

Avaliação da precocidade sexual e determinação do melhor momento para separação pelo sexo no manejo reprodutivo de cordeiros portadores da genética *FecG^E*

Islan Dantas Menezes Dias¹, Clêrton Magno Rocha Santana Pereira², Maiana Silva Chaves³, Davi Andrade Oliveira⁴, Samuel Rezende Paiva⁵, Alexandre Rodrigues Caetano⁶, Alexandre Nizio Maria⁷, Valdir Ribeiro Junior⁸, Hymerson Costa Azevedo⁹

Resumo - Estudos sobre a puberdade e maturidade sexual são essenciais para a determinação da idade de separação de cordeiros pelo sexo, entretanto, têm sido escassos, especialmente naqueles portadores de mutações prolíficas a exemplo da *FecG^E*. Objetivou-se avaliar o efeito da mutação *FecG^E* sobre a puberdade e maturidade sexual de cordeiros Santa Inês criados no Agreste de Sergipe e determinar a idade para separação dos animais pelo sexo no manejo reprodutivo. Foram utilizados 36 cordeiros, pesados e avaliados andrológicamente (motilidade espermática – MOT; concentração espermática – CON; Defeitos Maiores e Totais – DMA e DT) a cada 15 dias para determinação da puberdade (MOT \geq 10%, CON \geq 50 x 10⁶ spz/mL e DT \leq 50%) e maturidade sexual (MOT \geq 50%, DMA \leq 15%, DT \leq 30% e CON \geq 1000 x 10⁶ spz/mL). A idade máxima para separação pelo sexo foi estabelecida como sendo a média de idade menos o desvio padrão em que os animais apresentaram espermatozoides no ejaculado. Os dados foram avaliados através da análise de covariância com medidas repetidas no tempo, considerando o peso ao nascimento como covariável e, foi aplicado o pós-teste de *Duncan* a 95% de significância. Não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos, a mutação *FecG^E* não influenciou nos parâmetros utilizados para determinar a puberdade e maturidade, observando-se que os cordeiros atingiram a puberdade em média aos 187 dias de idade com valores médios de: MOT – 62,45%; CON – 714,82 x 10⁶ spz/mL; DT – 42,57 %. A maturidade foi alcançada em média aos 230 dias de idade com os cordeiros apresentando valores médios de: MOT – 69,48%; CON – 1.225,77 x 10⁶ spz/mL; DMA – 0,20%; DT – 10,97%. Conclui-se que a mutação *FecG^E* não afeta a puberdade e maturidade sexual dos cordeiros Santa Inês criados na região Agreste do estado de Sergipe. Não há necessidade de recomendação específica de idade para a separação dos cordeiros pelo sexo no manejo reprodutivo dos rebanhos mutantes que, em geral, deve ser de no máximo 112 dias de idade.

Termos para indexação: GDF-9, maturidade, mutação, polimorfismo, puberdade, Santa Inês.

Introdução

A ovinocultura tem se destacado cada vez mais como importante fonte de renda para produtores. Neste sistema de produção, a eficiência reprodutiva é um dos principais fatores limitantes da lucratividade e, o conhecimento da influência dos fatores ambientais e genéticos é um passo importante para melhorar a produtividade dessa espécie (Rekwot et al., 2001). A separação de cordeiros pelo sexo é uma prática de manejo reprodutivo importante para os rebanhos, pois permite ao produtor, direcionar os cruzamentos entre os animais decidindo que genes serão propagados, controlar a consanguinidade e a disseminação de doenças e, evitar que as fêmeas prejudiquem seu desenvolvimento ponderal em detrimento de uma gestação precoce.

Machos sexualmente precoces iniciam antecipadamente sua atividade reprodutiva e, conseqüentemente, têm um maior tempo de vida útil como reprodutor. A utilização desses animais diminui o intervalo entre gerações dos rebanhos com redução dos custos de produção e alcance mais rápido de benefícios do melhoramento genético, sendo fundamental o conhecimento da idade em que estes animais atingem a puberdade (Souza et al., 2003) e a maturidade sexual.

Os machos são os principais difusores da genética no rebanho e a seleção de cordeiros mais produtivos e adaptados às condições ambientais locais é essencial no manejo reprodutivo, potencializando os programas de melhoramento genético a fim de atender as demandas dos produtores e mercado consumidor (Mcmanus et al., 2010). A utilização de bioferramentas nos programas de melhoramento genético, a exemplo das técnicas moleculares, como os marcadores e sequenciamento gênico, permite identificar e caracterizar genes e suas mutações com fenótipos relevantes na produção e reprodução animal (Milazzotto et al., 2008).

¹Graduando em Medicina Veterinária, bolsista Fapitec/SE/PIBIC, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Médico Veterinário, Técnico Administrativo da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

³Médica Veterinária, mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, bolsista CAPES, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

⁴Médico Veterinário, bolsista Capes/Fapitec/SE, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

⁵Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁶Zootecnista, doutor em Genética, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁷Zootecnista, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁸Zootecnista, doutor em Zootecnia, Professor Adjunto da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

⁹Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Em ovelhas Santa Inês, um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) no éxon 2 do gene do Fator de Diferenciação e Crescimento-9 (GDF-9), foi descoberto e nomeado como *FecG^E*, apresentando um efeito aditivo na taxa de ovulação (82%) e prolificidade (50%) em homozigotas (Silva et al., 2011). Contudo, ainda não se sabe os efeitos desta mutação sobre a reprodução dos machos ovinos principalmente em relação à sua puberdade e maturidade sexual.

A caracterização da puberdade e maturidade sexual de cordeiros Santa Inês portadores da *FecG^E* permite avaliar os efeitos desta mutação sobre a fisiologia dos machos e determinar o melhor momento para separação pelo sexo no manejo reprodutivo dos rebanhos mutantes, a fim de auxiliar as atividades de conservação e melhoramento genético da espécie ovina.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da mutação *FecG^E* sobre a puberdade e maturidade sexual de machos ovinos da raça Santa Inês e determinar a idade para separação de cordeiros pelo sexo em rebanhos de animais portadores desta genética criados em sistema semi-intensivo de produção de carne na sub-região do Agreste de Sergipe.

Material e Métodos

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros (protocolo: 06122016.0014) e executados entre dezembro de 2016 e novembro de 2017. O manejo e as atividades diretamente relacionadas aos animais foram realizados no Campo Experimental Pedro Arle (CEPA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Frei Paulo, Agreste do estado de Sergipe, Brasil (Latitude: 10°36'08" Sul e Longitude: 37°38'29" Oeste).

Foram utilizados 36 cordeiros contemporâneos confinados até 239±11,2 ($\bar{X} \pm S \sigma$) dias de idade com dieta à base de silagem de milho (15% de peso corporal) e concentrado de milho e soja com 18% de proteína bruta (PB) livre (0,6% de peso corporal), com mistura mineral comercial própria para ovinos e água *ad libitum*. Entre 239±11,2 e 427±11,2 dias de idade, os cordeiros foram submetidos a manejo semi-intensivo quando passaram a ter acesso a pastagens compostas por *Panicum maximum* cultivar Green Panic e Aruana e a serem confinados à noite para receber a mesma dieta à base de silagem e concentrado, além de mineralização.

Os cordeiros foram genotipados para *FecG^E* no laboratório de genética animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/ DF, Brasil, a partir de amostras de sangue (5 mL) colhidas através da punção da veia jugular dos cordeiros em tubos contendo EDTA, as quais foram refrigeradas a -20°C até a extração do DNA (Araujo et al., 2009) com posterior sequenciamento de Sanger (Lacerda et al., 2016). Baseando-se no resultado da genotipagem, os cordeiros foram divididos em grupos genótipos: *FecG^{+/+}* (Homozigoto não mutante, n=7); *FecG^{+/E}* (Heterozigoto mutante, n=11) e; *FecG^{E/E}* (Homozigoto mutante, n=18).

A cada quinze dias durante os 11 meses do experimento foram realizados pesagens por meio de balança digital (Toledo MGR-CAMPO®, São Bernardo do Campo, Brasil) e exames andrológicos por meio de biometrias testiculares e análises seminais e espermáticas. Com auxílio de paquímetro, a altura (AT) e largura (LT) de cada testículo foram mensuradas nas posições dorsoventral e lateromedial, respectivamente e, utilizando-se de fita métrica, a circunferência escrotal (CE) foi medida na altura da curvatura maior dos testículos (Pacheco et al., 2009). Do testículo direito e esquerdo foram obtidos seus respectivos volumes (VT) a partir da fórmula: $VT = 2 [4/3 \pi (LT/2)^2 (AT/2)]$ sendo $\pi = 3,1416$ (Bailey et al., 1998).

A coleta do sêmen foi feita com auxílio de eletroejaculador (TK 800®, Uberaba, Brasil), primeiramente esvaziando-se a ampola retal dos animais, que foram contidos em decúbito lateral e, submetidos à sonda lubrificada com gel à base de carboximetilcelulose, a qual foi introduzida no reto posicionando-se os eletrodos ventralmente e aplicando-se 6 estímulos elétricos de baixa voltagem (8V) com duração de 6 segundos e intervalo de 6 a 10 segundos (Damián et al., 2011).

As amostras de sêmen foram avaliadas e tiveram o volume seminal (VS) determinado através de pipeta de precisão. A cinética espermática foi avaliada subjetivamente colocando-se uma gota de sêmen puro ou diluído em solução de X-Cell® (IMV, L'Aigle, França), a depender da concentração aparente de espermatozoides na amostra colhida. Utilizando-se microscópio ótico (100 a 400x) foram mensurados, a motilidade espermática (MOT – 0 a 100%) e, o vigor espermático (VigE – 1 a 5) (Henry et al., 2013).

A análise de concentração espermática (CON) foi realizada adicionando-se uma alíquota de sêmen à água ultrapura (Milli-Q®, Merck, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 1:400 e mensuração em câmara de Neubauer sob microscópio ótico (400x). O número total de espermatozoides (NTE) da amostra seminal foi determinado a partir da multiplicação do VS pela CON.

A morfologia dos espermatozoides foi avaliada transferindo-se 10 µL da amostra seminal para 500 µL de tampão fosfato-salino com glutaraldeído a 0,2% aquecidos a 37 °C. A partir de uma alíquota desta mistura, 200 espermatozoides foram analisados por meio de microscópio de contraste de fase, sob óleo de imersão (1000x) e, classificados com defeitos maiores (DMa) e menores (DMe). Através da soma dos DMa e DMe obteve-se o número de espermatozoides com defeitos totais – DT (Henry et al., 2013).

A viabilidade dos espermatozoides (VE) foi avaliada misturando-se alíquotas de sêmen em corante eosina-nigrosina (1:1 à 1:3), que permaneceram sob incubação à 37 °C por um minuto antes da confecção do esfregaço. A lâmina foi seca com soprador para posterior contagem de 200 espermatozoides por amostra em microscópio ótico (400x) sendo considerados espermatozoides com membrana plasmática intacta aqueles que apresentavam cabeça não corada de rosa pela eosina.

A funcionalidade da membrana plasmática (FMP) foi avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST) diluindo-se 10 µL de sêmen em 100 µL de água ultrapura (0 mM) e incubando-se (37 °C/5') e fixando-se a mistura em 10 µL de solução de formol salino tamponado (Menezes et al., 2013). Sob microscópio de contraste de fase (1000x), contou-se 200 espermatozoides sendo considerados reativos ao HOST aqueles com cauda dobrada. Calculou-se o percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional subtraindo-se, do total daqueles reativos ao HOST, os que apresentaram cauda dobrada na análise da morfologia espermática.

Os animais foram considerados púberes quando o ejaculado apresentava espermatozoides com MOT \geq 10%, CON \geq 50 x 10⁶ spz/mL (Pacheco et al., 2009) e DT \leq 50% (Avellaneda et al., 2006). A maturidade sexual por sua vez foi determinada a partir do momento em que os cordeiros apresentaram ejaculado com MOT \geq 50% (Garcia et al., 1987), DMA \leq 15% e DT \leq 30% (Lopes et al., 2013) e, CON \geq 1000 x 10⁶ spz/mL de sêmen (Henry et al., 2013). A recomendação da idade máxima para separação pelo sexo dos cordeiros no manejo reprodutivo foi estabelecida como sendo a média de idade menos o desvio padrão em que os animais apresentaram espermatozoides no ejaculado independente da sua quantidade e qualidade.

Os genótipos *FecG^E* foram considerados como efeitos principais (variáveis independentes) na análise dos dados. As variáveis dependentes (pesagens e avaliações andrológicas) foram submetidas ao teste de *Saphiro-Wilk* para verificação do pré-requisito de normalidade da distribuição. As variáveis que não apresentaram distribuição normal tiveram seus dados transformados, utilizando-se a metodologia de Box e Cox (1964). Após verificação dos pré-requisitos, o peso ao nascimento foi adotado como covariável na análise de covariância (ANCOVA) aplicada com arranjo de medidas repetidas no tempo, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o PROC GLM, onde cada coleta foi considerada como medida repetida, utilizando o comando REPEATED. Médias entre tratamentos foram comparadas pelo teste de *Duncan* ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS Institute, Inc., 2010), sendo os resultados expressos em média e erro padrão.

Resultados e Discussão

O manejo de separação dos cordeiros pelo sexo no rebanho é uma prática utilizada para evitar prenhez indesejada. Assim, deve-se realizar a separação dos cordeiros em grupos de machos e fêmeas antes do aparecimento de espermatozoides no ejaculado dos cordeiros independente de sua quantidade e qualidade e, conseqüentemente, seu potencial fertilizante. No presente trabalho, foram identificados espermatozoides no ejaculado dos cordeiros em média aos 133 dias de idade com desvio padrão de 21,17 dias.

Os genótipos não influenciaram nenhum parâmetro durante todo o período experimental e não tiveram influência sobre a idade à puberdade dos cordeiros que ocorreu em média aos 187 dias, apresentando os seguintes valores para os parâmetros avaliados: Peso corporal – 37,26 kg; VTd – 68,98 mm; VTe – 68,68 mm; CE – 241,59 mm; VS – 718,37 µL; MOT – 62,45%; VigE – 2,62; CON – 714,82 x 10⁶ spz/mL; NTE – 54,14 x 10⁶ spz; DMA – 13,45%; DMe – 29,11%; DT – 42,57%; VE – 79,33%, FMP – 18,50%. Utilizando alguns parâmetros semelhantes ao deste trabalho para determinar a puberdade, Pacheco et al. (2009) relataram que cordeiros Santa Inês, manejados no Sul do Espírito Santo, tornaram-se púberes com uma idade média mais tardia (210 dias) e apresentaram qualidade seminal inferior: MOT – 37,71% e DT – 47,20%. Já Souza et al. (2003) identificaram idade semelhante (181 dias) à puberdade de ovinos Santa Inês criados no estado do Ceará, utilizando apenas os critérios de concentração (\geq 50 x 10⁶ spz/mL) e motilidade espermática (\geq 10%) para sua determinação, cujos valores foram de 70,00 x 10⁶ spz/mL e 43,57%, respectivamente.

Embora a puberdade tenha sido atingida aos 187 dias, o cordeiro só deverá ser utilizado na sua plenitude como reprodutor após atingir a maturidade sexual (González, 2002) quando atinge um nível satisfatório de sua capacidade reprodutiva. Nesse estágio reprodutivo, os carneiros servirão um maior número de ovelhas em um curto período de tempo, aumentando a pressão de seleção e a disseminação do material genético desejável (Pacheco; Quirino, 2010). Nos cordeiros Santa Inês deste trabalho, a maturidade sexual ocorreu em média aos 230 dias de idade sem influência do genótipo, apresentando os seguintes valores para os parâmetros avaliados: Peso corporal – 47,79 kg; VTd – 130,46 mm; VTe – 123,63 mm; CE – 278,09 mm; VS – 1370,29 µL; MOT – 69,48%; VigE – 3,39; CON – 1.225,77 x 10⁶ spz/mL; NTE – 1.654,60 x 10⁶ spz; DMA – 0,20%; DMe – 10,77%; DT – 10,97%; VE – 84,19%; FMP – 29,97%.

A idade à maturidade sexual obtida neste trabalho diferiu do que Souza et al. (2010) definiram como idade em que cordeiros Santa Inês se apresentavam aptos à reprodução. Os referidos autores relataram que os animais atingiram esta condição em média aos 308 dias de idade quando apresentavam ejaculados com concentração espermática mínima de 1000 x 10⁶ spz/mL. Considerando-se as recomendações do CBRA, os cordeiros utilizados neste trabalho seriam considerados como aptos à reprodução aos 427 dias de idade, especialmente em consequência da CE mínima de 30 cm.

Conclusões

Conclui-se que a mutação *Fec^E* não afeta a puberdade e maturidade sexual dos cordeiros Santa Inês criados na região Agreste do estado de Sergipe. Não há necessidade de recomendação específica de idade para a separação dos cordeiros pelo sexo no manejo reprodutivo dos rebanhos mutantes que, em geral, deve ser de no máximo 112 dias de idade.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (Fapitec/SE) - Brasil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes - Código 001), e Financiadora de Estudos e Projetos - Brasil (Finep).

Referências

- ARAUJO, F. R.; RAMOS, C. A. do N.; LUÍZ, H. L.; PÉRES, I. A. H. F. S.; OLIVEIRA, R. H. M. de; SOUZA, I. I. F. de; RUSSI, L. dos S. **Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total**. Comunicado Técnico (INFOTECA-E). Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/85336>>. Acesso em: 27 jun. 2016.
- AVELLANEDA, Y.; RODRÍGUEZ, F.; GRAJALES, H.; MARTÍNEZ, R.; VASQUEZ, R. Determinación de la pubertad en corderos en el trópico alto colombiano por características corporales, calidad del eyaculado y valoración de testosterona. **Livestock Research for Rural Development**, v. 18, p. 138, 2006.
- BAILEY, T. L.; HUDSON, L.R.S; POWE, T.A; RIDDELL Z.M.G; WOLFE D.F; CARSON R.L. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight *in vivo*. **Theriogenology**, v. 49, p. 581-594, 1998.
- DAMIÁN, J. P.; UNGERFELD, R. The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p.646–50, 2011.
- GARCIA, J. M.; PINHEIRO, L. E. L.; OKUDA, H. T. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzera bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 1, p. 47–53, 1987.
- GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Copyright. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (Faculdade de Veterinária) 2002, p. 87
- HENRY, M.; NEVES, J. P.; JOBIM, M. I. M. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Ed.3. Belo Horizonte: CBRA, p. 104, 2013.
- LACERDA, T. S. A.; CAETANO, A.R.; FACÓ, O.; FARIA, D.A.; McMANUS, C. M.; LÔBO, R. N.; SILVA, K. M.; PAIVA, S. R. Single marker assisted selection in Brazilian Morada Nova hair sheep community-based breeding program. **Small Ruminant Research**, v. 139, p. 15–19, 2016.
- LOPES, F.G.; KOETZ JUNIOR, C.; BARCA JÚNIOR, F. A; OKANO, W.; da SILVA, L. C.; da SILVA JÚNIOR, M. A. G. Maturidade sexual e classificação andrológica por pontos (CAP) em touros jovens da raça nelore puros de origem (PO). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 1, 2013.
- McMANUS C.; PAIVA, S. R.; ARAÚJO, R. O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 236-246, 2010.
- MENEZES, G.F.O.; BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M. F. B.; OBA, E.; BICUDO, D. S. Utilização do choque osmótico na avaliação da viabilidade de sêmen criopreservado de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.50, p. 396-405, 2013.
- MILAZZOTTO, M. P.; VISINTIN, J. A. Biotecnologias da reprodução animal-biologia molecular aplicada à biotecnologia. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, p. 145-148, 2008.
- PACHECO, A.; OLIVEIRA, A. F. M.; QUIRINO, C. R.; LANDIM, A. V. Características seminais de carneiros da raça Santa Inês na pré-puberdade, puberdade e na pós-puberdade. **Ars Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 90-99, 2009.
- PACHECO, A.; QUIRINO C.R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.87-97, 2010.

REKWOT, P. I.; OGWU, D.; OYEDIPE, E. O.; SEKONI, V.O. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.157-170, 2001.

SAS INSTITUTE; SAS PUBLISHING. **SAS/IML Studio 3.3 for SAS/STAT Users**. SAS institute, 2010.

SILVA, B. D. M.; CASTRO, E. A.; SOUZA, C. J.; PAIVA, S. R.; SARTORI, R.; FRANCO M. M.; AZEVEDO, H. C.; SILVA, T. A.; VIEIRA, A. M.; NEVES, J. P.; MELO, E. O. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. **Animal Genetics**, v. 42, n. 1, p. 89–92, 2011.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; ARAÚJO A. A.; LIMA, A. C. B. Estudo das interações entre o desenvolvimento gonadal, produção espermática, concentrações de testosterona e aspectos ligados à puberdade em carneiros Santa Inês ao longo do primeiro ano de vida. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.199-201, 2003.

SOUZA, C. E. A.; ARAÚJO A. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; LIMA SOUZA, A .C.; NEIVA, J. N. M.; MOURA, A. A. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 644–653, 2010.