabritas neste estudo, já que o comportamento deixar montar, indicador mais preciso do cio (CHEMINEAU et al., 1992; GAAFAR; GABR; TELEB, 2005; KHANUM; HUSSAN; KAUSAR, 2008) não registrou diferença entre os grupos. Estes resultados diferem dos resultados do nosso estudo anterior (capítulo II) onde os grupos submetidos ao efeito macho registraram frequências de comportamentos associados ao cio superiores ao grupo controle.

O perfil da somatória dos comportamentos, da progesterona e do estradiol (Figura 3) mostram que os cios se concentraram entre os meses de junho e julho. Estes dados, confirmam a sincronização dos primeiros cios no período reprodutivo específico da espécie em determinada região geográfica (SUNDERLAND et al., 1995; DELGADILLO, 2011).

Figura 3: Número de observações comportamentais de cio e concentrações (média $\pm$ epm) de progesterona e estradiol de todas as cabritas experimentais mensuradas entre 6/6 e 12/9.

Como aconteceu no experimento anterior (Capítulo II), os padrões de estradiol e progesterona mostram que a atividade cíclica ovariana em cabritas Saanen peri-púberes se restringe a época reprodutiva já que esta declina a partir de agosto (Figura 3), como ocorre com a atividade cíclica em cabras adultas desta raça na região do estudo (MACHADO, 1989; FILHO; MCMANUS; MARIANTE, 2001).

No presente estudo, não houve efeito de grupo sobre a concentração de estradiol, mas houve efeito significativo de grupo sobre a concentração de progesterona (Figura 4). De fato, o grupo macho teve média de progesterona significativamente superior a média do grupo controle. Contudo, as concentrações permaneceram abaixo de 0,5 ng/mL em grande parte do experimento o que sugere baixa frequência de ovulações para os dois grupos experimentais.

Figura 4: Concentração (média $\pm$ epm) de progesterona (ng/mL) e estradiol (pg/mL) mensuradas em cabritas Saanen dos grupos macho (grupo M) e controle (grupo F) entre 6/6 e 12/9.

A análise de dados de estradiol e progesterona em cabritas observadas em cio (Figura 5) mostram que a maioria das cabritas apresentaram ciclos entre 21 e 28 dias. De fato, 6 das 8 cabritas do grupo macho (75 %) apresentaram perfil hormonal característico de animais adultos em cio. Contudo, 4 das 8 cabritas do grupo controle (50%) apresentaram perfil hormonal característico de animais adultos em cio. Do mesmo modo, 1 cabrita do grupo macho e 1 cabrita

Figura 5: Concentração (média $\pm$ epm) de progesterona (ng/mL) e estradiol (pg/mL) em cabritas dos grupos macho (grupo M) e controle (grupo C) que foram observadas em cio comportamental (dia 0) a cada de 14, 21 e 28 dias.

do grupo controle apresentaram cio a cada 14 dias. As cabritas experimentais mostraram tendência a apresentar ciclos curtos a longos durante o período púbere. Estes resultados confirmam dados segundo os quais é característico em caprinos maior frequência de ciclos variáveis (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011).

Também houve efeito significativo de coleta/idade (Figura 6) sobre a expressão de Kiss e do receptor de progesterona (PR) no hipotálamo. A mesma tendência numérica foi observada para os receptores KissR, ER α , ER β no hipotálamo.

Figura 6: Expressão relativa de RNAm de Kisspeptina (Kiss) e dos receptores de Kisspeptina (KissR), progesterona (PR) e estrógeno (ER α e ER β) no hipotálamo das cabritas dos grupos macho e controle aos 5 e 9 meses de idade. Gene de referência GAPDH. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

No hipotálamo não houve efeito de grupo sobre a expressão de Kiss e KissR (Figura 7). Porém no ovário, a expressão de Kiss e KissR foi significativamente maior no grupo macho quando comparado ao grupo controle (Figura 7).

Referências anteriores indicam que ovários imaturos apresentam níveis de expressão de kiss muito baixos ou negligenciáveis que podem aumentar por estimulação com gonadotrofinas (CASTELLANO et al., 2006). Por outro lado, ANDERSON (2014) reporta o envolvimento intra-folicular das kisspeptinas e seu receptor no processo da ovulação, pois a expressão dessas moléculas aumenta muito antes da ovulação. Assim, os resultados encontrados neste estudo indicam que os ovários dos animais do grupo macho apresentavam folículos pré-ovulatórios, ao contrário dos animais do grupo controle.

Figura 7: Expressão relativa de RNAm de gene Kiss1 (Kiss) e dos receptores de Kisspeptina (Kiss1R) no hipotálamo e ovário das cabritas dos grupos macho (grupo M) e controle (grupo F). Gene de referência GAPDH. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

Embora, não houve diferença significativa na expressão dos receptores de estradiol (ER α e ER β) e de progesterona (PR) no hipotálamo. Nos ovários, a expressão de PR foi significativamente maior no grupo macho quando comparado ao grupo controle (Figura 8).

Figura 8: Expressão relativa de RNAm dos receptores de progesterona (PR) e estrógeno (ER α e ER β) no hipotálamo e ovário das cabritas dos grupos macho (grupo M) e controle (grupo F). Gene de referência GAPDH. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

Esta diferença aparentemente está associada a presença de folículos de maior dimensão no ovário direito de animais deste grupo comparado aos outros ovários (Tabela 4). Dados da literatura reportam a expressão de receptores de estradiol nas células da granulosa em pequenos folículos em crescimento e folículos pré-ovulatórios com maior predominância para o ER β (BYERS, et al., 1997; PEDRAM et al., 2014). O resultado de ER α no ovário também reforça a presença de folículos pré-ovulatórios em animais do grupo macho. A expressão de ER β é regulada pela ativação de receptores de gonadotrofinas e, portanto, tem relação com a fase folicular (BYERS, et al., 1997).

Tabela 4: Tamanho de folículos visíveis, expressão relativa de RNAm dos receptores de progesterona (PR) e estrógeno (ER α e ER β) nos ovários direito e esquerdo cabritas dos grupos Macho e Controle aos 9 meses de idade.

	Grupo Macho		Grupo Controle	
	Ovário esq.	Ovário dir.	Ovário esq.	Ovário dir.
Folículos	3 e 4 mm	3, 4 e 7 mm	3 mm	3 mm
PR mRNA	1,17 ^b $\pm$ 0,45	15,34 ^a $\pm$ 0,92	1,18 ^b $\pm$ 0,92	1,00 ^b $\pm$ 0,44
ERα mRNA	1,24b $\pm$ 0,21	12,61a $\pm$ 7,41	1,00b $\pm$ 0,29	2,24b $\pm$ 1,01
ERβ mRNA	1,22b $\pm$ 0,49	11,47a $\pm$ 2,10	1,74b $\pm$ 0,66	1,00b $\pm$ 0,09

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

Do mesmo modo, no ovário a expressão do receptor de progesterona não ocorre em animais imaturos, porém, em fêmeas sexualmente ativas, o receptor de progesterona se expressa de forma transiente somente nas células da granulosa associado a onda pré-ovulatória de LH (PARK; MAYO, 1991). No presente estudo os níveis de PR foram significativamente maiores no grupo macho onde foram registrados folículos com diâmetro maior.

No hipotálamo, os receptores de estrógeno (ER α e ER β) são responsáveis pelo efeito retroalimentação negativa nos neurônios do GnRH que ocorre antes da puberdade e durante grande parte do ciclo estral (VALASI et al., 2012; NESTOR et al., 2013) e pela retroalimentação positiva que ocorre antes da ovulação (WINTERMANTEL et al., 2006). O receptor de estrógeno ER β é

encontrado nos neurônios GnRH associado a onda pré-ovulatória de GnRH/LH (EVANS et al., 1997).

O aumento da expressão do receptor ER α pode estar associado a retroalimentação negativa sobre os neurônios GnRH devido a baixos níveis de estradiol ou a retroalimentação positiva que antecede a ovulação devido a presença de folículos pré-ovulatórios. Este resultado está em desacordo com dados reportados anteriormente apontado redução de receptores de estradiol à medida que se aproxima a puberdade (DAY et al., 1984, 1987). Contudo nesses trabalhos, não foi feita menção a um receptor específico, e ainda, esta variação pode estar associado a fase do ciclo pos-púbere dos animais neste trabalho.

Alguns autores reportam a importância do receptor de progesterona na retroalimentação positiva exercida pelos estrógenos nos neurônios GnRH (ROA et al., 2008; RADOVICK; LEVINE; WOLFE, 2012). Segundo RADOVICK, LEVINE e WOLFE (2012), o estrógeno induz a expressão do receptor de progesterona no hipotálamo sendo essa indução necessária para a elevação dos níveis de GnRH estimulados pelo estrógeno. Assim, o aumento dos níveis de PR registrado neste trabalho pode estar relacionado aumento dos níveis de ER α e ER β registrado no hipotálamo de animais (BYERS, et al., 1997).

No hipotálamo, as kisspeptinas e seu receptor estão associados a regulação da ação dos estrógenos, da progesterona e do estímulo social na atividade dos neurônios do GnRH (D'ANGLEMONT DE TASSIGNY; COLLEDGE, 2010; MURATA et al., 2011; DANIEL et al., 2013; KITAHASHI; PARHAR, 2013; OKAMURA; YAMAMURA; WAKABAYASHI, 2013). Assim, a expressão do gene kiss1 e do receptor de kisspeptinas no hipotálamo em animais sexualmente ativos encontra-se aumentada quando comparada a expressão dessas moléculas em animais sexualmente imaturos (KAISER; KUOHUNG, 2005; SHAHAB et al., 2005; NAVARRO et al., 2009). Por outro lado, foi reportado que a expressão do kiss1 é regulada pelos estrogênios (DALI, et al. 2007).

De modo geral, os resultados de expressão do gene kiss1 e PR no hipotálamo sugerem que houve a maturação do eixo reprodutivo das cabras

experimentais independentemente de sua alocação nos grupos experimentais. Por outro lado, o desenvolvimento folicular das cabritas peri-puberes foi influenciado pelo efeito macho. Assim no ovário das cabritas submetidas ao estímulo do macho ativo, houve expressão significativamente maior do gene Kiss1, Kiss1R e PR quando comparado aos ovários das demais cabritas. Em conjunto, esses resultados sugerem que o efeito macho pode ter influenciado o desenvolvimento das cabritas experimentais.

4. Referências

- ANDERSON, R. A. Brainwork in the ovary: kisspeptin and BDNF signaling converge to ensure oocyte survival. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 2751–3, 2014.
- BYERS M.et al. Estrogen Receptor- β mRNA Expression in Rat Ovary: Down-Regulation by Gonadotropins. **Molecular Endocrinology**, 11, 172 – 182. 1997.
- CASTELLANO, J. M. et al. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4852–62, 2006.
- DALI, L. et al. Estrogen Regulates KiSS1 Gene Expression through Estrogen Receptor α and SP Protein Complexes. **Endocrinology** 148(10):4821–4828. 2007.
- D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; COLLEDGE, W. H. The role of kisspeptin signaling in reproduction. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 25, n. 4, p. 207–17, 2010.
- DANIEL, J. A et al. Hypothalamic integration of nutrient status and reproduction in the sheep. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 48 Suppl 1, p. 44–52, 2013.
- DAY, M. L. et al. Endocrine Mechanisms Feedback Regulation of Puberty of Lutein in Heifers : Estradiol Negative. **Biology of reproduction**, v. 341, p. 332–341, 1984.
- DAY, M. L. et al. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of reproduction**, v. 37, n. 5, p. 1054–65, 1987.
- DE ROUX, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 19, p. 10972–6, 2003.

DUNGAN, H. M.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1154–8, 2006.

EVANS, N. P. et al. Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 138, n. 12, p. 5408-5414, 1997.

FILHO, G. S.; MCMANUS, C.; MARIANTE, S. Genetic and Environmental Factors which Influence Reproduction and Milk Production Traits in Goats in the Federal Dist. **Rev. bras. zootec.**, v. 30, n. 1, p. 133–140, 2001.

FOSTER, D. L.; JACKSON, L. M.; PADMANABHAN, V. Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 254-255, p. 109–19, 2006.

FRANCESCHINI, I. et al. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. **Neuroscience letters**, v. 401, n. 3, p. 225–30, 2006.

HASHIZUME, T. et al. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. **Animal reproduction science**, v. 118, n. 1, p. 37–41, 2010.

KAISER, U. B.; KUOHUNG, W. KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. **Endocrine**, v. 26, n. 3, p. 277–284, 2005.

KITAHASHI, T.; PARHAR, I. S. Comparative aspects of kisspeptin gene regulation. **General and comparative endocrinology**, v. 181, p. 197–202, 2013.

MACHADO, T.M. Dissociação entre cio e ovulação em cabras recém-importadas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, supl 1, p. 115, 1989.

MURATA, K. et al. Effects of brief exposure of male pheromone on multiple-unit activity at close proximity to kisspeptin neurons in the goat arcuate nucleus. **The Journal of reproduction and development**, v. 57, n. 2, p. 197–202, 2011.

NAVARRO, V. M. et al. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2359–67, 2009.

NESTOR, C. C. et al. Evidence that Orphanin FQ Mediates Progesterone Negative Feedback in the Ewe. **Endocrinology**, v. 154, n. 11, p. 4249-4258, 2013.

OJEDA, S. R. et al. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 324, n. 1-2, p. 3–11, 2010.

OKAMURA, H.; YAMAMURA, T.; WAKABAYASHI, Y. Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: An overview of kisspeptin research in domestic animals. **Animal Science Journal**, v. 84, p. 369–381, 2013.

PARK, O.; MAYO, K. Transient Expression of Progesterone-Receptor Messenger-RNA in Ovarian Granulosa Cells after the Preovulatory Luteinizing-Hormone Surge. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 967 – 978, 1991.

PEDRAM, A. et al. Membrane-localized estrogen receptor α is required for normal organ development and function. **Developmental cell**, v. 29, n. 4, p. 482–90, 2014.

RADOVICK, S.; LEVINE, J. E.; WOLFE, A. Estrogenic regulation of the GnRH neuron. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. April, p. 52, 2012.

ROA, J. et al. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 48–69, 2008.

RUDOLF, F. O.; KADOKAWA, H. Expression of estradiol receptor, GPR30, in bovine anterior pituitary and effects of GPR30 agonist on GnRH-induced LH secretion. **Animal reproduction science**, v. 139, n. 1-4, p. 9–17, 2013.

SEMINARA, S. B. et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 17, p. 1614–27, 2003.

SHAHAB, M. et al. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 6, p. 2129-2134, 2005.

SKINNER, D. C.; CARATY, A.; ALLINGHAM, R. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe : no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 573–579, 2001.

SMITH, J. T. et al. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 148, n. 3, p. 1150–7, 2007.

SMITH, J. T. et al. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. **Endocrinology**, Amsterdam, v. 149, n. 4, p. 1951–9, 2008.

SZABO, et al. Progesterone receptor a and b messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 62, p. 95–102, 2000.

VALASI, I. et al. Management of pre-pubertal small ruminants: physiological basis and clinical approach. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 130, n. 3-4, 2012.

CAPÍTULO IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interação social pelo uso do efeito macho alterou o perfil da atividade cíclica nas cabritas Saanen neste estudo. Os resultados comportamentais e de perfil hormonal indicam que a atividade cíclica em cabritas peri-púbere se limita a época reprodutiva, porém pode ser prolongada com o uso do efeito macho, podendo contribuir para a redução da idade ao primeiro parto.

A expressão de mRNA do gene *kiss1*, *kiss1R*, *ER α* , *ER β* e *PR* difere entre animais pré e pos-púbere e é influenciada pela fase de desenvolvimento folicular nos animais pos-púbere.