

POLYANA GALVÃO BERNARDES COELHO

**PARÂMETROS REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTAIS DE COELHAS
NOVA ZELÂNDIA INFLUENCIADOS PELA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS
INCISIVOS E PELO EFEITO DO MACHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C672p
2016

Coelho, Polyana Galvão Bernardes, 1981-

Parâmetros reprodutivos e comportamentais de coelhas
Nova Zelândia influenciados pela cauterização dos ductos
incisivos e pelo efeito do macho / Polyana Galvão Bernardes
Coelho. – Viçosa, MG, 2016.

x, 91f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Coelho - Reprodução. 2. Coelho - Comportamento.
3. Anatomia veterinária. 4. Aparelho genital. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.9322

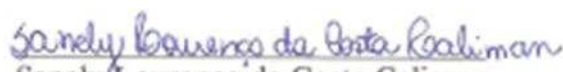
POLYANA GALVÃO BERNARDES COELHO

**PARÂMETROS REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTAIS DE COELHAS
NOVA ZELÂNDIA INFLUENCIADOS PELA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS
INCISIVOS E PELO EFEITO DO MACHO**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de janeiro de 2016.


Katerin Elena Bohorquez Grondona


Sanely Lourenço da Costa Caliman


Jurandy Mauro Penitente Filho


Germán Arturo Bohorquez Mahecha
(Coorientador)


Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

Ao Matheus, meu filho, que foi meu companheiro em todos os momentos desta jornada.

Ao Felipe, meu filho, que chegou nos momentos finais desta jornada, fazendo dela ainda mais especial.

Aos meus pais, Mauricio e Joanna, e ao meu marido, Ricardo, que me apoiaram nestes anos de lutas e conquistas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir concluir mais esta etapa da minha vida profissional.

Ao Matheus, meu querido filho e companheiro de todas as horas, que mesmo sem saber foi parte importante deste doutorado.

Ao Felipe, caçulinha da mamãe, chegou no final deste período, alegrando ainda mais a minha vida.

Aos meus pais, por todo amor, carinho e confiança, agradeço também pelas ajudinhas que me deram com as coelhinhas.

Ao Ricardo, meu marido, por todo amor, paciência e companheirismo durante este período do doutorado, não esquecendo que também ajudou com as coelhinhas.

Aos meus irmãos, Guilherme e Bruna, pelo amor e carinho que sempre tiveram comigo, mesmo de longe.

Ao Laércio, professor e amigo, que mais uma vez aceitou o desafio que o propus com boa vontade e coragem, e aqui está o resultado deste desafio. Posso dizer mais uma vez que juntos, aprendemos muito. Muito obrigada!

Aos Professores JD e Paulo Cecon, que me ajudaram com a estatística.

Ao Professor Germán, que mesmo de longe, se propôs a nos ajudar nesta jornada, estando sempre a disposição quando era solicitado.

Ao Professor Eduardo Paulino, pela atenção e apoio sempre que solicitado.

Ao Professor José Lúcio e à Dona Maria, pelo apoio e carinho.

Aos amigos Sanely, Káterin, Camila, Fausto, João Vitor, Gisele e Diego.

Às amigas colombianas, Sandra e Johana, que durante a estadia em Viçosa me ajudaram muito, e juntas aprendemos muito.

Ao Juquinha, responsável pelo Setor de Cunicultura do departamento de Zootecnia da UFV, por me permitir usar o espaço físico da Cunicultura, e pelo mais importante: os ensinamentos que me passou.

Ao Carlos, pela ajuda no laboratório.

À CAPES, pela bolsa de estudo.

Às Rações Presence por ter financiado a ração usada durante o estudo.

Agradeço a todos, pois sozinha este trabalho não teria sido realizado.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Órgão vomeronasal.....	3
2.1.1. O que é o órgão vomeronasal (OVN).....	3
2.1.2. Qual é a sua estrutura	6
2.1.3. Qual é a sua função.....	8
2.2. Anatomia dos órgãos genitais das coelhas	9
2.2.1. Ovários	10
2.2.2. Tubas uterinas.....	13
2.2.3. Útero	14
2.2.4. Vagina.....	14
2.2.5. Vulva	15
2.3. Fisiologia da reprodução em coelhas.....	15
2.3.1. Mecanismos hormonais na reprodução	15
2.3.2. Desenvolvimento orgânico da reprodução	18
2.3.3. Funcionamento da atividade reprodutiva	19
2.3.4. Comportamento reprodutivo	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS INCISIVOS NOS ÓRGÃOS GENITAIS, NO COMPRIMENTO DO OVN, NO COMPORTAMENTO E NA COMPOSIÇÃO MUSCULAR E ÓSSEA DE COELHAS NOVA ZELÂNDIA	25
3.1.1. Local de realização do experimento	25
3.1.2. Animais.....	25
3.1.3. Cauterização dos ductos incisivos	27
3.1.4. Pesagem dos animais	27
3.1.5. Amostras de sangue	28
3.1.5.1. Coleta de sangue	28
3.1.5.2. Manipulação, armazenamento e análise das amostras de sangue.....	29
3.1.6. Avaliação da coloração da vulva	31
3.1.7. Comportamento animal	31
3.1.8. Eutanásia.....	33
3.1.9. Coleta e processamento do material	33
3.1.9.1. Coleta de fragmentos de músculo e osso.....	33
3.1.9.2. Coleta do órgão vomeronasal	35
3.1.9.3. Coleta dos órgãos genitais	35

3.1.9.4. Coleta do fígado	38
3.1.9.5. Índice gonadossomático e hepatossomático	39
3.1.10. Análises estatísticas	39
3.2. EXPERIMENTO 2. INFLUÊNCIA DA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS INCISIVOS NA CAPACIDADE DE GESTAÇÃO E NA HABILIDADE MATERNA DE COELHAS NOVA ZELÂNDIA.....	40
3.2.1. Local de realização do experimento	40
3.2.2 Animais.....	40
3.2.3. Obstrução dos ductos incisivos	42
3.2.4. Apresentação das fêmeas aos machos	42
3.2.5. Diagnóstico de gestação	42
3.2.6. Reconhecimento dos láparos pelas mães.....	43
3.2.7. Análise estatística	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. EXPERIMENTO1: EFEITO DA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS INCISIVOS NOS ÓRGÃOS GENITAIS, NO COMPRIMENTO DO OVN, NO COMPORTAMENTO E NA COMPOSIÇÃO MUSCULAR E ÓSSEA DE COELHAS NOVA ZELÂNDIA	44
4.1.1. Animais.....	44
4.1.2. Coloração da vulva x idade	49
4.1.3. Comportamento animal	54
4.1.4. Anatomia dos órgãos genitais.....	54
4.1.5. Índice gonadossomático e hepatossomático	60
4.1.6. Composição dos músculos reto femoral e vasto medial e densidade da epífise proximal do osso fêmur	61
4.1.7. Órgão vomeronasal (OVN)	62
4.1.8. Análise hormonal.....	63
4.1.9. Análise histológica	70
4.2. EXPERIMENTO 2. INFLUÊNCIA DA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS INCISIVOS NA CAPACIDADE DE GESTAÇÃO E NA HABILIDADE MATERNA DE COELHAS NOVA ZELÂNDIA.....	78
7. CONCLUSÃO.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
9. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	91

RESUMO

COELHO, Polyana Galvão Bernardes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Janeiro de 2016. **Parâmetros reprodutivos e comportamentais de coelhas Nova Zelândia influenciados pela cauterização dos ductos incisivos e pelo efeito do macho.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Coorientadores: Eduardo Paulino da Costa, Germán Arturo Bohórquez Mahecha e José Domingos Guimarães.

A atividade reprodutiva nas coelhas domésticas (*Oryctolagus cuniculus*) é controlada pelo sistema nervoso, e o mesmo recebe influência tanto do meio interno quanto do meio externo. O órgão vomeronasal liga o ambiente externo a áreas do encéfalo responsáveis por comportamentos reprodutivos e maternos. Baseado nestes aspectos, o estudo visou esclarecer como os comportamentos reprodutivo e maternal e a anatomia dos órgãos genitais seriam influenciados pela obstrução dos ductos incisivos associados à presença ou não do efeito do macho. Para este estudo foram utilizadas 30 coelhas da raça Nova Zelândia divididas em dois experimentos. No primeiro experimento, 10 das 20 coelhas com idade de 50 dias tiveram seus ductos incisivos cauterizados. No segundo experimento, 5 das 10 coelhas tiveram seus ductos incisivos cauterizados com a idade de 50 dias, enquanto as outras 5 foram submetidas à cauterização 10 dias após o parto. As coelhas do primeiro experimento foram divididas em 4 grupos baseados na associação da cauterização ou não dos ductos incisivos com a presença ou não do efeito do macho. As coelhas do segundo experimento foram destinadas exclusivamente para reprodução. As coelhas do primeiro experimento foram pesadas semanalmente, tiveram amostras de sangue coletadas para análise dos hormônios luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) e 17β -estradiol (E_2) a cada dez dias, e o comportamento avaliado segundo um etograma adaptado a este estudo. Ao atingirem a idade de 125 dias, estas 20 coelhas foram eutanasiadas para coleta do órgão vomeronasal, do fígado e da vesícula biliar, fragmento dos músculos reto femoral e vasto medial, fragmento da epífise proximal de fêmur e órgãos genitais. A pesagem dos animais mostrou não haver diferença entre a taxa de crescimento e o ganho de peso entre os quatro grupos, mas a presença do macho influenciou no peso independente da cauterização dos ductos incisivos. A avaliação da coloração da vulva não mostrou diferença entre os grupos durante o experimento. O comportamento destas fêmeas mostrou diferença no tempo de auto-catação entre os grupos na ausência do efeito do macho. Os órgãos genitais não apresentaram diferenças anatômicas e histológicas que incapacitassem as fêmeas de

gestar. O cálculo do índice hepatossomático não mostrou diferença entre os grupos. O índice gonadossomático mostrou diferença quando associado ao efeito do macho, independente da cauterização dos ductos incisivos estar ou não presente. A qualidade da carcaça se manteve a mesma para os grupos testados. O comprimento do órgão vomeronasal para os animais cujos ductos incisivos foram cauterizados foi menor que nos animais controles independente do efeito do macho. Dos três hormônios avaliados, o E₂ mostrou diferença aos 120 dias de idade entre as coletas da manhã e da noite no grupo cujos ductos incisivos foram cauterizados e submetidos ao efeito do macho e no grupo controle sem efeito do macho. Este mesmo hormônio também mostrou diferenças entre as idades na coleta do período noturno para o grupo controle sem efeito do macho. Os níveis séricos do hormônio LH noturno foram diminuindo com a idade para o grupo controle com efeito do macho, enquanto o nível sérico do FSH diminuiu com a idade para o grupo cujos ductos incisivos foram cauterizados sem efeito do macho. As coelhas do segundo experimento não mostraram alteração de comportamento frente ao macho; a capacidade de gestar, o comportamento frente aos láparos e a habilidade materna permaneceram depois da cauterização dos ductos. Estes resultados mostraram que as coelhas mantiveram a sua capacidade reprodutiva intacta ao contrário de outras fêmeas, como ratas, camundongas e porquinhas da Índia.

ABSTRACT

COELHO, Polyana Galvão Bernardes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2016. **Reproductive and behavioral parameters of female New Zealand rabbits influenced by cauterization of incisive ducts and by "male effect"**. Adviser: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisors: Eduardo Paulino da Costa, German Arturo Bohórquez Mahecha and José Domingos Guimarães.

The reproductive activity on female domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) is controlled by nervous system which, in its turn, is influenced both by internal and external means. The vomeronasal organ binds external environment and cerebrum areas responsible for reproductive and maternal behaviors. Based on these aspects, this study aimed to enlighten how reproductive and maternal behaviors and anatomy of reproductive organs would be influenced by the obstruction of incisive ducts; and how this obstruction is associated to the "male effect". For this study it was used 30 New Zealand female rabbits divided between two experiments. In the first experiment, 10 of the 20 female rabbits 50 days old had its incisive ducts cauterized. In the second experiment, 5 of the 10 female rabbits had their incisive ducts cauterized at 50 days old while the other 5 were submitted to cauterization 10 days after parturition. The female rabbits of the first experiment were divided into 4 group based on association between cauterization or not of incisive ducts and on presence or not of "male effect". The female rabbits of the second experiment were destined exclusively to reproduction. The females of the first experiment were weighted weekly, had blood samples collected every 10 days for analysis of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), 17 β -estradiol (E₂) and had their behavior evaluated by an ethogram adapted for this study. When 125 days old, these 20 females were euthanized for collection of vomeronasal organ, liver, fragments of rectus femoris and vastus medialis muscles, fragment of proximal femoral epiphysis, and reproductive organs. The weighing on the animals showed no difference between growth rate and weight gain among the 4 groups but the presence of male influenced on weight regardless of cauterization. Evaluation of coloring on the vulva showed no difference among groups during the experiment. The behavior of these female rabbits showed difference among groups in time spent on self-grooming in the absence of "male effect". The reproductive organs showed no anatomic or histological differences that could unable the females of gestating. The calculation of hepatosomatic index showed no difference between groups. The gonadosomatic index

showed difference when associated to "male effect" regardless of presence or absence of cauterization. The carcass quality was the same among tested groups. The length of the vomeronasal organ from animals with cauterized incisive ducts was lesser than from control animals regardless of "male effect". Among the three tested hormones, E₂ showed difference at 120 days old between collects in the morning and at night on the group with cauterized incisive ducts and submitted to "male effect" and on the control group without "male effect". This same hormone also showed differences between ages in the night collect for control without "male effect" group. The serum levels of nightly LH decreased with age on control with "male effect" group while serum level of FSH decreased with age on the group with cauterized incisive ducts without "male effect". The female rabbits of the second experiment showed no behavioral change in face of male; the capacity of gestating, the behavior with young rabbits and maternal skills remained after cauterization of the ducts. These results showed that female rabbits kept their reproductive ability intact in opposite to other females like rats, mice and guinea pigs. These results showed that female rabbits kept their reproductive ability intact in opposite to other females.

1. INTRODUÇÃO

A primeira função designada ao órgão vomeronasal foi a secretora (Witt e Woźniak, 2006). Com os avanços das técnicas histológicas, descobriu-se que tinha também função sensorial (Døving e Trotier, 1998).

Com o passar dos anos, estudos envolvendo o órgão vomeronasal mostraram que o mesmo levava informações do ambiente externo a áreas do telencéfalo responsáveis pelos comportamentos reprodutivos, como aceitação da monta e capacidade de gestar, e maternais, como capacidade de reconhecer a cria e de amamentar. (Adams e Wiekamp, 1984; Bargman, 1997).

Como já foi amplamente descrito, estudos sobre a presença do órgão vomeronasal na maioria dos mamíferos, esquamatas e quelônios terrestres (Planel, 1953; Rajendren et al., 1990; Døving e Trotier, 1998; Meredith, 2001; Martel e Baum, 2009; Baum, 2012), passaram a ser feitos para elucidar como este órgão age, e uma forma encontrada é comparar um animal cujo órgão foi lesado com outro cujo órgão encontra-se intacto.

Desta forma, estudos nos quais o órgão vomeronasal de machos pré-púberes foram inativados mostraram que a ativação do período genital ficou retardada. Como exemplo, bovinos Nelores cujos ductos incisivos foram bloqueados tiveram a concentração sérica de testosterona diminuída em comparação com animais inteiros, sem comportamento sexual frente a fêmeas em estro (Emerick, 2012). Em outro estudo, coelhos da raça Nova Zelândia cujos ductos incisivos foram bloqueados por meio de cauterização apresentaram concentração sérica de testosterona diminuída e comportamento mais calmo em comparação aos animais inteiros (Grondona, 2012).

Trabalhos envolvendo fêmeas com lesão do órgão vomeronasal demonstraram que porquinhos da Índia (*Cavia porcellus*) alteraram o comportamento reprodutivo e raramente ficavam gestantes (Planel, 1953), camundongas em estro não apresentam encurvamento do lombo diante do estímulo de monta do macho (Martel e Baum, 2009), assim como as ratas (Rajendren et al., 1990). Por outro lado, fêmeas de *ferrets* não apresentaram nenhuma alteração na habilidade de identificar e encontrar odores masculinos voláteis (Baum, 2012).

Ao observar a data dos trabalhos citados previamente, os mais recentes referem-se a machos, demonstrando a preferência por estudar este gênero e quais são as

consequências de lesões no órgão vomeronasal sobre estes animais. O trabalho de Baum (2012) trata de um artigo de revisão e, ao observar as referências usadas por ele, percebe-se que grande parte delas são anteriores ao ano 2000.

Ao ler estes artigos, e ao saber que a função sexual de coelhas é controlada pelo sistema nervoso central e que o mesmo recebe influência tanto do meio interno quanto do meio externo (Alvarez, 1985), algumas perguntas ficaram: Nas coelhas cujos ductos incisivos foram cauterizados a puberdade foi retardada? Caso ocorra atraso na puberdade destas fêmeas, a presença do efeito do macho reverteria esta situação? Ocorreria mudança de comportamento frente ao macho? Estas fêmeas seriam capazes de ficar gestantes? Se possível uma gestação, elas teriam boa habilidade materna? Haveria alterações anatômicas de seus órgãos genitais?

Com base nos questionamentos acima, a presente pesquisa pretendeu esclarecer como coelhas da raça Nova Zelândia reagiriam frente a estas situações. Também foi possível esclarecer se nestas fêmeas os mesmos efeitos de “castração” (animais mais calmos e com maior ganho de peso) obtidos com a cauterização e consequente obstrução dos ductos incisivos também serão encontrados assim como observado por Emerick (2012) e Grondona (2012) em machos bovinos da raça Nelore e coelhos da raça Nova Zelândia, respectivamente. Este último ponto é de grande importância para a produção animal, uma vez que a castração convencional, realizada no intuito de acalmar e melhorar o ganho de peso dos animais é mais agressiva por envolver anestesia geral e/ou local, incisões, suturas, antibioticoterapia e uso de antiinflamatórios, e na obstrução dos ductos incisivos a técnica é menos agressiva causando menos desconforto para o animal, aspectos estes de grande importância no que diz respeito ao bem estar animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ÓRGÃO VOMERONASAL

2.1.1. O que é o órgão vomeronasal (OVN)

Em 1703, o anatomista e botânico Frederic Ruysch descobriu um pequeno canal bilateral (*'canalis nasalis'*) na parte rostro-ventral do septo nasal, e atribuiu a ele função presumivelmente secretora ("*... de Cuius usu et existentia nil apud auctores legi: inservire muco excernendo existimo*") (Witt e Woźniak, 2006).

Pouco mais de cem anos após, o anatomista dinamarquês Ludvig Jacobson, em 1813, fez observações sistemáticas deste órgão, presente em vários animais e erroneamente disse que o humano parecia ser a única espécie de vertebrado na qual este órgão estava ausente (Witt e Woźniak, 2006).

Ao descrever este órgão, Jacobson constatou que ele estava presente no nariz dos mamíferos e que possuía muitas glândulas que drenam para o lume, uma dupla inervação e suprimento sanguíneo. Este órgão foi denominado órgão vomeronasal (OVN) pela Anatomische Gesellschaft, em 1895. Devido à presença das glândulas, Jacobson assumiu que o órgão era de natureza secretora, mais suspeitava que também pudesse ser um órgão sensorial. Com o advento das técnicas histológicas no século XIX, observou-se que, além de um órgão secretor, ele também era um órgão sensorial (Døving e Trotier, 1998).

O órgão vomeronasal (OVN) repousa no osso vômer, na maior parte dos vertebrados terrestres (Broom, 1987 e Negus, 1958 APUD Smith et al., 1997), dentro da cavidade nasal, envolto por uma cápsula óssea ou cartilaginosa, que se abre por meio de um ducto na base do ducto incisivo (Keverne, 1999).

Na maioria dos mamíferos, os sistemas olfatórios principal e do órgão vomeronasal e dos gânglios septais (Figura 1) utilizam diferentes caminhos para processar a informação quimiossensorial (Dulac e Kimchi, 2007). Os neurônios do sistema olfatório principal estão localizados no epitélio olfativo, no gânglio de Grüneberg e no órgão septal na cavidade nasal (Suárez et al., 2012) e se projetam para o bulbo olfatório principal, córtex olfatório e corpo amigdalóide lateral (Dulac e Kimchi, 2007). E o sistema vomeronasal se localiza no OVN e emitem projeções para o bulbo

olfatório acessório e corpo amigdalóide medial e basolateral, e depois para núcleos específicos do hipotálamo (Dulac e Kimchi, 2007).

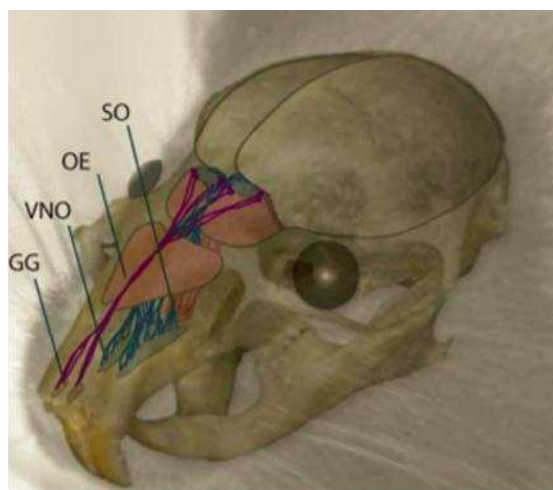


Figura 1: Ilustração esquemática do sistema olfatório principal e vomeronasal de rato. GG- gânglio de Grüneberg; OE- epitélio olfativo; VNO- órgão vomeronasal; SO- órgão septal. (Suárez et al., 2012).

O OVN funciona como unidade de recepção do sistema olfatório acessório (McCotter, 1912), sendo uma via neural exposta ao ambiente externo, e que envia informações, por meio de axônios (Adams e Wiekamp, 1984; Bargman, 1997), diretamente a áreas do diencefalo relacionadas com comportamentos reprodutivo e maternal (Adams e Wiekamp, 1984; Bargman, 1997).

Em carneiros, no reconhecimento de filhotes, o odor é detectado pelo bulbo olfatório principal e depois pelos núcleos medial e cortical do corpo amigdalóide para então alcançar a região medial préoptica que é a região envolvida na expressão do cuidado materno e aceitação do aleitamento. No caso do efeito do macho nas ovelhas, o bulbo olfatório principal também está envolvido, mas sendo somente a cortical do corpo amigdalóide responsável pelo processamento do odor masculino. O resultado final do efeito do macho é o pulso gerador de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que está parcialmente localizado no núcleo arqueado, que controla os pulsos do hormônio luteinizante (LH) e a reativação do eixo gonadotrópico como mostra a figura 2 (Keller e Lévy, 2012).

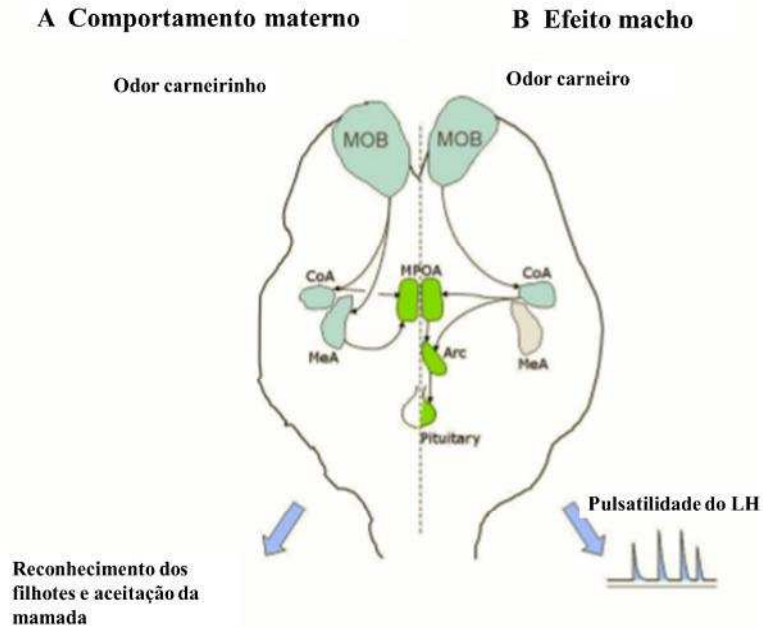


Figura 2: Representação simplificada da via olfatória principal com as áreas do cérebro responsáveis pela interpretação de informações olfativas no caso do reconhecimento de filhotes e do efeito do macho na ovelha. Arc- núcleo arqueado; CoA- cortical do corpo amigdalóide; MeA- núcleo medial; MOB- bulbo olfatório principal; MPOA- região medial préoptica (Adaptado de Keller e Lévy, 2012).

A maioria dos mamíferos possui um segundo sistema olfatório, o sistema olfatório acessório ou sistema do órgão vomeronasal (Halpern, 1987; Keverne, 1999; Brennan, 2001; Keverne, 2002), que é composto pelo OVN, nervos vomeronasais e bulbo olfatório acessório (McCotter, 1912). Além disso, os dois sistemas olfatórios possuem dois órgãos sensoriais diferentes, o epitélio olfativo (EO) e o OVN, que são utilizados para a detecção de partículas químicas, como odores e feromônios presente no meio ambiente. Os feromônios são substâncias que carregam mensagens sobre o estado fisiológico e comportamental de um membro para outro da própria espécie, o que resultará em uma reação específica (Døving e Trotier, 1998; Meredith, 2001).

Ao contrário do que se pensava antigamente, que o EO detectava partículas olfatórias em geral e o OVN detectava feromônios, sabe-se que as duas estruturas detectam os dois tipos de partículas químicas (Ubeda-Bañon et al., 2011), mostrando que ambos estão interligados (Suárez et al., 2012). O OVN detecta sinais químicos mais específicos (Wysocki, 1979) e estes sinais químicos têm sido relacionados a

comportamentos reprodutivos (Powers e Winans, 1975) e à comunicação inter e intrasexual (Wysocki e Meredith, 1987; Wysocki e Lepri, 1991).

Como dito anteriormente, nem todos os vertebrados possuem os dois órgãos olfatórios, ou seja, o EO está presente em todos os vertebrados enquanto o OVN não está presente em peixes, aves e cetáceos (Døving e Trotier, 1998), apesar de um estudo recente ter detectado em um peixe pulmonado africano (*Protopterus annectens*) a presença de um OVN primordial (Nakamuta et al., 2012). Nos humanos, ele está presente na vida fetal e, depois, entra em regressão sendo encontrado nos adultos como um vestígio, mas sem função evidente (Meredith, 2001). Vale ressaltar que o EO e o OVN são anatômica e estruturalmente diferentes um do outro (Eisthen, 1992). O OVN apresenta dimorfismo em relação a seu tamanho entre os sexos, conforme detectado em ratos por Segovia e Guillamón (1982, 1993) e Grondona (2005).

Os diferentes animais usam o OVN de várias formas, como, por exemplo, as serpentes o usam para detectar as presas ao captar os odores com a língua, quando a expõem e, ao retraírem a língua, tocam a abertura do OVN passando a mensagem (Halpern, 1987); os elefantes transferem estímulos químicos para a abertura do OVN no palato duro usando uma estrutura preênsil na ponta de sua tromba, que às vezes é chamada de “dedo”; os cavalos usam de um movimento facial diferente, chamado de reflexo de Flehmen, que dirige os compostos inalados para este órgão; e os gatos domésticos fazem caretas para examinar um perfume que lhes interessa (Meredith, 2001).

2.1.2. Qual é a sua estrutura

O OVN, nos mamíferos, é composto por um par de divertículos tubulares (Keverne, 1999) cegos (Witt e Woźniak, 2006) como mostram as figuras 3 e 4, revestidos internamente por mucosa (Keverne, 1999), com um lume em formato de meia lua (Døving e Trotier, 1998), e que possui uma parte côncava e outra convexa (Powers e Winans, 1975).

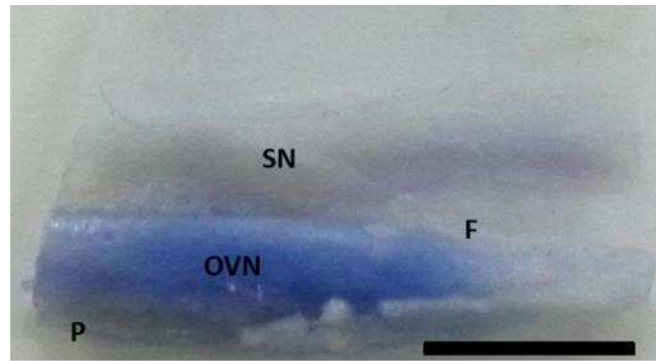


Figura 3: Preparado anatômico evidenciando o órgão vomeronasal de coelho Nova Zelândia adulto por meio de injeção de azul de toluidina. F- extremidade caudal em fundo cego; OVN- órgão vomeronasal; P- palato; SN- septo nasal. Barra: 7mm (Grondona, 2012).

Nos coelhos, pertencentes à ordem dos Lagomorfas, o OVN é bem arranjado, emparelhado e simétrico (Figura 4). O ducto do OVN abre em um poro dentro da parte ventral da cavidade nasal, com um diâmetro de 27-31,5 μ m. A comunicação com a cavidade nasal é de forma indireta por meio da abertura do ducto incisivo, e a comunicação com a boca também ocorre de forma indireta (Negus, 1956).

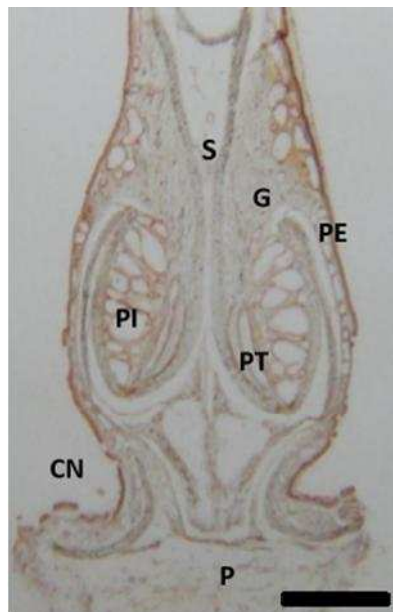


Figura 4: Secção transversal da região nasal de coelho Nova Zelândia adulto ao nível da quarta ruga palatina evidenciando a porção média do órgão vomeronasal. CN- cavidade nasal; G- glândulas túbulo-acinosas; P- palato; PE- plexo vascular externo; PE- plexo vascular externo; PI- plexo vascular interno; PT- porção tubular; S- septo nasal. Coloração: Impregnação argêntica. Barra: 3,5 μ m (Grondona, 2012).

A parte convexa é composta por um epitélio pseudoestratificado ciliado enquanto que a parte côncava é composta por um epitélio neurosensitivo especializado (Powers e Winans, 1975). Este epitélio sensorial na sua porção medial é composto por neurônios alongados e bipolares, células de suporte e células basais (Witt e Woźniak, 2006). No epitélio sensitivo, o número de neurônios aumenta até a puberdade e reduz seu número passado este período (Wilson e Raisman, 1980).

Os axônios dos neurônios se projetam através do nervo vomeronasal para o bulbo olfatório acessório, que por sua vez, se projeta para o núcleo amigdalóide medial e, em seguida, para regiões do hipotálamo onde ocorre a regulação do controle de funções neuroendócrinas do comportamento social (Witt e Woźniak, 2006).

A organização celular está relacionada com o sistema olfatório principal, mas com algumas diferenças, sendo o epitélio mais espesso e com as células receptoras possuindo micorvilosidades no lugar de cílios (Witt e Woźniak, 2006).

O OVN possui tecido cavernoso e é irrigado pela artéria septal que é um ramo da artéria esfenopalatina. Uma ou duas veias maiores correm ao longo do órgão, em um tecido em forma de cogumelo. Entre as veias encontram-se várias células de músculo liso, na parede lateral do lume do OVN (von Mihalkovics, 1899). Em ratos, camundongos e coelhos, mostrou-se com microscopia eletrônica de transmissão, que várias camadas de músculo liso envolvem a parede do seio venoso (Taniguchi e Mochizuki, 1983).

A inervação do OVN é extensa e complexa, sendo que as fibras nervosas parassimpáticas colinérgicas vindas do gânglio esfenopalatino inervam as veias e glândulas exócrinas. As fibras nervosas simpáticas adrenérgicas se originam do gânglio cervical cranial e são destinadas para os vasos sanguíneos (Ånggård et al., 1983), com o ramo maxilar do nervo trigêmeo também emitindo fibras sensoriais para o órgão (Jacobson, 1813 APUD Døving e Trotier, 1998).

2.1.3. Qual é a sua função

O OVN é o receptor periférico do sistema olfatório acessório ou vomeronasal, que funciona como um sistema sensorial químico importante na mediação dos comportamentos sociais e sexuais em muitos mamíferos (Smith et al., 2011). Tem um papel importante na relação entre indivíduos por meio da detecção de feromônios, e no reconhecimento ambiental (Houck, 2009; Su et al., 2009)

Os feromônios são captados pelo OVN, resultando em diferentes emoções e comportamentos, desencadeando respostas de conduta, desenvolvimento ou reprodução (Villem, 1994). Desta forma, pode-se dizer que o OVN atua como intermediário na quimiorrecepção dos sinais de um animal emissor por um animal receptor (French et al., 1998).

Planel (1953) observou, em porquinhos da Índia fêmeas, que, quando o órgão é lesado, as mesmas perdem a capacidade de demonstrar lordose, perdem o interesse no parceiro, e raramente ficam gestantes, enquanto Powers e Winans (1975) e Winans e Powers (1977) descobriram que lesão no OVN de hamster sexualmente imaturo foi mais aguda quando comparado com animais que já tiveram experiência sexual, nos quais os efeitos da lesão foram menos drásticos.

2.2. ANATOMIA DOS ÓRGÃOS GENITAIS DAS COELHAS

Os órgãos genitais da coelha (Figura 5) são compostos por dois ovários, duas tubas uterinas (infundíbulo, ampola e istmo), dois cornos uterinos (hemi-útero), duas cérvix, vagina, vestibulo e vulva.

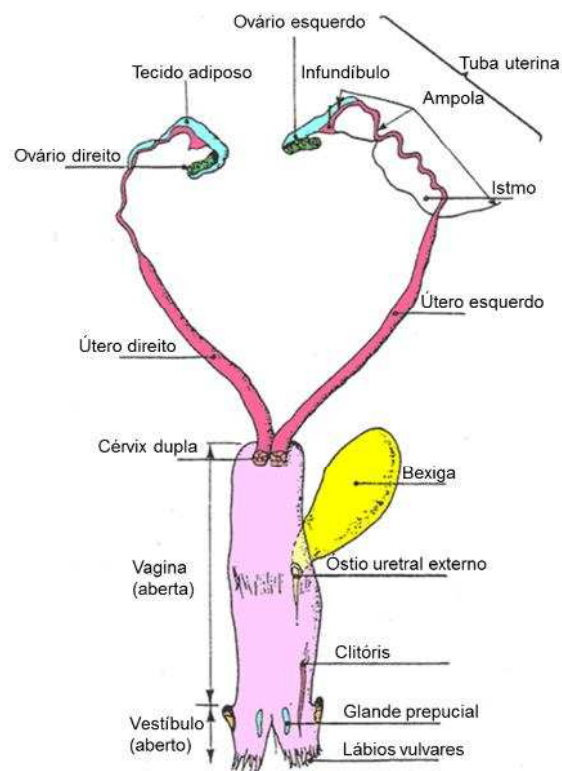


Figura 5: Representação esquemática dos órgãos genitais da coelha (Adaptado de Lebas, 2002).

2.2.1. Ovários

Os ovários são órgãos pares localizados na altura da 5ª vértebra lombar, na cavidade abdominal, equidistante da última vértebra e da crista ilíaca, e a 1cm da borda lombar (Alvarez, 1985). Nem sempre os ovários estão em situação simétrica (Alvariño, 1993), sendo que a borda cranial do ovário esquerdo está cerca de dois centímetros do rim ipsilateral, enquanto o ovário direito está cerca de 2,5 cm do rim ipsilateral (Alvarez, 1985). Os ovários se fixam dorsalmente na cavidade abdominal pelo mesovário, que é uma prega de peritônio (Alvariño, 1993). Ambos os ovários são elípticos, alongados, de coloração amarelado claro (Alvarez, 1985), e a sua superfície é ligeiramente tuberosa (Alvariño, 1993). Os ovários podem chegar a atingir de 1 a 2 cm, com peso variando de 0,2 a 1 grama. Nas coelhas em atividade reprodutiva, o peso médio do ovário direito é de 0,326 gramas e do ovário esquerdo é de 0,332 gramas (Alvariño, 1993).

A região parenquimatosa do ovário é muito desenvolvida e espessa, enquanto a região vascularizada é mais delgada, ricamente vascularizada e innervada (Alvarez, 1985). O tecido conjuntivo dessa porção apresenta continuidade com o mesovário, na região do hilo ovariano (Alvariño, 1993). A região parenquimatosa é composta por células intersticiais ovarianas, que são as responsáveis por secretar os esteroides sexuais, e células musculares lisas, que estão dispersas ou agrupadas na periferia dos folículos (Alvariño, 1993).

A albugínea ovariana não é muito resistente por ser pouco desenvolvida, o que explica a velocidade com que se desenvolve a ovulação (Alvarez, 1985). Nos ovários, desde a vida intrauterina até a puberdade, só se encontra um único tipo de folículo ovariano, os folículos primordiais. O número destes folículos diminui progressivamente, desde a vida intrauterina até o nascimento, por meio do processo degenerativo de atresia folicular (Alvariño, 1993).

Após o nascimento, os ovários apresentam uma taxa de desenvolvimento significativamente menor comparada com a do corpo. Uma aceleração nesta taxa de desenvolvimento é observada por volta de 50-60 dias de vida (Lebas, 2002).

Ao contrário do que acontece com as outras espécies de mamíferos domésticos, as coelhas não nascem com todos os folículos primordiais formados. Nestes animais, a maioria dos folículos primordiais forma-se no período pós-natal, por volta de duas ou três semanas de idade (Peters et al., 1965; Hutt et al., 2006). A partir da puberdade

muitos folículos primordiais crescerão fazendo com que folículos de diferentes graus de desenvolvimento sejam encontrados no ovário (Alvariño, 1993). Os folículos encontrados nos ovários podem definir cinco estádios morfológicos principais (primordiais, primários, secundários, terciários e pré-ovulatórios), os quais, por sua vez, podem ser agrupados em relação ao momento de formação do antro folicular, em folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios) (Arias-Álvarez et al.; 2007). Além dos cinco estádios acima, existe o estádio de transição que se encontra entre o primordial e o primário. Cada estádio morfológico é caracterizado da seguinte forma:

Folículo primordial: é aquele composto por um ovócito no início da prófase da primeira divisão meiótica (Alvariño, 1993), circundada por um epitélio pavimentoso (Priedkalns e Leiser, 2006), derivado do epitélio germinativo do ovário (Alvariño, 1993) cujas células são unidas entre si e ao ovócito por meio de junções do tipo GAP, as quais permitem o intercâmbio de pequenas moléculas, sinalização ou nutrientes (Kennedy et al., 2003). Neste momento, o diâmetro do folículo e do ovócito é de 30-44 μm e 30 μm , respectivamente (Hutt et al., 2006).

Folículo de transição: é aquele folículo primordial que começou a se desenvolver e ainda não tem todas as características do folículo primário. Ele apresenta crescimento ovocitário e algumas células foliculares apresentam crescimento e alteração de sua morfologia, passando a ser encontradas células dos tipos pavimentosa e cúbica (Silva et al., 2004).

Folículo primário: é formado por um ovócito circundado por um epitélio simples cúbico de células foliculares (Priedkalns e Leiser, 2006). Neste estádio, o folículo apresenta um diâmetro de, aproximadamente, 100-120 μm (Hutt et al., 2006). O ovócito exhibe, neste estádio, um grande crescimento, chegando a medir 60 μm (Arias-Álvarez et al., 2007).

Folículo secundário: é aquele composto por um ovócito que atingiu o seu maior volume (Alvariño, 1993), alcançando um tamanho máximo de 80-104 μm (Kranzfelder et al., 1984, Macchiarelli et al., 1992), encontrado no centro do folículo (Alvariño, 1993) e circundado por duas ou mais camadas de células foliculares, formando a camada da granulosa (Priedkalns e Leiser, 2006). O diâmetro médio destes folículos é de 200 μm (Pincus e Enzmann, 1935). Nesta fase, as camadas de células foliculares que formam a camada granulosa que envolve o ovócito multiplicam-se rapidamente,

podendo evidenciar as células da teca ao redor das células da granulosa (Kranzfelder et al., 1984, Macchiarelli et al., 1992).

Folículo terciário: é composto por um ovócito circundado por um epitélio estratificado de células foliculares, a camada da granulosa. Estas células da granulosa são envoltas por uma camada multilaminar de células especializadas, chamadas de teca. Nestes folículos, ocorre a formação de cavidades cheias de líquidos, denominadas de antro, entre as células da granulosa (Priedkalns e Leiser, 2006). O líquido folicular presente no antro é produzido pelo metabolismo das células foliculares (Arias-Álvarez et al., 2007). Neste estágio, o folículo apresenta um diâmetro maior que 200-250 μm (Kranzfelder et al., 1984, Hutt et al., 2006) e o ovócito alcança 133-135 μm (Jelinkova et al., 1994).

Folículo pré-ovulatório: é aquele que apresenta um antro bem desenvolvido, uma camada granulosa bem delgada revestindo o antro folicular (Alvariño, 1993). Os folículos neste estágio apresentam um diâmetro superior a 800-900 μm (Kranzfelder et al., 1984), e o ovócito mede entre 140-143 μm (Jelinkova et al., 1994). O antro folicular acumula grande quantidade de fatores de crescimento, hormônios peptídeos e esteroidais, proteínas, metabólitos energéticos, dentre muitas outras substâncias desconhecidas (Sutton et al., 2003). A camada granulosa que envolve o ovócito recebe o nome de *cumulus oophorus* (Alvariño, 1993).

Os folículos primordiais começam o crescimento por volta de 65-70 dias de idade (Lebas, 2002). Alguns dos folículos que completam a maturação folicular seguirão para o processo de ovulação enquanto os demais sofrerão atresia (Alvariño, 1993). O número de folículos pré-ovulatórios tende a aumentar até a 17ª semana de vida, quando este número se torna similar ao número de folículos pré-ovulatórios encontrados em fêmeas múltiparas (Gosalvez et al., 1989). Nas coelhas o tempo médio que o folículo demora a tornar-se pré-ovulatório é de aproximadamente 97 dias, ou seja, um folículo com 100 μm demoraria, em média, 97 dias para atingir 950 μm (Mariana et al., 1989).

O folículo pré-ovulatório, no momento da ovulação, tem sua parede rompida na região do estigma, que é a porção do folículo que sobressai na parede do ovário, sendo de aspecto transparente. Quando o estigma se rompe, ocorre a liberação do fluido folicular e do ovócito, que horas antes da ruptura folicular reiniciou a meiose, convertendo-se em um ovócito secundário, com número haploide de cromossomos. O

restante do folículo transforma-se em corpo lúteo por diferenciação das células da granulosa e da teca interna em células luteínicas, as quais são responsáveis pela produção de progesterona (Alvariño, 1993).

Após a ovulação, ocorre hemorragia. Este sangue acumula-se na zona central do corpo lúteo na forma de um coágulo, e este, junto à intensa vascularização confere a cor vermelha ao corpo lúteo (Alvariño, 1993).

Se o ovócito ovulado for fecundado, o corpo lúteo persistirá durante a gestação. Caso contrário, o corpo lúteo transformar-se-á em corpo *albicans* no final do período de pseudogestação, que dura, aproximadamente, 16 dias (Alvariño, 1993). Na ausência de cobertura ou de estimulação hormonal, sucessivos folículos pré-ovulatórios podem tornar-se atrésicos e serem reabsorvidos pelo córtex ovariano (Arias-Álvarez et al., 2010), observação essa interessante, já que as coelhas não cobertas ou estimuladas hormonalmente não ovulam espontaneamente e não possuem pseudogestação (Theau-Clement et al., 2000, Rebollar et al., 2008).

2.2.2. Tubas uterinas

As tubas uterinas são órgãos pares, tortuosos, delgados, que se iniciam nas proximidades dos ovários e terminam no útero (Alvarez, 1985). Elas são as responsáveis pela captação dos ovócitos liberados pelos ovários e nelas ocorre a fecundação (Alvariño, 1993). O comprimento das tubas uterinas pode variar de 8 a 10 cm (Alvarez, 1985).

A porção mais cranial é o infundíbulo, cujo formato lembra um funil, com bordas contendo fimbrias (Alvariño, 1993). Devido ao seu posicionamento ventromedial ao ovário e à sua borda dilatada, o infundíbulo é capaz de cobrir quase que inteiramente o ovário (Alvarez, 1985).

O infundíbulo dá acesso a uma zona dilatada, denominada ampola. É nesta região que ocorre a fecundação (Alvariño, 1993). A primeira parte da ampola é ondulada e depois, torna-se flexuosa (Alvarez, 1985).

A porção final, e que está em contato com o útero, é o istmo. Este nome deve-se a seu pequeno diâmetro (Alvariño, 1993). O diâmetro do istmo (1 mm) é menor que o da ampola (3 mm). O istmo é quase duas vezes mais curto, mas apresenta flexuosidades mais numerosas, ainda que de amplitude moderada (Alvarez, 1985). Seu comprimento varia de 2 a 4 cm (Alvariño, 1993).

A união da tuba uterina com o útero é de fácil identificação. O óstio uterino da tuba uterina está rodeado por pequenas carúnculas de mucosa, que formam quatro fileiras divergentes no útero (Alvarez, 1985).

2.2.3. Útero

O útero é formado por dois canais ou cornos distintos (útero duplex). A porção cranial é sacular e tem de 10-12 cm de comprimento, com 4-6 cm de diâmetro, enquanto que a extremidade caudal atinge uns 8-9 cm de comprimento. Cada útero (hemi-útero) termina, de forma independente, na porção cranial da vagina (Alvarez, 1985), sendo a cérvix um espessamento do miométrio atravessado pelo canal cervical e sem a presença de glândulas (Alvariño, 1993). Cada cérvix tem cerca de 15-20 mm de comprimento e a extremidade que se sobressai na luz vaginal tem uns 3-4 mm de comprimento (Alvarez, 1985).

A parede do útero é formada por três camadas ou túnicas: mucosa, muscular e serosa (Alvariño, 1993). A camada mucosa ou endométrio apresenta grande desenvolvimento de glândulas e numerosas células ciliadas (Alvarez, 1985). A camada muscular ou miométrio é formada por dois estratos de fibras lisas, sendo o mais interno formado por fibras circulares e mais espessas e o mais externo por fibras longitudinais. As duas camadas de fibras musculares encontram-se incompletamente separadas por um estrato vascular que irriga o próprio útero. A camada serosa é uma prega de peritônio que recobre o útero e se prolonga no mesentério (Alvariño, 1993).

2.2.4. Vagina

A vagina é um conduto virtual alongado e dilatado no sentido craniocaudal. Tem cerca de 4-7 cm de comprimento e 10-12 mm de diâmetro. Apresenta mucosa rosada, com pregas em sentido longitudinal (Alvarez, 1985) e desprovida de glândulas (Alvariño, 1993). Na sua porção cranial, observam-se as duas cérvix, separadas por uma fenda profunda (Alvarez, 1985).

A continuação caudal do conduto vaginal com 4-6 cm de comprimento é denominada de vestíbulo, e está situada cranialmente ao arco isquiático e ventralmente ao reto, com o qual se relaciona estreitamente na região coccígea. Apresenta mucosa lisa e de coloração avermelhada. O óstio uretral externo abre-se no vestíbulo e está

coberto por uma prega transversal, cujos extremos laterais perdem-se nas paredes da vagina (Alvarez, 1985).

2.2.5. Vulva

A vulva é a terminação do canal genital e é formado por uma fenda com dois grandes lábios, em cuja comissura ventral está localizado o clítoris, órgão com capacidade sensorial, homólogo ao pênis, e guarnecido por dois corpos cavernosos, que o conferem a capacidade de ereção (Alvariño, 1993). Além dos grandes lábios, que são externos, existe um outro lábio, pequeno e interno. Nas coelhas adultas, a vulva pode chegar a 1cm (Alvarez, 1985). A vulva possui glândulas sebáceas e sudoríparas, além de pelos (Alvariño, 1993).

A coloração da vulva (pálida, rosa, vermelha e violeta) está relacionada com a receptividade sexual das fêmeas ao macho no momento da monta (Boucher et al., 1988). A cor vermelha corresponde a um estado de estro e, conseqüentemente, com as mais altas porcentagens de fertilidade, seguida das cores rosa, violeta e pálida (Martín Bilbao, 1996).

2.3. FISILOGIA DA REPRODUÇÃO EM COELHAS

2.3.1. Mecanismos hormonais na reprodução

A reprodução nas espécies domésticas é controlada pelo sistema nervoso central (SNC) e pelo sistema endócrino, que se ligam por meio do hipotálamo, formando o sistema hipotálamico-hipofisário. O sistema neuroendócrino inicia, coordena e regula as funções do sistema genital, mas ele não é capaz de explicar todos os fenômenos envolvendo os órgãos genitais (Hafez et al., 2004).

O sistema nervoso controla as funções orgânicas por meio de impulsos nervosos elétricos. O sistema endócrino utiliza mensageiros químicos ou hormônios para regular os processos orgânicos mais lentos (Hafez et al., 2004).

Nas coelhas, o controle da função sexual está a cargo do sistema neuroendócrino. O diencéfalo é a sede dos centros sexuais e se conecta por meio de terminações dendríticas com a córtex cerebral e órgãos dos sentidos, por onde recebe estímulos vindos do meio externo. O diencéfalo se comunica com a hipófise por meio

do hipotálamo. Com isso, pode-se explicar a integração entre as influências externas e internas na ação neuro-endócrina (Alvarez, 1985).

O eixo hipotálamo-hipófise-gônada está envolvido no controle da ovulação e no comportamento sexual, mediante uma série de mecanismos complexos de *feedback*, tanto hormonais como nervosos. A secreção do GnRH pelo hipotálamo estimula a síntese e a liberação de hormônios gonadotrópicos (FSH e LH) por parte da adenohipófise. O hormônio FSH favorece o desenvolvimento folicular, enquanto o LH atua sobre o período final de desenvolvimento folicular e induz a ovulação dos folículos pré-ovulatórios (Arias-Álvarez et al., 2007).

Os hormônios esteroidais, principalmente estrógeno e progesterona, secretados pelos folículos e corpo lúteo respectivamente, exercem por sua vez um *feedback* positivo ou negativo sobre o GnRH, FSH e LH (controle de retroalimentação) (Theau-Clemente, 2000).

Fatores como manejo, nutrição e o ambiente podem gerar, nas coelhas, diferentes estímulos auditivos, olfatórios, visuais e estressantes, que geram sinais neuromoduladores que influenciam a secreção hormonal pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada e permitem modificar, de forma positiva ou negativa, os parâmetros reprodutivos (Theau-Clement, 2000; Boiti, 2004).

A concentração plasmática do FSH nas coelhas aumenta com a idade e, ao atingir 20 semanas, a concentração é a mesma encontrada em fêmeas adultas. Este incremento pode ser devido ao aumento do número de folículos pré-ovulatórios. Quando as coelhas atingem 17 semanas de idade, o número de folículos pré-ovulatórios já não aumenta, mas a concentração de FSH e a pulsatilidade continua subindo até as 20 semanas. Com isso, além da influência dos folículos pré-ovulatórios, devem existir outros mecanismos envolvidos. A diferença na pulsatilidade do FSH pode sugerir que, entre essas idades, ocorram mudanças importantes na fisiologia sexual das coelhas (Diaz et al., 1991).

O LH, ao contrário do FSH, não apresenta diferenças entre as idades de 14, 17 e 20 semanas, o que pode sugerir a existência de diferentes mecanismos de regulação da secreção para estes dois hormônios. O incremento na amplitude dos pulsos do LH é menor que do FSH, mas deve ser o suficiente para justificar o aumento com a idade de fêmeas que ovulam (Diaz et al., 1991).

O 17 β -estradiol é um regulador endógeno da função reprodutiva por agir na maturação folicular e nos centros hipotalâmicos-hipofisários (Monniaux et al., 2009). Fêmeas que estão receptivas à cobertura pelo macho apresentam concentração de 17 β -estradiol superior àquelas que recusam a cobertura, o que demonstra a relação estreita entre o 17 β -estradiol e a receptividade sexual (Mazouzi-Hadid et al., 2011).

Os estímulos nervosos de âmbito emocional, como o coito, chegam ao hipotálamo, onde acarretarão a secreção do fator de liberação de LH (Alvarez, 1985) e, com isso, haverá uma descarga de LH entre 60 e 120 minutos (Rodríguez, 2004; Brecchia et al., 2006). O aumento da concentração de LH no sangue ocorre em harmonia com o aumento da concentração de FSH, que influenciará a maturação folicular final e reforçará a ação do LH. Desta forma, desencadeia a ovulação (Alvarez, 1985), que ocorrerá entre 10-12 horas após o acasalamento (Foote e Carney, 2000; Brewer, 2006).

Como a ovulação é induzida e não espontânea, assim como na gata, a coelha não possui picos pré-ovulatórios de LH em resposta a níveis elevados de estrógenos (Bakker e Baum, 2000; Brecchia et al., 2006). Não existe, portanto, o *feedback* positivo sobre o LH hipofisário (Rebollar et al., 2008). O coito, embora induza a ovulação em fêmeas em estro, o mesmo não é capaz de induzir ovulação em fêmeas gestantes, pseudo-gestantes e naquelas que não aceitam o macho e foram forçadas a realizar o coito (Figura 6) (Alvarez, 1985).

Nas coelhas não fecundadas, ocorre a formação do corpo lúteo de forma rápida com conseqüentemente atrofia e, durante este período ocorrerá a liberação da prostaglandina F_{2 α} produzida no útero. Esta prostaglandina atua favorecendo a lise do corpo lúteo, o que colaboraria com a próxima maturação folicular (Alvarez, 1985).

Em coelhas gestantes, os níveis hormonais são mantidos pelo corpo lúteo, mas, a partir do 5º dia de gestação, também são necessárias pequenas quantidades de 17 β -estradiol, estrona e estriol para conservar a persistência do corpo lúteo. Próximo ao parto, o nível de progesterona sofre uma redução suficiente para permitir o incremento da atividade de um novo folículo (Alvarez, 1985).

Fêmeas lactantes, que são separadas de seus lãparos, inicialmente demonstrariam redução do nível de prolactina, o que desbloquearia a liberação de FSH e, conseqüentemente, o estímulo ao desenvolvimento folicular, com grande produção de

foliculos pré-ovulatórios, o que causaria grande liberação de estrógenos, aumentando a receptividade da coelha (Vega et al., 2012).

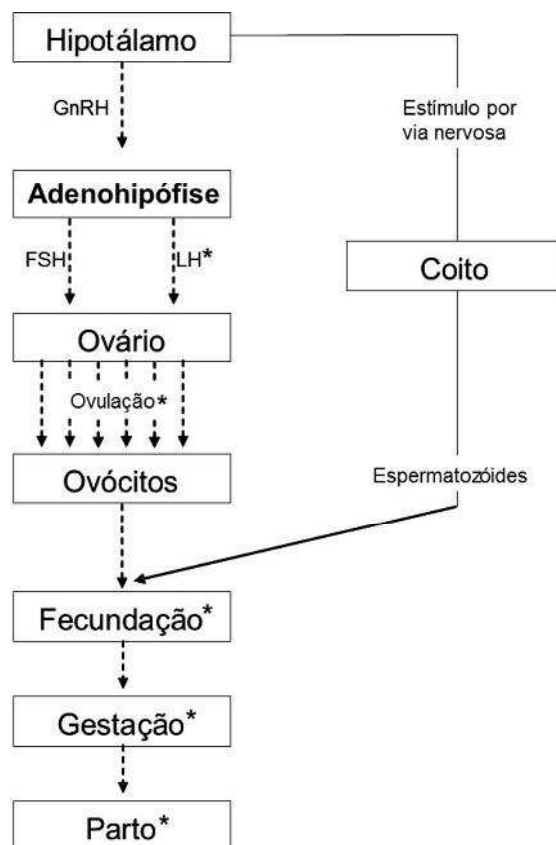


Figura 6: Esquema da fisiologia reprodutiva da coelha. Destaque (*) para os pontos desencadeados pelo coito (Adaptado de Alvariño, 1993 e Lebas et al., 1996).

2.3.2. Desenvolvimento orgânico da reprodução

O período de gestação nas coelhas varia de 30 a 32 dias (Alejandre, 1988). Durante este período, a diferenciação das gônadas nos embriões começa entre os dias 14-15 de gestação (Alvarez, 1985), e a partir deste momento até o dia 21, terão início as divisões gonadais (Lebas et al., 1996).

Os primeiros folículos primordiais surgem ao redor do 13º dia de vida (Alvarez, 1985) e os primeiros folículos antrais surgem por volta de 65-70 dias de vida, não sendo estes capazes de ovular (Lebas et al., 1996). As coelhas são introduzidas na atividade reprodutiva quando, além de apresentarem desenvolvimento corporal adequado, também tenham condições orgânicas mínimas. Com isso, pode-se dizer que para atingir

a puberdade, ou seja, momento em que começa a atividade germinal, é necessário avaliar vários fatores, como raça, peso, data de nascimento etc. (Alvarez, 1985; Lebas et al., 1996), já que estas fêmeas apresentam comportamento sexual (aceitação de monta) muito antes que a capacidade de ovular e suportar uma gestação (Lebas et al., 1996).

Associado a uma alimentação adequada, o fotoperíodo e a temperatura também influenciam na conduta reprodutiva das coelhas (Alvarez, 1985). A duração de 11-16 horas de fotoperíodo é o necessário para as coelhas, mas, além da duração, o comprimento de onda curto dos raios também influencia o comportamento reprodutivo (Alvarez, 1985). Sabe-se que, depois de 7-8 dias com um programa de luz com 8 horas de luz e 16 horas de escuro e um incremento de 8 para 16 horas de luz previamente à inseminação, ocorre melhora na produtividade das coelhas (Gogol, 2009; Vega et al., 2012). Também foi comprovado que luz amarelo-avermelhada é mais sexualmente estimulante. Temperaturas extremas não favorecem a cobertura, sendo as temperaturas de 15-18 °C as mais favoráveis (Alvarez, 1985).

A idade das fêmeas é outro fator muito importante, já que coelhas que chegam à puberdade com desenvolvimento corporal adequado estão aptas a reproduzirem-se até, aproximadamente, os 5 anos de idade (Alvarez, 1985).

2.3.3. Funcionamento da atividade reprodutiva

O comportamento sexual da coelha é dividido em três momentos: pré-puberal, funcional e de debilidade da função reprodutiva. O momento funcional ou de plenitude sexual é o período de rendimento ótimo da coelha e se estende dos 2-4 meses até os 2-5 anos. Após os cinco anos, a função sexual entra na fase regressiva ou pode ocorrer o desaparecimento total (Alvarez, 1985).

Durante o desenvolvimento folicular, estão implicadas grandes quantidades de fatores endócrinos e parácrinos, fazendo com que ocorra a distinção de dois períodos em relação à influência das gonadotropinas hipofisárias LH e FSH: fase folicular independente de gonadotropinas e fase folicular dependente de gonadotropinas (Arias-Álvarez et al., 2007).

Na fase folicular independente de gonadotropinas, ocorre o desenvolvimento lento dos folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários), que parece ser independente de FSH e LH (Figura 7). Durante este período, prevalece a regulação intraovariana e intrafolicular devido a fatores parácrinos e autócrinos (Arias-Álvarez et

al., 2007), mas pode, também, existir uma possível ação de FSH em nível basal sobre o desenvolvimento destes folículos e na competência de seus ovócitos (Adriaens et al., 2004).

Na fase folicular dependente de gonadotropinas, os folículos antrais (folículos terciários e pré-ovulatórios) necessitam da ação das gonadotropinas FSH e LH para se desenvolverem. A ação das gonadotropinas é por sua vez modulada por fatores de crescimento locais, inibina, ativina e hormônio do crescimento (GH), que também atuam sobre o ovócito e sobre as células foliculares (Van de Hurk, 2005). O hormônio FSH estimula a produção de fatores de crescimento (EGF, TGF α , IGFs) além de suprimir a expressão de genes indutores de apoptose (Smitz et al., 2001). E nas coelhas é necessário que o folículo esteja íntegro para exercer sua função anti-apoptótica (Maillet et al., 2002).

Existem duas teorias quanto ao ciclo sexual das coelhas. A teoria do ciclo sexual contínuo é dividida em duas fases, uma folicular e outra luteínica (Figura 7). Na fase folicular, existem folículos desenvolvidos, em condições de ovular de maneira ininterrupta (Hammond e Marshall, 1925; Alvarez, 1985), enquanto que a fase luteínica só acontece quando ocorre a monta (Boussit, 1989). Já na teoria do ciclo sexual descontínuo, o ovário da coelha está em atividade permanente, mas, somente quando o folículo está totalmente desenvolvido a fêmea aceita o macho, acontecendo a cobertura com posterior ovulação (Alvarez, 1985). Esta teoria, então, defende que a coelha alterna estados de maior e menor receptividade sexual (Hill e White, 1933).

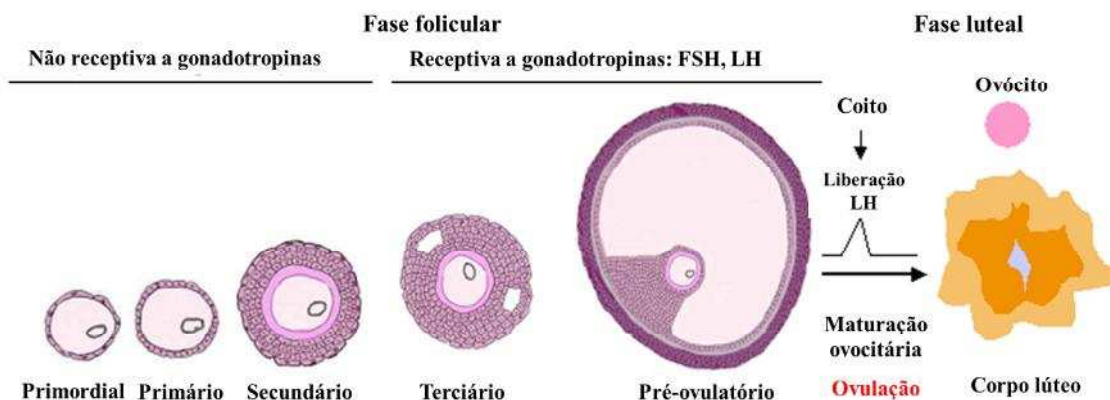


Figura 7: Representação esquemática do desenvolvimento folicular e ovulação em coelhas. Destaque para associação do desenvolvimento folicular com as diferentes fases foliculares (Adaptado de Mermillod et al., 1999).

A diferença de comportamento sexual com maior e menor receptividade parece estar relacionada com as ondas de crescimento folicular que acontecem no ovário, com a onda de crescimento folicular durando uns 10-12 dias, com sobreposição de 4-6 dias entre um ciclo e o seguinte (Alvariño, 1993; Arias-Álvarez et al., 2007). Quando o ovário apresenta muitos folículos pré-ovulatórios, grande quantidade de 17β -estradiol é produzida, com isso, a coelha torna-se receptiva (Boussit, 1989).

O ciclo sexual, nas fêmeas selvagens, é caracterizado como descontínuo e de fotoperíodo crescente, enquanto as fêmeas utilizadas na exploração industrial têm o ambiente controlado fazendo com que as coelhas manifestem atividade reprodutiva continuamente. As coelhas, assim como as gatas, e diferentemente das demais fêmeas de mamíferos domésticos, têm a sua ovulação induzida e dependente de uma série de mecanismos desencadeantes, em que o coito tem papel fundamental. As coelhas não apresentam sinais externos de comportamento sexual de fácil diagnóstico (Alvarez, 1985).

A ovulação é dependente de estímulo nervoso adequado, percebido pela coelha no momento da monta ou cobertura. Durante a última fase de maturação folicular e no momento da ovulação, grande quantidade de estrógeno altera os órgãos genitais femininos, favorecendo a progressão do ovócito e o encontro com o espermatozoide. A ovulação não só é uma consequência direta da cobertura, mas depende, em grande parte, da excitação sexual e de outros estímulos nervosos (Alvarez, 1985) que atuam em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Vega et al., 2012), como modificação brusca das condições ambientais, estímulos elétricos cerebrais e lombossacrais, e estímulos mecânicos vaginais (Alvarez, 1985).

Um exemplo de mudança brusca de ambiente é quando coelhas nulíparas são trocadas de gaiolas e o estresse da mudança de ambiente causa descarga hormonal. Quando esta mudança é feita 48 horas antes da inseminação artificial, a fertilidade melhora (Rebollar et al., 1995), embora estes efeitos sejam quase nulos nas fêmeas primíparas (Vega et al., 2012).

O infundíbulo, por meio da corrente no sentido craniocaudal, produzida pelos movimentos das células ciliadas da parede interna da tuba uterina e pelos movimentos de contração e dilatação da própria tuba uterina proporcionam uma pressão negativa que favorece a captura do ovócito, que já apresenta um movimento descendente vindo do ovário. Os ovócitos chegam à porção média da tuba uterina (a ampola), ampola, onde a

fecundação ocorre e os ovócitos podem permanecer neste local por até 36 horas. A fecundação ocorre, em média, de meia a uma hora após a ovulação e, passadas nove horas da ovulação, torna-se difícil a fecundação (Alvarez, 1985).

Caso não ocorra gestação, ocorrerá a pseudogestação, caracterizada por uma longa fase de metaestro. Esta pseudogestação acontece porque os corpos lúteos duram 15-16 dias e, conseqüentemente, as interações hormonais retardam o desenvolvimento de novos folículos, além de provocarem alterações genitais que fazem com que a coelha tenha comportamento de gestante (falsa gestação). Ao final da fase luteínica, as coelhas apresentam manifestações típicas de preparação para o parto (ansiedade, retirada de pelo, lactopoiese, etc.) e, assim que o período da pseudogestação termina, a coelha volta a regular-se, já que o ovário sempre tem folículos em maturação e capazes de ovular (Alvarez, 1985).

2.3.4. Comportamento reprodutivo

A diferenciação sexual nos embriões ocorre por volta dos 15-17 dias após a fecundação dos ovócitos (Alvarez, 1985), mas as fêmeas só começam a demonstrar comportamento sexual por volta das 12 semanas de vida, quando inicia a aceitação da monta do macho, sem desencadear ovulação (Lebas, 2002). Para se evitar montas ineficazes, deve-se levar em consideração o desenvolvimento corporal e a idade das fêmeas.

Outro ponto que influencia é o fator racial, pois raças pequenas ou médias (4-5 kg de peso na idade adulta) aceitam a cobertura do macho mais precocemente quando comparada as raças pesadas (6-8 kg de peso na idade adulta). O desenvolvimento corporal próprio da raça deve ser levado em consideração já que as coelhas podem apresentar atividade sexual, tornarem-se gestantes, mas não estarem preparadas para manter a gestação e sofrem um desgaste orgânico prematuro (Lebas, 2002).

O estado fisiológico da coelha influencia no comportamento reprodutivo. Coelhas em lactação ou em pseudogestação têm seu comportamento sexual indiretamente controlado pelo equilíbrio hormonal hipotálamo-hipófise (Alvarez, 1985). O estado nutricional também influencia, pois animais em desequilíbrio nutricional podem alterar o comportamento sexual e ser uma das principais causas do fracasso gestacional por alterar a produção de ovócitos, a taxa de gestação e a mortalidade

embrionária (Vega et al., 2012). Além do estado fisiológico, a consanguinidade também causa redução da fertilidade, com conseqüente fracasso reprodutivo (Alvarez, 1985).

Coelhas em equilíbrio hormonal adequado não aceitam o macho na primeira tentativa deste, principalmente as coelhas jovens. É necessário tempo para que ocorra reconhecimento mútuo e percepção imprescindível para que se originem os estímulos neurovegetativos capazes de promover a aceitação do macho. Passado o receio de ambos, o macho geralmente toma a iniciativa. Se a fêmea estiver em estado de maturação folicular completo, a coelha tentará realizar a monta no macho (Alvarez, 1985).

Quando machos desconhecidos são colocados com coelhas, a mesma se excita, com manifestações de autodefesa, que podem chegar a ataques e brigas, principalmente se o seu estado reprodutivo for impróprio. Se a coelha em estro for colocada com um macho experiente e aceita a sua companhia, a mesma mostra-se receptiva, adotando a postura de acasalamento, percebida com: imobilidade e levantamento do terço caudal do corpo ao perceber a monta. Esta postura facilita o coito, que é feito de maneira rápida (Alvarez, 1985).

Algumas fêmeas receptivas ao macho, quando acariciadas ao longo do dorso, instintivamente elevam o terço caudal do corpo. Este ato reflexo de levantamento do terço caudal do corpo é um sinal funcional do seu estado fisiológico sexual. Coelhas que não aceitam o macho tendem a fugir e não suportam as carícias no terço caudal, que é deslocado até o chão da gaiola, situam-se nos cantos e podem até adotar uma atitude agressiva. Quando nesta situação, as fêmeas não devem ser forçadas a acasalar, pois os ovários das mesmas não apresentam folículos capazes de ovular (Alvarez, 1985).

O efeito do macho, em diferentes espécies domésticas, está relacionado, em parte, com os feromônios, que são substâncias químicas que os animais excretam na urina, nas fezes ou por glândulas cutâneas e que causam reações específicas no indivíduo que as recebe (Vega et al., 2012), como mudança de comportamento e/ou no sistema endócrino e/ou nos órgãos genitais (Rekwot et al., 2001).

A resposta sexual da coelha para os estímulos visual, acústico/auditivo e olfatório vindos do macho são pouco compreendidos (Bakker e Baum, 2000). Alguns autores dizem que a coelha emite sinais específicos, que atraem os machos e os informa sobre seu estado sexual (Hudson e Distel, 1990; McNitt, 1992). Já as trocas olfativas entre os machos e as fêmeas são pouco estudadas, mas sabe-se que os feromônios

segregados pelas glândulas sebáceas dos machos podem induzir a receptividade da fêmea (Franck, 1966). Nas coelhas nulíparas, a presença do macho contribui para o aumento da taxa de acasalamento (Lefèvre et al., 1976) e de fertilidade (Berepudo et al., 1993).

As granjas de produção, atualmente, utilizam a inseminação artificial, e o macho não está presente. Conseqüentemente, esta bioestimulação não é utilizada na prática (Vega et al., 2012). A exposição das fêmeas ao macho por curtos períodos (de 4 horas a 4 dias) antes da inseminação artificial não melhora a receptividade das coelhas lactantes (Theau-Clement, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS INCISIVOS NOS ÓRGÃOS GENITAIS, NO COMPRIMENTO DO OVN, NO COMPORTAMENTO E NA COMPOSIÇÃO MUSCULAR E ÓSSEA DE COELHAS NOVA ZELÂNDIA

O presente experimento foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV) (Protocolo de registro na CEUA: 087/2013), que segue a legislação vigente. O médico veterinário responsável pelo experimento foi o professor Laércio dos Anjos Benjamin, CRMV-MG 3387.

3.1.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no município de Viçosa (latitude 20°45'14" sul e longitude 42°52'55" oeste), localizado na Zona da Mata de Minas Gerais, com altitude de 648 metros e clima do tipo tropical de altitude, com chuvas durante o verão, e temperatura anual em torno de 19°C.

O período experimental foi de março de 2013 a junho de 2013, e o experimento se desenvolveu no Laboratório de Biologia da Reprodução (LABER) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, no Coelhil do Departamento de Veterinária/UFV e no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia/UFV, campus de Viçosa, enquanto a parte laboratorial foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária/UFV.

3.1.2. Animais

Foram utilizadas 20 coelhas da raça Nova Zelândia, pré-púberes e jovens com idade de 50 dias, separadas em dois grupos com 10 animais cada: um grupo com os ductos incisivos cauterizados e outro com os ductos incisivos intactos. Cada um destes grupos foi dividido em dois subgrupos com cinco animais cada: um na presença do efeito do macho e outro longe do efeito do macho (Figura 8).

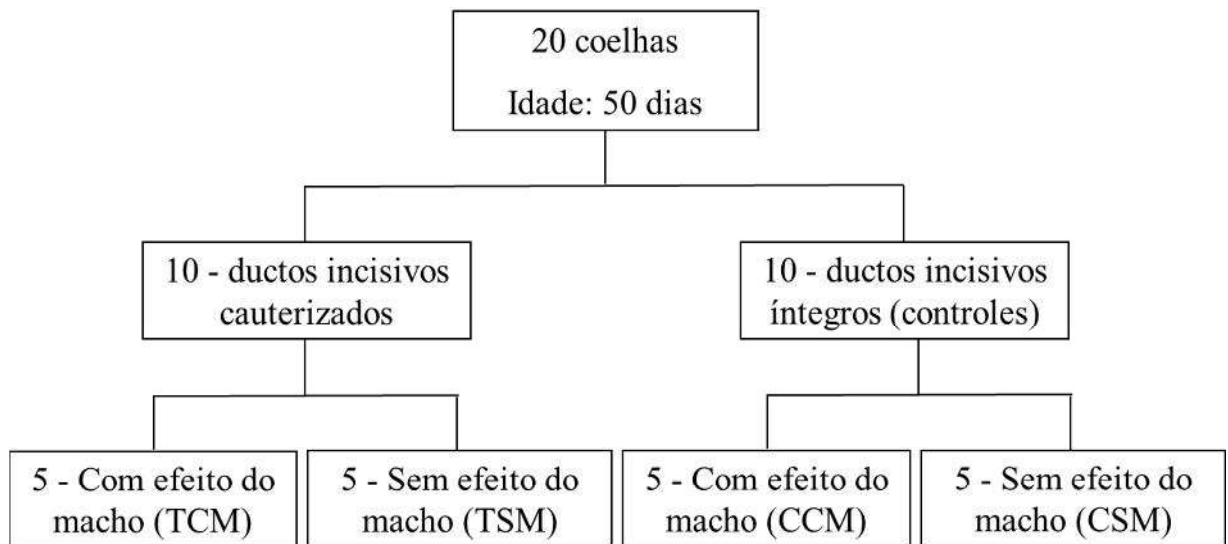


Figura 8: Organograma do delineamento experimental.

A presença do efeito do macho é marcada por feromônio, ruídos e odores vindos dos machos além da visualização dos mesmos pelas fêmeas. As fêmeas distribuídas nos subgrupos submetidos aos efeitos dos machos foram alocadas no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFV. Os subgrupos onde o efeito do macho estava ausente foram alocados no Coelhil do Departamento de Veterinária da UFV que se encontra a aproximadamente 1800 metros de distância do Setor de Cunicultura (Figura 9).

As 20 fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais (45 cm largura x 60 cm profundidade x 45 cm altura) (Figura 9) durante os 75 dias experimentais, e os quatro subgrupos foram mantidos com as mesmas condições de luminosidade natural e alimentação (ração e água *ad libitum*).



Figura 9: Animais alocados no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia (A) e no Coelhil do Departamento de Veterinária (B), UFV.

3.1.3. Cauterização dos ductos incisivos

Dez coelhas tiveram seus ductos incisivos cauterizados por meio de termocautério quando atingiram a idade de 50 dias e, por isso, passaram a ser denominadas de cauterizadas. As 10 fêmeas restantes, denominadas de controles, com os mesmos 50 dias de idade, foram manipuladas simulando o processo de cauterização dos ductos incisivos assim como as fêmeas cauterizadas. As cauterizações foram realizadas no Laboratório de Biologia da Reprodução (LABER) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFV.

Para o processo de cauterização dos ductos incisivos, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (Dopalen[®]-Ceva) - xilazina (Xilazin[®]-Syntec) nas doses de 50 e 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente. A mistura anestésica foi introduzida pela via intraperitoneal. A área ao redor do óstio externo do ducto incisivo foi anestesiada com lidocaína 2% com vasoconstritor (Anestésico L[®] Pearson - Eurofarma).

Após a cauterização dos ductos incisivos, os animais foram tratados com o antiinflamatório Flunixin-Meglumine (Banamine[®] - Schering-Plough) em dose única de 1mg/kg de massa corporal, por via subcutânea. Durante os cinco dias seguintes à cauterização, os animais foram observados, e como não foi detectada nenhuma alteração de comportamento ou de alimentação, não foram necessárias novas aplicações de anti-inflamatório e não houve a necessidade de tratamento com antibiótico.

Terminada a cauterização e a simulação de cauterização, estas fêmeas foram divididas nos respectivos subgrupos como demonstrados na figura 8.

3.1.4. Pesagem dos animais

As 20 coelhas (cauterizadas e controles) foram pesadas semanalmente, durante os 75 dias de experimento, para acompanhamento do desenvolvimento corporal, e, desta forma, observar se os animais cauterizados demonstrariam algum desconforto, como diminuição da ingestão de alimentos. A ração oferecida foi a Presence[®] coelhos (Tabela 1), que se apresenta na forma de *pellets* com diâmetro entre 3 e 4 mm e que atende as necessidades nutricionais de todas as fases de criação. Parte da ração usada no experimento foi doada pela Empresa Presence Nutrição Animal.

Tabela 1: Níveis de concentração dos nutrientes contidos na ração garantida pela fábrica para atender todas as fases de criação.

Nutriente	Concentração
Umidade (Máx)	130 g/kg
Proteína bruta (Min)	170 g/kg
Extrato etéreo (Min)	25 g/kg
Fibra bruta (Máx)	170 g/kg
FDA (Máx)	160 mg/kg
Matéria mineral (Máx)	100 g/kg
Cálcio (Min)	9 g/kg
Cálcio (Máx)	10 g/kg
Fósforo (Min)	5.000 mg/kg
Sódio (Min)	2.000 mg/kg
Cobre (Min)	15 mg/kg
Zinco (Min)	65 mg/kg
Manganês (Min)	40 mg/kg
Iodo (Min)	1,3 mg/kg
Selênio (Min)	0,2 mg/kg
Cobalto (Min)	1 mg/kg
Vitamina A (Min)	10.000 UI/kg
Vitamina D ₃ (Min)	1.200 UI/kg
Vitamina E (Min)	20 UI/kg
Vitamina K ₃ (Min)	1 mg/kg
Ácido Fólico (Min)	2 mg/kg
Biotina (Min)	0,07 mg/kg
Colina (Min)	650 mg/kg
Niacina (Min)	15 mg/kg
Ácido Pantotênico (Min)	5,7 mg/kg
Vitamina B1 (Min)	1,5 mg/kg
Vitamina B2 (Min)	2,5 mg/kg
Vitamina B6 (Min)	1,5 mg/kg
Vitamina B12 (Min)	12 mcg/kg
Lisina (Min)	6.800 mg/kg
Metionina (Min)	3.000 mg/kg
Diclazuril (Min)	1 mg/kg

3.1.5. Amostras de sangue

3.1.5.1. Coleta de sangue

Durante os 75 dias experimentais, três amostras de sangue de cada animal foram coletadas. A primeira coleta ocorreu quando as coelhas atingiram 100 dias de idade, e as outras duas coletas ocorreram com 10 e 20 dias de intervalo da primeira coleta, ou seja, nas idades de 110 e 120 dias. Nos dias de coleta, as amostras foram obtidas em dois momentos, às 8 horas da manhã e às 8 horas da noite, para assim determinar como a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) se comportava com a proximidade da idade em que elas seriam introduzidas na vida reprodutiva.

Além do LH e do FSH, também foi analisado o 17- β estradiol (E_2). As concentrações deste hormônio foram associadas à coloração da vulva, já que o E_2 é um condicionante da atividade sexual e, conseqüentemente, da coloração da vulva, uma vez que este é o único sinal externo da aceitação da fêmea ao macho.

A coleta de sangue foi realizada pela punção da veia auricular média utilizando agulha hipodérmica 21G. Para o procedimento, um algodão embebido em xilol foi aplicado na região para que a veia dilatasse facilitando a coleta (Figura 10). O sangue foi armazenado em tubo de ensaio siliconizado sem anticoagulante. Ao final da coleta, um algodão embebido em álcool foi aplicado para retirar vestígios de xilol da pele do animal.

3.1.5.2. Manipulação, armazenamento e análise das amostras de sangue

Após a coleta do sangue, os tubos de ensaio foram encaminhados ao Laboratório Clínico do DVT/UFV e colocados em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Em seguida, os tubos de ensaio foram centrifugados (Centrífuga Excelsa Baby I Fanem) por cinco minutos a 1050 G seguindo a rotina do laboratório.

Ao finalizar a centrifugação, o soro da amostra foi retirado com uma pipeta e depositado em Eppendorf devidamente identificado, e armazenado em freezer com temperatura de -80 °C.

No dia das análises, quatro horas antes dos procedimentos, as amostras foram retiradas do freezer, descongeladas e levadas para o Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia/UFV.

As análises foram realizadas utilizando-se os seguintes kits comerciais ELISA (Laboratório CUSABIO):

- 17 β -Estradiol: Rabbit Estradiol, E_2 ELISA kit (CSB-E06915Rb);
- FSH: Rabbit Follicle-stimulating Hormone, FSH ELISA kit (CSB-E06918Rb);
- LH: Rabbit Luteinizing Hormone, LH ELISA kit (CSB-E17780Rb).

Os resultados foram emitidos nas seguintes unidades: Estradiol em pg/mL, e FSH e LH em mUI/mL.



Figura 10: Coleta de sangue em coelhas da raça Nova Zelândia. As imagens A e B mostram as duas diferentes formas de contenção dos animais usadas para o procedimento de coleta. A imagem C destaca a veia dilatada pelo uso do xilol (seta).

3.1.6. Avaliação da coloração da vulva

Nos dias de coleta de sangue, avaliou-se a coloração das vulvas para relacioná-las com as concentrações séricas dos hormônios anteriormente citados, principalmente o hormônio 17β -Estradiol, que em concentrações crescentes aumenta a vascularização da vulva (Santos, 2009) e, conseqüentemente, altera sua coloração (pálida, rosa, vermelha e violeta). Estas colorações estão relacionadas com o grau de desenvolvimento dos folículos e, por conseguinte com o comportamento da fêmea frente ao macho.

As colorações avaliadas foram vermelha, violeta, rosa e pálida, que estão em ordem decrescente de fertilidade.

3.1.7. Comportamento animal

Durante o período experimental, o comportamento das coelhas foi avaliado seguindo um etograma comportamental conforme o método “Scan sample”, ou seja, varredura ou amostragem instantânea. O etograma é quantitativo e descreve as variações comportamentais. Este método quantifica o tempo que estes animais utilizam em atividades que geram gastos de energia, atividades sem gastos evidentes de energia e tempo que gastam se alimentando. Os dados obtidos durante as observações foram convertidos em médias, intervalos e desvios-padrão ou coeficientes de variação.

Para realizar o etograma, os comportamentos observados foram divididos em quatro grupos, G- ingestão de energia; C- auto-catação; P- gasto de energia; e M- manutenção do nível de energia (Tabela 2).

Para a avaliação do comportamento, o observador se colocou em posição por pelo menos dez minutos no intuito de acostumar as coelhas com a presença do mesmo (Figura 11). O processo de observação foi de dez minutos por animal, o que significou um tempo total de observação diário de 200 minutos. O comportamento foi avaliado durante 26 dias, o que resultou num tempo total de 5200 minutos de observação. O etograma comportamental utilizou o programa Prostcom (Conde et al., 2000), que no final do período de análise forneceu a porcentagem relativa e absoluta de todos os comportamentos.

Tabela 2: Etograma dos comportamentos e suas definições para coelhos.

Comportamento	Definição
<i>Atividades de ganho de energia (G)</i>	
Alimentar	Comer
Beber	Beber
<i>Atividades de auto-catação (C)</i>	
Lavar / Limpar	Lamber o pelo
Coçar	As patas traseiras são usadas para coçar o corpo, pescoço, orelhas e focinho
<i>Atividades com gasto de energia (P)</i>	
Andar	Atividade locomotora normal
Farejar / Cheirar	O coelho fareja o ambiente ou o ar através das grades da gaiola
Cheirar outro coelho	Coelho cheira outro coelho
Roer / Mastigar objetos	Roer/morder/puxar/mastigar comedouros, bebedouros, grades da gaiola
Movimento rápido	Correr depressa em volta da gaiola ou do coelheiro
Salto	Circundar muito rápido ou saltar em volta da gaiola
Procurar alimento	O coelho fareja parecendo que está à procura de algo. Há movimento em volta da gaiola
<i>Atividades sem gastos de energia (M)</i>	
Sentado	Recolher os membros torácicos para baixo do corpo
Levantado	Ambos os membros torácicos são elevadas do chão
Dormir	Estar deitado ou sentado com ambos os olhos fechados
Deitado em estado de alerta	Deitado com os olhos abertos e respondendo ao meio ambiente

Adaptado de Torres, 2010

Foram utilizados dois observadores, que se revezaram entre o Setor de Cunicultura DZO/UFV e o Coelhil DVT/UFV. Os comportamentos avaliados foram simplificados para não haver diferença entre os avaliadores.



Figura 11: A e B- Avaliação do comportamento dos animais em experimento. O observador se encontrava a uma distância de 5 metros dos animais, sozinho e em silêncio. Em B, a linha tracejada amarela mostra a fileira de animais a serem observados.

3.1.8. Eutanásia

As 20 coelhas foram eutanasiadas aos 125 dias de idade, pois nesta idade as mesmas já atingiram aproximadamente 80% do peso corporal de uma fêmea adulta, significando que já estariam aptas a reproduzirem.

A eutanásia foi realizada mediante o uso de cetamina (Dopalen[®]-Ceva) na dose de 22mg/kg, administrada por via intramuscular, propofol (Proponan[®]-Cristália) na dose de 10mg/kg, administrada pela via intraperitoneal e, quando o reflexo corneal estava ausente, administrou-se cloreto de potássio pela via intravenosa.

3.1.9. Coleta e processamento do material

3.1.9.1. Coleta de fragmentos de músculo e osso

Fragmentos dos músculos reto femoral e vasto medial do terço médio do membro pélvico esquerdo, com aproximadamente 15g, foram coletados, para calcular o teor de água e de gordura para se avaliar se houve ou não diferença na qualidade de carcaça entre os subgrupos.

As amostras de osso, de aproximadamente 1,5g, obtidas a partir de fragmentos da epífise proximal do fêmur do membro pélvico esquerdo foram usadas para calcular a densidade óssea (peso e volume), o teor de água e de gordura. Com estes resultados pode-se prever se houve ou não diferença na constituição óssea entre os subgrupos.

A densidade foi calculada segundo a fórmula:

$$D = m/v$$

D: densidade óssea (g/mL);

m: massa (g); e

v: volume (mL).

O volume do osso foi calculado com base no volume de água que o mesmo deslocava quando colocado em um recipiente graduado (Scherle, 1970). Como a densidade da água é igual a um, o volume de água deslocado pelo osso equivale ao volume do osso.

- Processamento das amostras de músculos

Os fragmentos de músculos foram pesados após a coleta, e a seguir, armazenados em estufa a 60 °C por 30 dias. Passados os 30 dias, estas amostras foram novamente pesadas para se calcular o teor de água da amostra com base na diferença de peso. Após serem pesadas, as amostras foram armazenadas em recipientes fechados contendo xilol por mais 15 dias em estufa, e depois mais 15 dias em outro recipiente aberto para secagem da amostra. Após este período, as amostras foram pesadas e o teor de gordura calculado segundo Mandarin-de-Lacerda (1995).

- Processamento das amostras de osso

Esta técnica foi adaptada do músculo para o osso. Os fragmentos do fêmur foram limpos e pesados, e sua densidade calculada por meio do volume de água que o fragmento desloca. Após a pesagem e o cálculo da densidade, as amostras foram

armazenadas em estufa a 60 °C por 30 dias. Após este período estas amostras foram pesadas para se calcular o teor de água da amostra e o volume foi novamente calculado. Após serem pesadas e o volume calculado, as amostras foram armazenadas em recipientes fechados contendo xilol por 15 dias em estufa, e depois mais 15 dias em outro recipiente para secagem da amostra. Após este período, as amostras foram pesadas e o volume novamente calculado, para se obter o teor de gordura.

3.1.9.2. Coleta do órgão vomeronasal

As cartilagens laterais do nariz foram seccionadas próximas ao septo nasal até chegar à concha nasal dorsal. Neste momento, duas janelas laterais foram abertas para expor o septo nasal. Terminada a exposição, foi realizado um corte transversal caudal à papila incisiva. Após coleta, o OVN foi mensurado com auxílio de uma régua milimetrada.

3.1.9.3. Coleta dos órgãos genitais

Os órgãos genitais das coelhas foram retirados e analisados macroscopicamente (medidos e pesados individualmente). Os dois ovários foram pesados em balança de precisão, e medidos com a albugínea, com o auxílio de um paquímetro, e a seguir fixados. O peso conjunto das duas gônadas foi usado para calcular o índice gonadossomático. As tubas uterinas e os úteros foram mensurados e fragmentos do útero foram coletados e fixados.

- Preparo dos fragmentos para análise estrutural
 - Fixação

Os fragmentos de tecido obtidos dos ovários e útero genitais foram fixados em solução à base de formaldeído em tampão fosfato. A solução de tampão fosfato 0,2 M foi preparada a partir de duas soluções iniciais: solução 1, composta de 2,76 g de fosfato monobásico em 100 mL de água destilada e solução 2, composta de 2,84 g de fosfato dibásico em 100 mL de água destilada. A solução final foi obtida ao adicionar-se a solução 1 na solução 2 até alcançar pH entre 7,2 e 7,4.

Depois de obtida a solução-tampão 0,1 M, a solução de fixação à base de formol foi preparada utilizando-se 100 mL de formol 43%, em 900 mL da solução de tampão fosfato 0,1 M.

- Desidratação

Os fragmentos de ovário e útero foram desidratados em solução de álcool 70% por 54 horas e depois álcool a 92,8% por quatro horas. Ambas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente.

- Inclusão

Assim que os banhos em álcool terminaram, os fragmentos de ovário e útero foram colocados em solução 1:1 composta de álcool 92,8% e a historesina (Leica), permanecendo na mesma por 12 horas. A seguir, os fragmentos foram transferidos para resina pura e permaneceram por 24 horas. Transcorridas as 24 horas em resina pura, os fragmentos foram alocados nos moldes de inclusão juntamente com a resina pura e mantidos por 48 horas em estufa a 60 °C para polimerização.

- Microtomia

Os blocos, depois de retirados dos moldes, foram colados em blocos de madeiras e identificados, para então serem submetidos à microtomia. Os blocos foram desbastados com uma navalha de vidro para aproximar os fragmentos da superfície de corte para, a partir de então, dar início à obtenção dos cortes com 3µm de espessura. Os cortes obtidos foram montados em lâminas histológicas, submetidos a colorações rotineiras (Azul de Toluidina e Hematoxilina-Eosina), e em seguida avaliados em microscópio de luz, conforme protocolo descrito abaixo para cada órgão.

- Histologia

- Ovários

As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (Bioval[®]) com objetiva de 40X.

Foram avaliadas três secções histológicas aleatórias por animal, e em cada secção todos os folículos foram avaliados e contados conforme metodologia adotada por Ola e Oyegbade (2012). Para que o folículo fosse contado, o núcleo do ovócito deveria estar visível.

Para serem classificados morfológicamente como folículos primordiais, que são os primeiros folículos a se formarem no ovário e compostos por ovócitos imaturos, estes folículos deveriam estar circundados por uma camada de células foliculares de aspecto pavimentoso e localizados na periferia do córtex ovariano (Figueiredo et al., 2008).

Quando os folículos primordiais começam a se desenvolver, as células foliculares se multiplicam e sua morfologia passa de pavimentosa a cúbica. Desta forma, quando o folículo apresentava células foliculares pavimentosas e cúbicas simultaneamente, este foi classificado como de transição. Os folículos cujos ovócitos eram circundados por uma camada de células foliculares cúbicas e mais volumosas, estes foram classificados como primários (Figueiredo et al., 2008).

Se os ovócitos apresentassem duas ou mais camadas de células foliculares e, às vezes, apresentassem algumas células da teca recrutadas, estes foram classificados como folículos secundários. Se os folículos apresentassem grande quantidade de células foliculares, e entre elas uma área estivesse preenchida por líquido folicular, estes eram classificados como folículos terciários (Figueiredo et al., 2008).

Após a classificação morfológica dos folículos, os ovócitos foram classificados em normais e degenerados (Figueiredo et al., 2008). Como os animais utilizados neste experimento não ovulam espontaneamente, obrigatoriamente estes folículos seguem dois tipos de vias degenerativas. No tipo 1, apenas o nucléolo do ovócito está picnótico sem comprometimento das células que compõem a granulosa. No tipo 2, além do nucléolo picnótico, as células da granulosa encontram-se desintegradas com condensação da cromatina nuclear (Brasil et al., 2007). Neste estudo não foi levado em consideração o tipo de degeneração, mas simplesmente o fato de haver degeneração.

○ Útero

Os cortes foram documentados em fotomicroscópio Olympus BX53[®], com objetiva de 4X de aumento, e as imagens obtidas foram avaliadas no programa Image J[®], para realização da morfometria do órgão.

Para cada animal foram avaliadas três secções histológicas de cada fragmento do órgão, e para cada uma delas foram contados uma média de 2000 pontos obtidos pela intersecções de linhas horizontais e verticais que formam uma gradícula. Os pontos avaliados foram classificados em:

- Espaço vazio
- Serosa (perimétrio)
- Camada muscular (miométrio)
 - Muscular longitudinal externa
 - Tecido conjuntivo
 - Muscular circular interna
- Camada endometrial
 - Endométrio
 - Vasos endometriais
 - Glândulas endometriais
- Luz do órgão
- Ligamento
 - Serosa do ligamento
 - Conjuntivo do ligamento
 - Muscular do ligamento

Foram contados os espaços vazios por se tratar de um órgão circular. As três camadas uterinas, serosa, muscular e endometrial, foram separadas para buscar possíveis diferenças entre os tratamentos.

3.1.9.4. Coleta do fígado

O fígado dos animais, juntamente com a vesícula biliar, foi coletado e pesado para se calcular o índice hepatossomático.

3.1.9.5. Índice gonadossomático e hepatossomático

Os índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{IGS} = \text{PG/PC} \times 100$$

$$\text{IHS} = \text{PF/PC} \times 100$$

PG = Somatória do peso dos ovários direito e esquerdo;

PF = Peso do fígado;

PC = Massa corporal no dia da eutanásia.

3.1.10. Análises estatísticas

O experimento foi instalado segundo um esquema fatorial 2 x 2 (dois grupos cauterizados e dois expostos ao efeito do macho) na distribuição inteiramente casualizada, com cinco repetições.

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e as médias comparadas utilizando-se o teste de Tukey adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Independentemente de a interação ser ou não significativa, optou-se pelo desdobramento da mesma devido ao interesse em estudo.

Com base nos dados das curvas de crescimento, foram ajustadas equações de regressão não linear pelo método de Gauss - Newton para o peso das coelhas em função da idade, usando o modelo $P = A / (1 + \text{Exp}(C_1 - B \times \text{Id}))$, onde:

P: Peso das coelhas em gramas;

Id: Idade das coelhas em dias;

A e C_1 são parâmetros da regressão.

As curvas de crescimento foram comparadas entre os tratamentos.

As dosagens hormonais foram comparadas por dia de coleta, hora do dia e tratamento.

As colorações da vulva foram correlacionadas com as concentrações de E_2 por meio de análise não-paramétrica.

O pacote estatístico usado para as análises foi SAEG 9.1, 2007.

3.2. EXPERIMENTO 2. INFLUÊNCIA DA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS INCISIVOS NA CAPACIDADE DE GESTAÇÃO E NA HABILIDADE MATERNA DE COELHAS NOVA ZELÂNDIA

O presente experimento foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV) (Protocolo de registro na CEUA: 087/2013), que segue a legislação vigente. O médico veterinário responsável pelo experimento foi o professor Laércio dos Anjos Benjamin, CRMV-MG 3387.

3.2.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no município de Viçosa (latitude 20°45'14" sul e longitude 42°52'55" oeste), localizado na Zona da Mata de Minas Gerais, com altitude de 648 metros e clima do tipo tropical de altitude, com chuvas durante o verão, e temperatura anual em torno de 19°C.

O período experimental foi de junho de 2013 a dezembro de 2013, e as coelhas foram mantidas no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia/UFV, *campus* Viçosa.

3.2.2 Animais

Foram utilizadas 10 coelhas da raça Nova Zelândia, das quais cinco tiveram seus ductos incisivos cauterizados na idade de 50 dias, idade em que as fêmeas ainda se encontravam pré-púberes (TPR). As outras cinco fêmeas foram submetidas à cauterização dos ductos incisivos 10 dias após o parto (TPP) como ilustrado na figura 12. O grupo TPR foi utilizado para avaliar se as coelhas mesmo depois de submetidas à cauterização dos ductos incisivos ainda mantinham a capacidade de gestar, enquanto o grupo TPP foi observado se o comportamento materno frente aos láparos era mantido.

As 10 fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais (45 cm largura x 60 cm profundidade x 45 cm altura) até atingirem 125 dias, idade em que foram destinadas à reprodução.

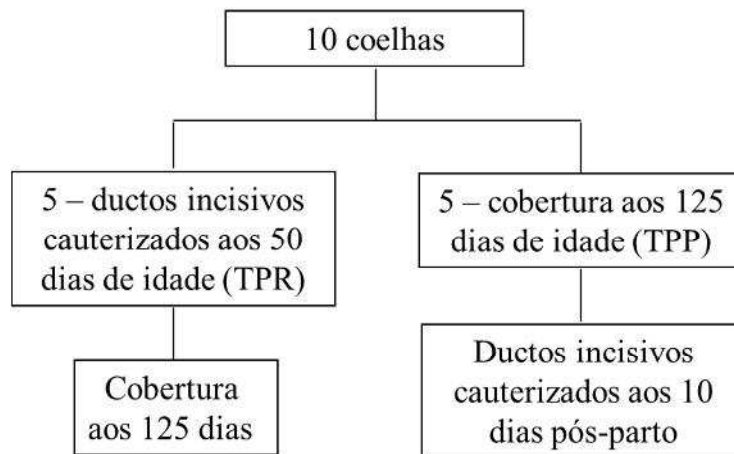


Figura 12: Organograma do delineamento experimental.

Quando o diagnóstico de gestação foi positivo, as gaiolas destas fêmeas foram adaptadas dois dias antes da data prevista do parto. Com a adaptação, a gaiola passava de 45cm para 90 cm de largura e um ninho contendo serragem foi alocado na mesma. Durante estes dois dias pré-parto, as coelhas se adaptavam à presença do ninho e o preparavam para a hora do parto. Estas fêmeas tiveram ração e água *ad libitum* e, após o parto, volumoso foi disponibilizado.

As fêmeas pertencentes aos dois grupos TPR e TPP passaram a fazer parte da rotina de reprodução do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia (UFV) como mostra a figura 13.



Figura 13: Animais alocados em gaiolas individuais no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia/UFV.

3.2.3. Obstrução dos ductos incisivos

Os ductos incisivos das cinco coelhas pertencentes ao grupo TPR foram obstruídos mediante cauterização com termocautério quando as mesmas atingiram 50 dias de idade. A cauterização foi realizada no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia/UFV.

Para o processo de cauterização dos ductos incisivos, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (Dopalen[®]-Ceva) - xilazina (Xilazin[®]-Syntec) nas doses de 50 e 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente, e a mistura anestésica foi introduzida pela via intraperitoneal (CETEA-UFMG). A área ao redor do óstio externo do ducto incisivo foi anestesiada com lidocaína 2% com vasoconstritor (Anestésico L[®] Pearson – Eurofarma).

Após a cauterização dos ductos incisivos, os animais foram tratados com o antiinflamatório Flunixin-Meglumine (Banamine[®] - Schering-Plough) em dose única de 1mg/kg de massa corporal, por via subcutânea. Durante os cinco dias seguintes à cauterização, os animais foram observados, e como não foi detectada nenhuma alteração de comportamento ou de alimentação, não foram necessárias novas aplicações de anti-inflamatório e não houve a necessidade de tratamento com antibiótico.

3.2.4. Apresentação das fêmeas aos machos

As 10 coelhas, agora adultas, e com 125 dias de idade tiveram suas vulvas avaliadas, sendo a seguir apresentadas ao macho. As fêmeas pertencentes ao grupo TPR tiveram o comportamento frente ao macho avaliado e também se as mesmas aceitariam a monta natural. Os machos utilizados foram os mesmos utilizados na rotina de reprodução do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia/UFV, o que comprova a fertilidade de todos.

3.2.5. Diagnóstico de gestação

Após a ocorrência da monta natural, o diagnóstico de gestação foi feito entre o 10º e 15º dia após cobertura por meio de palpação abdominal (Figura 14). Nesta palpação, os embriões foram sentidos como esferas carnosas bem aderidas às paredes uterinas. É preciso não confundir os embriões com fezes duras e não pressionar excessivamente os embriões. Este período é o ideal, porque com tempo inferior a 10 dias as estruturas

podem não estar perceptíveis, e com tempo superior a 15 dias aumenta a taxa de morte embrionária (Alejandre, 1988).

Quando do diagnóstico de gestação positivo, as coelhas foram observadas para saber se a gestação seria levada a termo (em média, 30 dias). Quando do diagnóstico negativo, as mesmas foram submetidas ao macho em outras ocasiões para então se obter um diagnóstico de infertilidade. Esta infertilidade poderia ser natural ou provocada pela cauterização dos ductos incisivos.

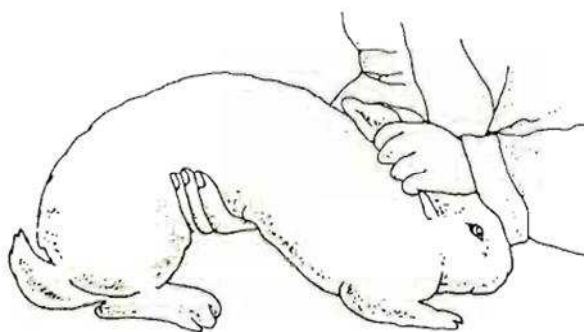


Figura 14: Palpação abdominal em coelha para diagnóstico de gestação. Adaptado de Alejandre (1988).

3.2.6. Reconhecimento dos láparos pelas mães

Em caso de gestação e parto nas coelhas do grupo TPR, o pós-parto foi acompanhado para analisar o comportamento da mãe frente aos láparos. Nas fêmeas pertencentes ao grupo TPP, no 10º dia após o parto, seus ductos incisivos foram cauterizados para avaliar possíveis alterações de comportamento frente aos láparos.

Em caso de ocorrência de partos das fêmeas do grupo TPR, o número de láparos foi contado e o peso médio da ninhada foi acompanhado desde o nascimento até o desmame, o que equivaleria aos resultados obtidos ao nascimento, aos 20 e aos 30 dias de vida. Estes valores constituíram o parâmetro de avaliação da habilidade materna das fêmeas.

3.2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e as médias comparadas utilizando-se o teste de Tukey adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO1: EFEITO DA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS INCISIVOS NOS ÓRGÃOS GENITAIS, NO COMPRIMENTO DO OVN, NO COMPORTAMENTO E NA COMPOSIÇÃO MUSCULAR E ÓSSEA DE COELHAS NOVA ZELÂNDIA

4.1.1. Animais

As 10 fêmeas com os ductos incisivos cauterizados não apresentaram nenhuma alteração de comportamento e o consumo de alimentos foi pouco comprometida. A avaliação do consumo foi feita por meio de observações diárias do cocho de ração. Desta forma ficou demonstrado que a técnica de cauterização, por meio de termocautério, é pouco agressiva e, no período da pós-cauterização, foi necessária apenas uma única dose de antiinflamatório.

Nas figuras 15 e 16 respectivamente, são apresentados as curvas de crescimento e os ganhos de peso dos quatro grupos avaliados, representados pelas 20 coelhas que permaneceram em experimento durante 75 dias.

Na figura 15, por meio de uma análise descritiva, percebe-se que na pesagem aos 57 dias de idade os dois grupos tratados tiveram uma menor taxa de crescimento comparado aos dois grupos controles, mais nas pesagens subsequentes os grupos tratados se recuperaram compensando a primeira semana. Esta menor taxa de crescimento pode ter ocorrido devido ao procedimento de cauterização dos ductos incisivos ao qual foram submetidos e ao período de cicatrização dos ductos e do epitélio do palato duro que reveste sua entrada. Nesta mesma figura 15 podem-se destacar outros dois momentos, um quando os animais estavam com idade entre 92 e 99 dias e o outro entre 113 e 120 dias de vida.

Na semana de 92 a 99 dias, os cochos de ração dos animais do grupo controle e grupo tratado sem efeito do macho, foram atacados por formigas e os mesmos quando se acercavam para comer eram atacados pelas mesmas, e com isso os animais não se alimentavam adequadamente restando sempre grande quantidade de ração no cocho. Esta situação só se reverteu após se realizar o controle químico das formigas.

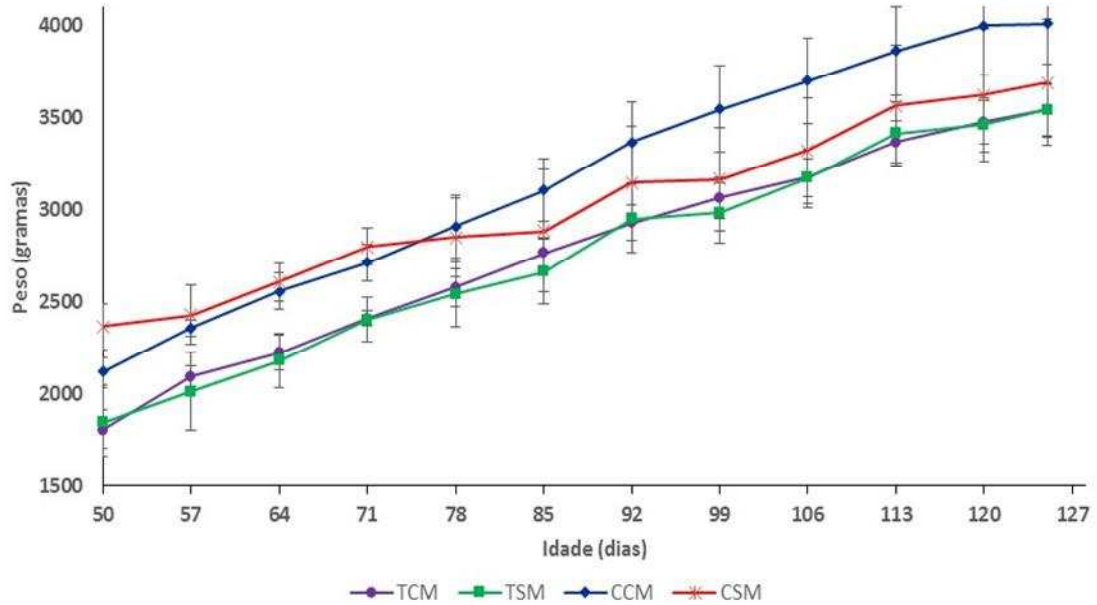


Figura 15: Curva de crescimento dos quatro grupos experimentais (TCM, grupo das coelhas cauterizadas expostas ao efeito do macho; TSM, grupo das coelhas cauterizadas sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo das coelhas controles expostas ao efeito do macho; CSM, grupo das coelhas controles sem a presença do efeito do macho) mostrando o peso vivo (gramas) das coelhas Nova Zelândia entre as idades de 50 a 125 dias ($P < 0,05$).

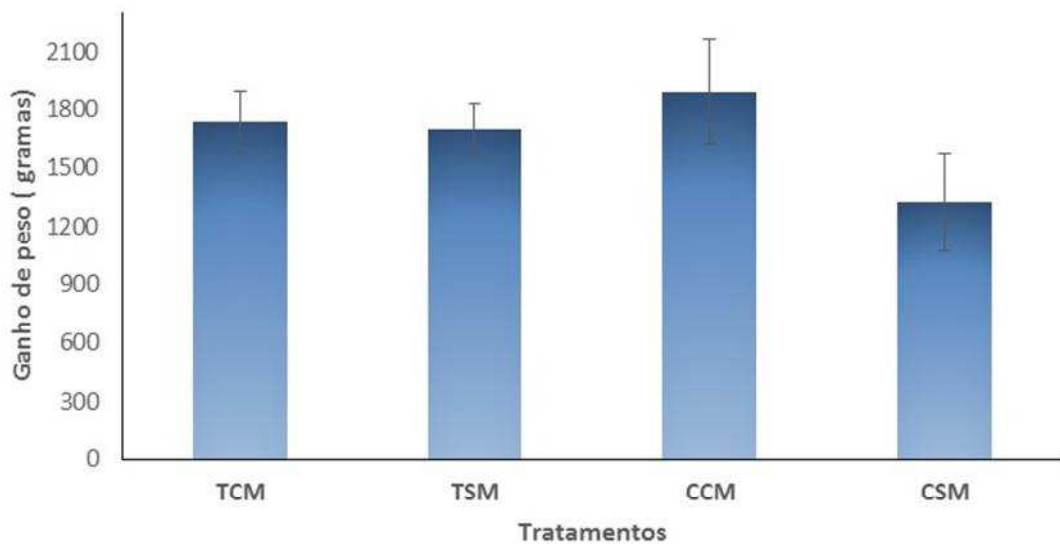


Figura 16: Média de ganho de peso (gramas) de cada grupo estudado (TCM, grupo das coelhas cauterizadas expostas ao efeito do macho; TSM, grupo das coelhas cauterizadas sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo das coelhas controles expostas ao efeito do macho; CSM, grupo das coelhas controles sem a presença do efeito do macho) durante os 75 dias de experimento ($P < 0,05$).

Por isso, estes animais não apresentaram taxa de crescimento compatível com as semanas antecedentes, mas estes dois grupos se recuperaram nas semanas seguintes. Esta recuperação ocorreu devido ao ganho de peso compensatório que estes animais apresentaram.

Na semana de 113 a 120 dias, houve problema quanto à disponibilidade da ração Presence® coelhos para os quatro grupos, pois houve problemas de distribuição da ração naquela semana em questão para toda a região de Viçosa, MG. Como solução paliativa, foi oferecida uma ração de qualidade inferior. Com isso, alguns animais mais seletivos não aceitaram a nova alimentação o que gerou uma menor taxa de crescimento para alguns animais, independente dos grupos estudados. Como estes animais foram eutanasiados 5 dias após a pesagem dos 120 dias, eles não tiveram tempo suficiente para compensar a perda de peso ou o pouco peso que alguns animais sofreram devido à falta de ração.

Mesmo depois de episódios que foram contrários ao ganho de peso, estes animais demonstraram que quando condições favoráveis são disponibilizadas aos coelhos após um período desfavorável, eles conseguem recuperar rapidamente a taxa de ganho de peso. Esta situação também foi demonstrada por Martins et al. (2012), que mantendo os animais em tratamento com diferentes graus de restrições alimentares, durante 4 semanas e durante a 5ª e última semana de experimento, todos os grupos foram colocados com alimentação *ad libitum* gerando um crescimento compensatório em seus animais submetidos a restrições alimentares.

Na figura 16 observa-se que os grupos na presença do efeito do macho apresentaram um maior ganho de peso comparado aos animais mantidos longe do efeito do macho. Mas pode-se destacar que dentre os grupos na ausência do efeito do macho, o grupo cauterizado apresentou um ganho de peso maior quando comparado com seu controle ($P > 0,05$).

Após a análise estatística dos dados observou-se que a taxa de crescimento semanal e o ganho de peso dos grupos cauterizados, estando eles submetidos ou não ao efeito do macho, não diferiram entre si ($P < 0,05$). Entretanto, foi detectada diferença ($P < 0,05$) no peso final dos grupos expostos ao efeito do macho quando comparado àqueles não expostos (Tabela 3). Este resultado mostra que, independente da viabilidade do OVN, o desenvolvimento das fêmeas foi influenciado pelo efeito do macho, mostrando existir interação entre os sexos, que neste caso pode ter sido por meio da

visão, audição, olfato e/ou feromônio, ou seja, outra via que não a via do órgão vomeronasal.

O ganho de peso superior das fêmeas cujos ductos incisivos foram cauterizados também foi observado em machos cujos ductos incisivos foram cauterizados tanto de coelhos Nova Zelândia (Grondona, 2012) como de bovinos Nelore inteiros (Emerick, 2012). No entanto, os grupos de coelhas que estiveram na presença do efeito do macho, grupo controle teve um ganho de peso similar ao cauterizado.

Tabela 3: Valores médios do peso final (gramas) de coelhas da raça Nova Zelândia na presença ou ausência de exposição ao efeito do macho independentemente da viabilidade do OVN.

Tratamentos	Peso final
Presença de efeito do macho	3889,98 ^a
Ausência de efeito do macho	3507,98 ^b

As médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

As equações ajustadas e os respectivos coeficientes de determinação são mostrados na tabela 4 e representados na figura 17.

Observa-se que o modelo se ajustou muito bem aos dados experimentais confirmando os resultados obtidos por Freitas (2005) em trabalho com coelhas da raça Nova Zelândia.

Tabela 4: Equações de regressão ajustadas do peso para coelhas da raça Nova Zelândia em função da idade para as respectivas combinações do efeito do macho, cauterização e coeficiente de determinação.

	Equações ajustadas	R ²
TCM	$\hat{Y} = 4250,28 / (1 + \exp(1,50142 - 0,0249 \times 1ID))$	0,9980
TSM	$\hat{Y} = 4560,46 / (1 + \exp(1,49188 - 0,02111 \times ID))$	0,9950
CCM	$\hat{Y} = 4945,52 / (1 + \exp(1,50094 - 0,02428 \times ID))$	0,9970
CSM	$\hat{Y} = 7504,16 / (1 + \exp(1,28383 - 0,01011 \times ID))$	0,9870

ID: idade em dias

TCM, grupo das coelhas cauterizadas expostas ao efeito do macho; TSM, grupo das coelhas cauterizadas sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo das coelhas controles expostas ao efeito do macho; CSM, grupo das coelhas controles sem a presença do efeito do macho.

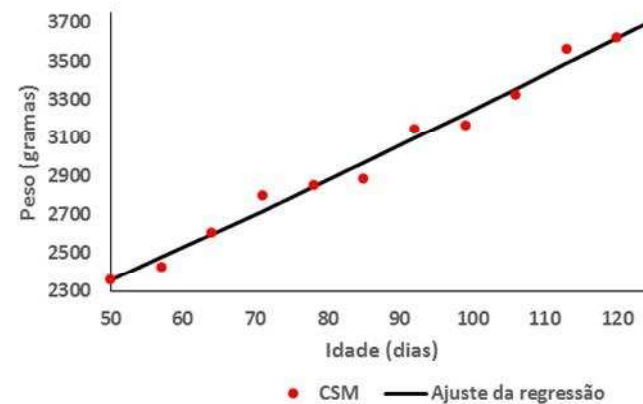
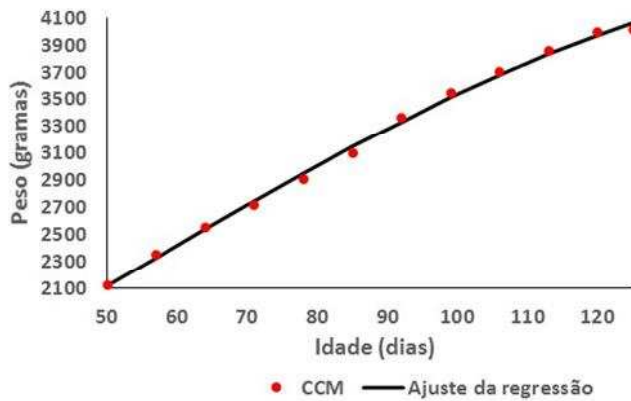
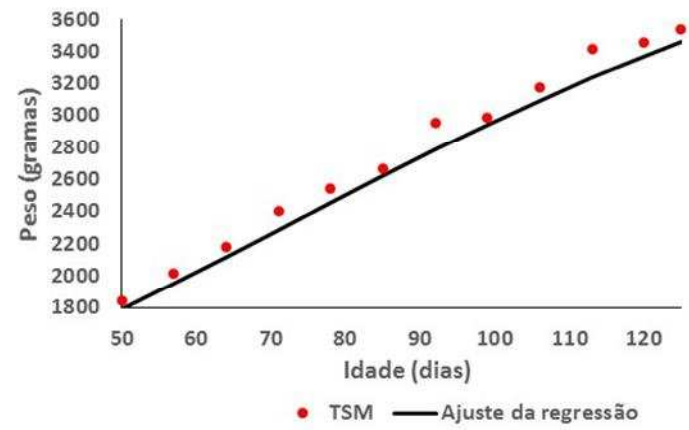
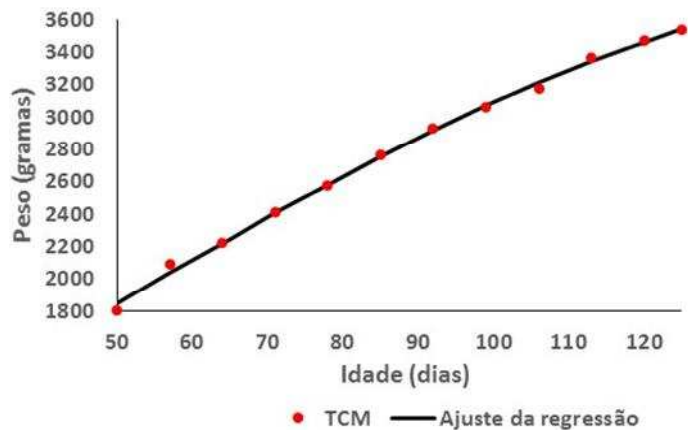


Figura 17: Curvas de crescimento de coelhas da raça Nova Zelândia para cada grupo experimental (TCM, grupo das coelhas cauterizadas expostas ao efeito do macho; TSM, grupo das coelhas cauterizadas sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo das coelhas controles expostas ao efeito do macho; CSM, grupo das coelhas controles sem a presença do efeito do macho) segundo as equações de regressão ajustadas do peso em função da idade.

4.1.2. Coloração da vulva x idade

Nos dias em que foram coletadas as amostras de sangue, concomitantemente foi avaliada a coloração da vulva por se tratar do único sinal visível de estro. Sabe-se que a coloração da vulva está intimamente relacionada com a concentração de 17β -estradiol circulante (Mazouzi-Hadid et al., 2011), já que concentrações crescentes deste hormônio aumenta a vascularização da vulva (Santos, 2009), e o 17β -estradiol também está relacionado à receptividade sexual (Mazouzi-Hadid et al., 2011) (Figura 18). Por este motivo, estes dois parâmetros foram relacionados.

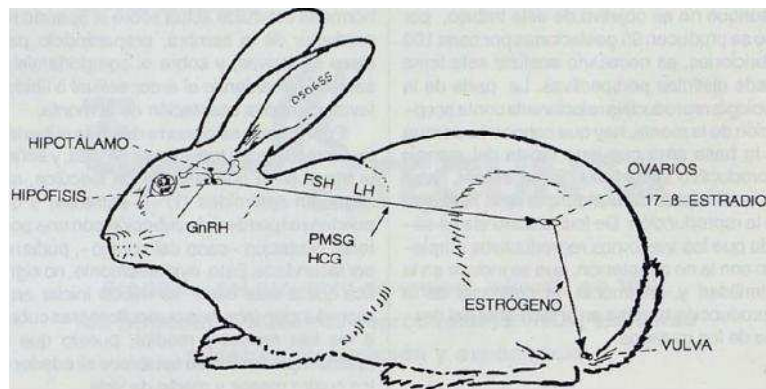


Figura 18: Diagrama da ação dos hormônios sexuais no hipotálamo, hipófise, ovário e vulva da coelha. Detalhe de como o 17β -estradiol influencia diretamente na vulva e, conseqüentemente, altera sua coloração e turgência. Adaptado de Pujol (1992).

A coloração da vulva começou a ser avaliada quando as coelhas alcançaram 70 dias de vida (Figura 19). Os dados mostram que as fêmeas cauterizadas, mantidas longe da influência do macho, começaram a apresentar sinais de estro 10 dias depois que as demais, e somente uma fêmea veio apresentar sinal de estro na coleta que correspondeu à idade de 120 dias, podendo concluir que os sinais surgiram entre a idade de 110 e 120 dias.

Analisando a frequência das diferentes colorações da vulva das fêmeas em experimento, pode-se dizer que a cauterização juntamente com a ausência do efeito do macho (estímulos visuais, acústicos e olfatórios), retardou a entrada no estro destas fêmeas, o que não aconteceu com as fêmeas cauterizadas na presença do macho.

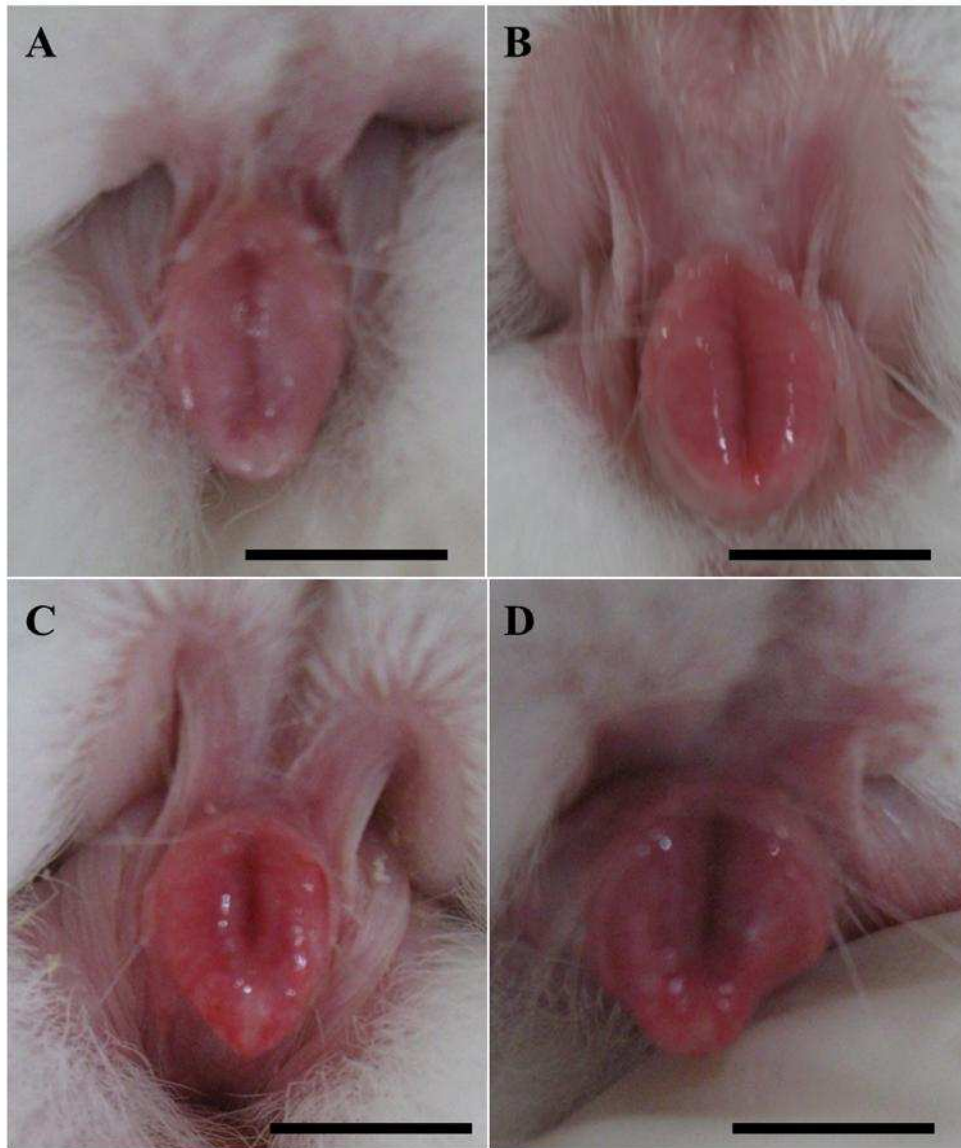


Figura 19: Exemplos das colorações da vulva de coelhas da raça Nova Zelândia. A- Pálida; B- Rosa; C- Vermelha e; D- Violeta. A cor vermelha corresponde a um estado de estro e, conseqüentemente, com as mais altas porcentagens de fertilidade, seguida das cores rosa, violeta e pálida (Martín Bilbao, 1996). Barra: 1 cm.

Mesmo o efeito do macho não sendo muito entendido para esta espécie (Voloschin e Gallardo, 1976; Bakker e Baum, 2000), Frank (1966) relatou a possibilidade de feromônios masculinos induzirem a receptividade nas fêmeas, enquanto que outros autores sugerem haver comunicação entre ambos os sexos, sendo que a fêmea avisa ao macho sobre seu estado sexual (Hudson e Distel, 1990; McNitt, 1992). Com base na literatura encontrada, pode-se dizer que ocorre comunicação entre machos e fêmeas, só que ainda não se conhece claramente como este contato ocorre, ou seja, ainda não se sabe quais são os sinais e a natureza dos mesmos.

Ola e Oyegbade (2012) estudaram o efeito do macho em três grupos compostos por fêmeas mestiças, com idade indefinida e em diferentes estádios reprodutivos (nulíparas e múltíparas). Estas fêmeas foram divididas em grupos, sendo um grupo com contato visual, acústico e olfatório com machos; outro grupo sem contato visual e o último grupo separado dos machos por, no mínimo, 200 metros. Ao avaliarem as vulvas destas fêmeas, os autores detectaram maior frequência de coloração violeta independente do estágio reprodutivo (acima de 50% para ambas). Ao se separar os grupos, os autores encontraram maior frequência de vulvas de coloração violeta para os grupos em contato com os machos, independente de a visão estar ou não presente, além de não ter havido ocorrência da coloração pálida. Já no grupo longe do contato com os machos, a coloração de maior frequência foi a rosa.

Ao contrário dos resultados encontrados por Ola e Oyegbade (2012), neste estudo, todas as fêmeas eram nulíparas e, quando subdivididas nos grupos experimentais, todas as colorações de vulva foram encontradas (Tabela 5 e Figura 20). A diferença entre os estudos pode ter sido pela idade inicial das observações (70 dias de vida) e o conseqüente desenvolvimento sexual. A coloração percentualmente mais frequente entre as fêmeas longe dos efeitos do macho foi a pálida. O grupo controle sem a presença do efeito do macho (CSM) e o grupo cauterizado exposto ao efeito do macho (TCM) apresentaram valores próximos, o que indica que a cauterização dos ductos incisivos teve o mesmo efeito da distância para as fêmeas. Também foi observado que nos grupos TCM e cauterizado sem a presença do efeito do macho (TSM), a coloração que mais se observou foi a violeta, sendo que no TSM com uma frequência mais expressiva. Nos grupos controle exposto ao efeito do macho (CCM) e CSM, as colorações que percentualmente mais apareceram foram a vermelha e a rosa, respectivamente. Estes dados sugerem que o efeito do macho e o efeito da cauterização dos ductos incisivos quando associados, podem aumentar a frequência da coloração pálida, o que significa atividade sexual reduzida.

Quando avaliada a frequência, levando em consideração somente a presença ou ausência do efeito do macho (Figura 20 A), a frequência para as colorações rosa e violeta é próxima, havendo alteração na frequência das colorações vermelha e pálida entre os grupos. A maior frequência de coloração pálida supostamente é pela ausência do efeito do macho no desenvolvimento do sistema genital destas fêmeas, acarretando uma menor concentração de hormônios sexuais circulantes.

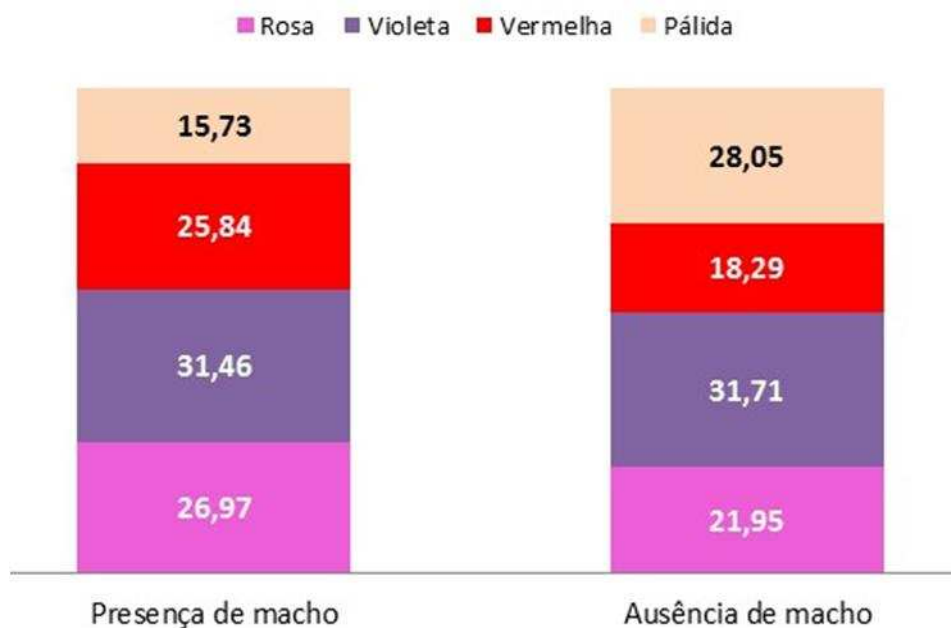
Tabela 5: Frequência das diferentes colorações da vulva (%) em relação à idade (dias) nas coelhas da raça Nova Zelândia.

		Idade (dias)						
		70	80	90	100	110	120	125
TCM	Pálida	33,3	22,2	22,2	22,2	22,2	0,0	0,0
	Rosa	0,0	22,2	55,7	33,3	33,3	50,0	80,0
	Vermelha	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	12,5	20,0
	Violeta	55,6	44,4	11,1	33,3	33,3	37,5	0,0
TSM	Pálida	77,8	11,1	25,0	50,0	12,5	12,5	20,0
	Rosa	0,0	44,4	12,5	0,0	0,0	25,0	60,0
	Vermelha	0,0	11,1	12,5	12,5	12,5	25,0	0,0
	Violeta	22,2	33,3	50,0	37,5	75,0	37,5	20,0
CCM	Pálida	16,7	0,0	0,0	0,0	33,3	0,0	20,0
	Rosa	16,7	16,7	33,3	0,0	16,7	66,7	80,0
	Vermelha	16,7	50,0	66,7	83,3	16,7	0,0	0,0
	Violeta	50,0	33,3	0,0	16,7	33,3	33,3	0,0
CSM	Pálida	0,0	0,0	60,0	20,0	20,0	40,0	50,0
	Rosa	66,6	50,0	20,0	0,0	0,0	20,0	25,0
	Vermelha	16,7	33,3	0,0	80,0	80,0	0,0	25,0
	Violeta	16,7	16,7	20,0	0,0	0,0	40,0	0,0

TCM, grupo das coelhas cauterizadas expostas ao efeito do macho; TSM, grupo das coelhas cauterizadas sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo das coelhas controles expostas ao efeito do macho; CSM, grupo das coelhas controles sem a presença do efeito do macho.

Com base nos dados obtidos, acredita-se, que de alguma forma, o efeito do macho influenciou nas fêmeas tratadas e próximas a eles, ou pela visão, ou pelo olfato ou pela audição. Ressalta-se que como OVN supostamente estava inativo devido à cauterização dos ductos incisivos e o olfato (sistema olfatório principal) não seria capaz de detectar feromônios, uma via alternativa pode existir ou ter sido criada. Observou-se, também, que com o desenvolvimento dos órgãos genitais femininos, os mesmos tornaram-se cada vez mais aptos à reprodução e a ocorrência de coloração pálida reduziu, mostrando que a concentração dos hormônios sexuais esteve cada vez mais próxima da concentração ideal para que a coelha se tornasse apta a iniciar sua vida reprodutiva. Esta fase seria por volta dos 120 dias, conforme Alvarez (1985), idade em que as fêmeas atingem idade e peso corporal ideais.

A



B

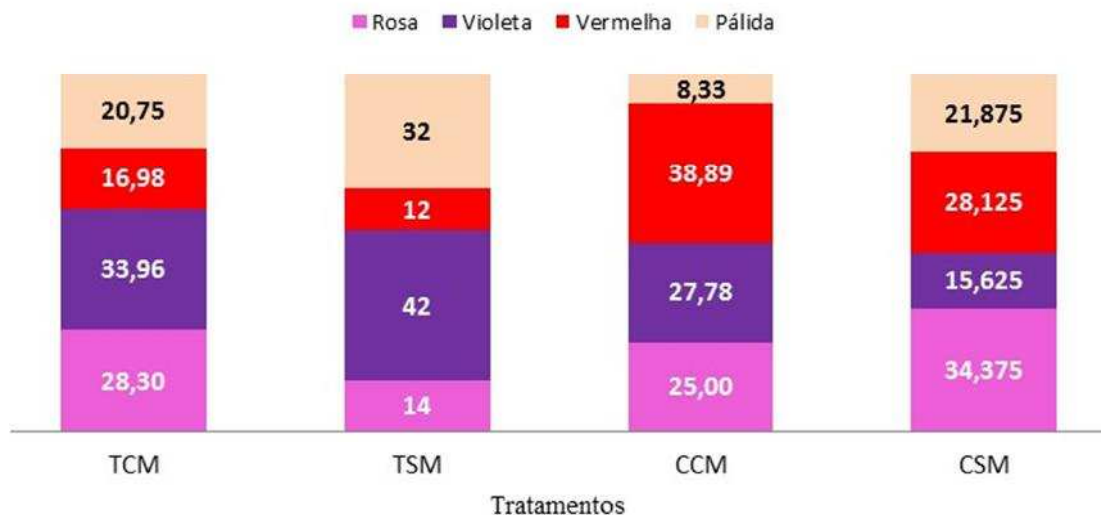


Figura 20: Frequência em percentagem da ocorrência das diferentes colorações de vulva em coelhas da raça Nova Zelândia em função de: A- efeito do macho durante os 75 dias de experimento, e B- grupos experimentais: TCM, grupo das coelhas cauterizadas expostas ao efeito do macho; TSM, grupo das coelhas cauterizadas sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo das coelhas controles expostas ao efeito do macho; CSM, grupo das coelhas controles sem a presença do efeito do macho.

4.1.3. Comportamento animal

Com base no etograma adaptado de Torres (2010) para este estudo, pode-se afirmar que houve alteração no tempo que as fêmeas destinaram à auto-catação entre os grupos, na ausência do efeito do macho ($P < 0,05$). O tempo que os animais dispenderam em descanso, durante o qual ocorria somente gasto de energia para manutenção do metabolismo, foi o mesmo entre os grupos, da mesma forma que o tempo direcionado para movimentação e ingestão de comida e bebida também foi o mesmo entre os grupos ($P < 0,05$).

Este resultado mostra que, de alguma forma, a ausência do efeito do macho associado à cauterização influenciou o comportamento (TSM), o que levou estes animais a gastarem mais energia e, conseqüentemente, apresentarem menor ganho de peso no final do experimento (Tabela 6).

4.1.4. Anatomia dos órgãos genitais

Durante a eutanásia dos animais, os órgãos genitais foram avaliados no intuito de observar possíveis alterações estruturais entre os grupos estudados.

Antes de se iniciar o protocolo anestésico para dar andamento à eutanásia, a coloração e o comprimento da vulva foram avaliados (Tabela 7), não apresentando diferença entre os grupos. Independente dos grupos estudados, a coloração rosa (57,9%) se destacou, assim como encontrado por Sánchez et al. (1989) (47%), mostrando que para fêmeas nulíparas a coloração com maior frequência é a rosa.

Para os animais pertencentes aos grupos expostos à influência masculina (CCM e TCM), a coloração que predominou foi a rosa (80%), enquanto para os grupos sem influência masculina (CSM e TSM), a coloração predominante também foi a rosa, mas a frequência foi de 44,4% (Figura 21). Mesmo sendo a coloração rosa a mais frequente, em fêmeas expostas ao efeito masculino a frequência foi aproximadamente o dobro daquela do grupo sem exposição. A média do comprimento das vulvas rosa para o grupo com (11,5 mm) e sem (9,7 mm) influência masculina. Mesmo não havendo diferença ($P < 0,05$), numericamente estes valores diferem em 1,8 mm, o que corresponderia a 18,6% do comprimento de 9,7mm, sendo este um valor bastante expressivo.

Tabela 6: Médias da frequência absoluta (FA) e do tempo absoluto em segundos (TA) das atividades realizadas por coelhas Nova Zelândia monitoradas com base no etograma adaptado de Torres (2010).

Atividades	TCM		TSM		CCM		CSM	
	FA	TA	FA	TA	FA	TA	FA	TA
Sem gastos de energia	156±37,77	8799,94±743,46	148±28,56	8481,99±633,53	142,83±29,45	8649,23±518,37	142,4±23,54	8298,73±347,10
Auto-catação	99,33±20,67	2319,44±520,91	94,13±13,65	1990,04±440,34*	97,33±24,95	2063,83±612,83	97,6±8,59	2584,08±323,42*
Com gasto de energia	47,44±20,33	118,01±65,92	56,63±19,17	156,39±78,29	41,83±20,75	86,14±41,61	49,8±22,55	175,06±143,90
Ganho de energia	12,78±7,59	763,07±490,33	15,5±5,32	1297,71±566,59	14±7,07	1201,22±687,47	11,8±3,76	942,27±148,62

* Teste de Tukey a 5% de significância

TCM, cauterizado exposto ao efeito do macho; TSM, cauterizado sem a presença do efeito do macho; CCM, controle exposto ao efeito do macho; CSM, controle sem a presença do efeito do macho.

Tabela 7: Comprimento médio e coloração da vulva de coelhas da raça Nova Zelândia no momento da eutanásia.

Tratamentos	Comprimento (mm)	Cor	Frequência (%)
TCM	11,4±1,7	Pálida	0,0
		Rosa	80,0
		Vermelha	20,0
		Violeta	0,0
TSM	10,1±0,8	Pálida	20,0
		Rosa	60,0
		Vermelha	0,0
		Violeta	20,0
CCM	11,9±1,2	Pálida	20,0
		Rosa	80,0
		Vermelha	0,0
		Violeta	0,0
CSM	11,2±2,3	Pálida	50,0
		Rosa	25,0
		Vermelha	25,0
		Violeta	0,0

TSM, cauterizado sem a presença do efeito do macho; CSM, controle sem a presença do efeito do macho; TCM, cauterizado exposto ao efeito do macho; CCM, controle exposto ao efeito do macho.

A coloração da vulva está diretamente relacionada à concentração do hormônio ovariano 17β -estradiol circulante, e sabe-se que a coloração vai de pálida a violeta, passando pelo rosa e vermelho. Essas mudanças ocorrem à medida que o 17β -estradiol aumenta. Experimentos já provaram que animais com vulva pálida são férteis, mas a prolificidade é inferior quando comparada a fêmeas cobertas com a vulva de coloração rosa, vermelha e violeta (Pujol, 1992). Esta menor prolificidade deve-se ao fato de que nos ovários das fêmeas que apresentam vulva pálida, a quantidade de folículos desenvolvidos é escassa (Martín, 1995).

Com base em estudos prévios que relacionam o número de folículos, a concentração do hormônio 17β -estradiol e a coloração da vulva, pode-se prever que

neste experimento o efeito do macho influenciou na baixa frequência de coloração pálida na vulva.

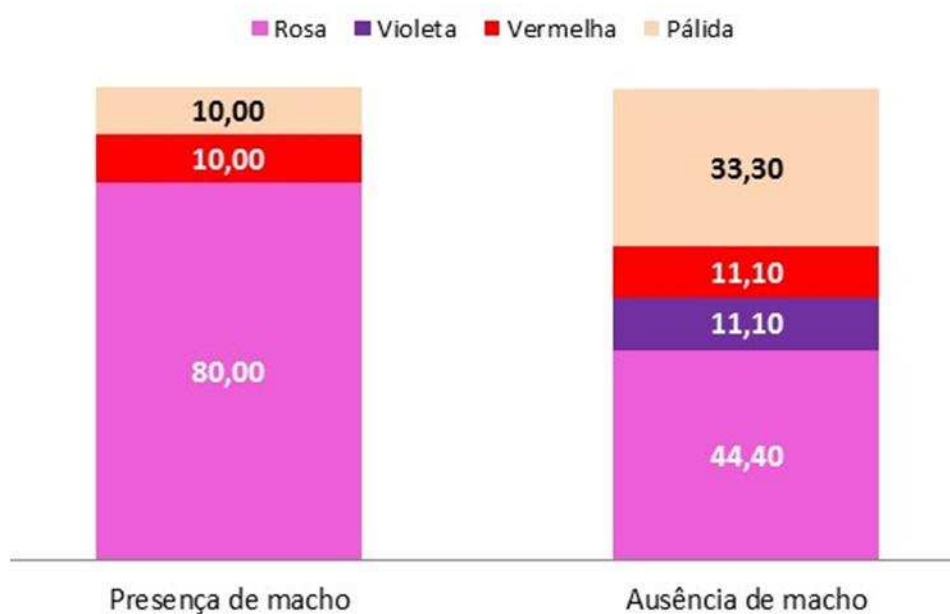


Figura 21: Frequência em porcentagem da ocorrência das diferentes colorações de vulva em coelhas da raça Nova Zelândia com 125 dias de idade (idade da eutanásia). Ausência de coloração violeta para as fêmeas na presença do efeito do macho.

Quando avaliada a cérvix, observou-se que a mesma era formada por duas aberturas. Estas duas estruturas que se abrem na vagina em momento algum se fundem para formar um corpo uterino único. Baseando-se neste achado, estas estruturas foram denominadas de úteros direito e esquerdo (Figura 22).

Quanto ao comprimento do útero, ao nível de 10% de probabilidade, observou-se diferenças entre os grupos (TCM e CCM) nos úteros direito e esquerdo das fêmeas expostas ao efeito do macho. Também foi detectada diferença entre os úteros direito e esquerdo das fêmeas cujos ductos incisivos foram cauterizados quando na existência ou não da exposição ao efeito do macho como mostra a tabela 8.

Os valores obtidos do comprimento das tubas uterinas e dos úteros mostraram não haver diferença entre os grupos nestes aspectos (Tabela 9). Comparando as duas estruturas, notou-se que a tuba uterina em todos os grupos apresentou comprimento maior que os úteros. Estes valores são similares aos encontrados por outros autores no

que se refere ao comprimento da tuba uterina e do útero (Alvarez, 1985; Hernández et al., 2010).

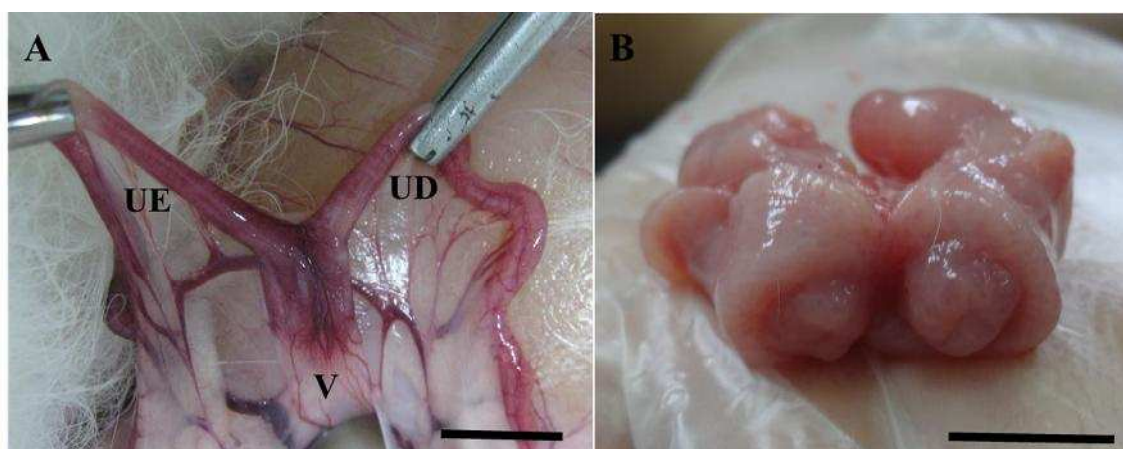


Figura 22: A - Visão dorsal dos úteros direito (UD) e esquerdo (EU) e vagina (V) e; B - Visão interna caudo-cranial da vagina expondo as duas cérvices, uma para cada útero de coelha da raça Nova Zelândia (Barras: 1cm).

Tabela 8: Valores médios \pm erro padrão médio do comprimento dos úteros direito e esquerdo (milímetros) de coelhas da raça Nova Zelândia para respectivas combinações de cauterização dos ductos incisivos e exposição ao efeito do macho.

	Útero direito		Útero esquerdo	
	Cauterizadas	Controle	Cauterizadas	Controle
Ausência de efeito do macho	67,54 \pm 15,1 ^{aB}	81,23 \pm 11,1 ^{aA}	65,72 \pm 9,9 ^{aB}	80,54 \pm 15,7 ^{aA}
Presença de efeito do macho	87,77 \pm 27,3 ^{aA}	65,32 \pm 10,1 ^{bA}	90,33 \pm 30,2 ^{aA}	68,99 \pm 9,6 ^{bA}

As médias seguidas por letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem a um nível de 10% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Durante a coleta das tubas uterinas, observou-se a presença de cistos na mesossalpinge, cistos estes localizados mais especificamente na região do infundíbulo e ampola, conforme mostram as imagens abaixo (Figura 23). Dos 20 animais eutanasiados, foram encontrados cistos em 7 animais (35%) os quais estavam divididos nos grupos experimentais da seguinte forma: 3 no grupo CCM, 2 no grupo TCM e 2 no grupo CSM. O grupo TSM não apresentou nenhum cisto.

Tabela 9: Valores médios \pm erro padrão médio) do comprimento das tubas uterinas direita e esquerda (milímetros) de coelhas da raça Nova Zelândia para respectivas combinações de cauterização dos ductos incisivos e exposição ao efeito do macho.

	Tuba uterina direita		Tuba uterina esquerda	
	Cauterizadas	Controle	Cauterizadas	Controle
Ausência de efeito do macho	109,1 \pm 17,7 ^{aA}	103,6 \pm 17,9 ^{aA}	106,01 \pm 14,7 ^{aA}	89,1 \pm 23,8 ^{aA}
Presença de efeito do macho	116,8 \pm 21,7 ^{aA}	127,3 \pm 24,5 ^{aA}	111,9 \pm 17,7 ^{aA}	112,9 \pm 24,0 ^{aA}

As médias seguidas por letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem a um nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Foi feita a distribuição dos cistos quanto ao lado em que foram encontrados. Nesta distribuição observou-se que em 4 animais (57,1%) os cistos se encontraram na T.U.E., sendo 3 do grupo CCM e 1 do TCM. Um animal (14,3%) do grupo CSM apresentou na T.U.D., enquanto que 2 animais (28,6%), um do grupo TCM e outro do CSM, apresentaram em ambas tubas uterinas.

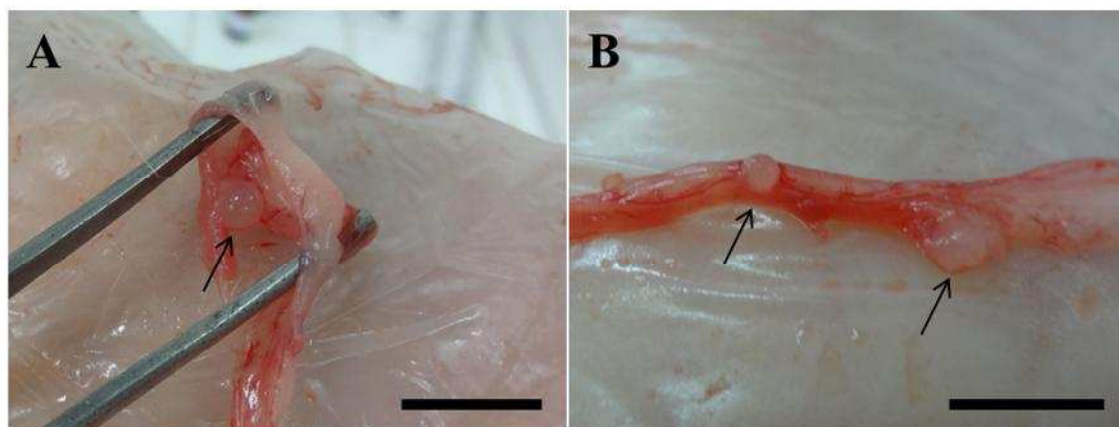


Figura 23: Cistos (setas) encontrados nas tubas uterinas durante a necropsia. Em A, o cisto se encontra no infundíbulo, e em C, no istmo (Barras: 1cm).

Como observado acima, dos 10 animais expostos ao efeito do macho, independente do grupo experimental, 50% deles apresentaram cistos, enquanto que dos 9 animais do grupo isento desse efeito 2 (22,2%) apresentaram cistos. Neste último caso foram um total de 9 fêmeas porque uma morreu durante o período experimental. Com base nestes resultados, pode-se sugerir que o efeito do macho influenciou no surgimento

destes cistos. Seria necessário um estudo mais aprofundado para saber o que realmente levou a formação destes cistos.

Uma única fêmea pertencente ao grupo cauterizado na presença de influência masculina apresentou hidrossalpinge.

Os ovários foram pesados e seu diâmetro maior foi mensurado. Com base nestes dados, não foi observada diferença entre o peso e o comprimento dos ovários nem mesmo no índice gonadossomático entre as fêmeas cauterizadas ($P < 0,05$). Mas detectaram-se diferenças entre o comprimento do ovário esquerdo, peso do ovário direito e índice gonadossomático entre os grupos submetidos aos efeitos masculinos (Tabela 10). Esta diferença, provavelmente, deve-se ao fato de que as fêmeas expostas ao efeito do macho apresentaram maior atividade ovariana, o que significaria maior quantidade de folículos em todas as categorias se desenvolvendo no ovário, principalmente daqueles folículos aptos a serem ovulados, que são maiores e com grande quantidade de líquido folicular, o que causa alteração na morfologia geral (tamanho e peso) do ovário.

Tabela 10: Valores médios de comprimento (centímetros) do ovário esquerdo, do peso (gramas) do ovário direito e índice gonadossomático de coelhas da raça Nova Zelândia submetidos à presença ou ausência do efeito do macho.

	Comprimento (cm)		Peso (g)		Índice gonadossomático
	Ovário esquerdo	Ovário direito	Ovário esquerdo	Ovário direito	
Presença efeito do macho	15,54±1,27 ^a	15,44±0,89 ^a	0,1518±0,3 ^a	0,1583±0,07 ^a	0,0077±0,0008 ^a
Ausência efeito do macho	13,98±1,4 ^b	14,44±1,48 ^a	0,1148±0,03 ^a	0,1153±0,07 ^b	0,0066±0,001 ^b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

4.1.5. Índice gonadossomático e hepatossomático

Ambos os índices, gonadossomático e hepatossomático, foram calculados usando a razão do peso dos ovários, para o IGS, e do fígado, para o IHS, em relação à massa corporal (Tabela 11).

Não houve diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos em nenhum dos índices, mostrando que a proporção destes órgãos em relação à massa corporal não sofreu alteração com os tratamentos. O efeito do macho foi capaz de alterar o IGS (Tabela 11) do grupo de animais exposto ao macho sem levar em consideração os tratamentos. Não foram encontrados dados sobre IGS para fêmeas da raça Nova Zelândia, sendo encontrados somente dados para machos, enquanto sobre IHS não foram encontrados nem mesmo para machos.

Tabela 11: Índices gonadossomático e hepatossomático de coelhas da raça Nova Zelândia (média \pm erro padrão médio) nos diferentes grupos estudados.

Parâmetros	Grupos Estudados			
	TCM	TSM	CCM	CSM
IGS (%)	0,009 \pm 0,004	0,007 \pm 0,001	0,008 \pm 0,001	0,007 \pm 0,002
IHS (%)	2,54 \pm 0,19	2,75 \pm 0,31	2,49 \pm 0,40	2,83 \pm 0,36

TSM, cauterizado sem a presença do efeito do macho; CSM, controle sem a presença do efeito do macho; TCM, cauterizado exposto ao efeito do macho; CCM, controle exposto ao efeito do macho.

4.1.6. Composição dos músculos reto femoral e vasto medial e densidade da epífise proximal do osso fêmur

As amostras dos músculos reto femoral e vasto medial e do fêmur foram pesadas no momento da coleta, após desidratação e após tratamento com xilol para retirada de gordura, para se calcular a percentagem de água e gordura, respectivamente (Tabela 12).

Ao comparar o teor de água e gordura dos músculos e do fragmento ósseo observou-se não haver diferença entre os tratamentos e nem mesmo da influência do macho ($P < 0,05$).

Estes dados mostram, assim como os dados obtidos por Grondona (2012) para machos, que não houve interferência do tratamento na qualidade da carcaça e do esqueleto de coelhos Nova Zelândia.

Tabela 12: Composição dos músculos reto femoral e vasto medial e densidade da epífise óssea em três momentos distintos de coelhas da raça Nova Zelândia obtidos de todos os grupos experimentais (média \pm erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos Estudados			
	TCM	TSM	CCM	CSM
Músculo <i>in natura</i> (g)	14,08 \pm 3,75	16,58 \pm 5,25	14,22 \pm 4,71	12,71 \pm 3,51
Músculo desidratado (g)	3,62 \pm 1,05	4,28 \pm 1,45	3,76 \pm 1,28	3,25 \pm 0,93
Músculo desengordurado (g)	3,31 \pm 0,83	3,34 \pm 1,16	3,32 \pm 1,11	2,97 \pm 0,76
Água %	74,36 \pm 1,09	74,34 \pm 0,86	73,67 \pm 1,44	74,46 \pm 0,65
Gordura %	7,69 \pm 5,28	9,37 \pm 4,39	11,04 \pm 6,19	7,97 \pm 3,68
Densidade óssea ¹ (g/ml)	1,63 \pm 0,12	1,71 \pm 0,07	1,62 \pm 0,08	1,60 \pm 0,1
Densidade óssea ² (g/ml)	1,80 \pm 0,25	1,70 \pm 0,11	1,65 \pm 0,12	1,81 \pm 0,37
Densidade óssea ³ (g/ml)	1,62 \pm 0,28	1,54 \pm 0,14	1,48 \pm 0,15	1,59 \pm 0,30

¹Densidade óssea *in natura*, ²Densidade óssea após desidratação e ³Densidade óssea após retirada da gordura. TCM, cauterizado exposto ao efeito do macho; TSM, cauterizado sem a presença do efeito do macho; CCM, controle exposto ao efeito do macho; CSM, controle sem a presença do efeito do macho.

4.1.7. Órgão vomeronasal (OVN)

O OVN teve seu comprimento mensurado e a média destes valores obtidos para os animais cauterizados (13 mm) foi menor que o comprimento dos controles (14,17 mm) ($p < 0,05$), independente do efeito do macho estar ou não presente. Na tabela 13, estão descritos os valores para cada grupo individualmente.

Comparando os dados obtidos neste estudo com fêmeas com os dados obtidos por Grondona (2012) que trabalhou com machos de coelhos da raça Nova Zelândia, observou-se que o comprimento médio do OVN de machos foi de 12,2 \pm 0,42 mm enquanto que o encontrado neste estudo foi de 13,63 \pm 0,67 mm, independente do tratamento.

Estes dados sugerem que existe dimorfismo em relação ao tamanho do OVN entre os sexos de coelhos da raça Nova Zelândia, assim como em ratos, conforme descrito por Segovia e Guillamón (1982, 1993) e Grondona (2005).

Tabela 13: Média do comprimento do órgão vomeronasal (em milímetros) de coelhas da raça Nova Zelândia dos quatro grupos experimentais.

	Grupos Estudados			
	TCM	TSM	CCM	CSM
Comprimento OVN	13±0,0	13±0,0	14±0,0	14,25±0,5

TCM, cauterizado exposto ao efeito do macho; TSM, cauterizado sem a presença do efeito do macho; CCM, controle exposto ao efeito do macho; CSM, controle sem a presença do efeito do macho.

4.1.8. Análise hormonal

A figura 24 mostra os valores de 17β -estradiol (E_2) encontrados nos dois momentos do dia e nos grupos estudados. Ao avaliar os valores do grupo CCM, observou-se que os valores na idade de 110 dias foram os mais altos tanto pela manhã quanto pela noite quando comparado às idades de 100 e 120 dias.

Avaliando os valores obtidos para os grupos estudados, nota-se que nas idades de 100, 110 e 120 dias os valores da manhã foram inferiores aos da noite para dois dos quatro grupos estudados (TCM e CCM). Já o grupo TSM apresentou valores da manhã inferiores ao noturno nas idades de 100 e 110 dias, com inversão aos 120 dias de vida, enquanto que para o grupo CSM foi o inverso do TSM.

Ao observar a figura 24, percebe-se que, com 100 dias o maior valor foi o noturno do grupo TSM, assim como aos 110 dias. Já na idade de 120 dias, o maior valor foi do CSM noite. E este último valor é superior aos dois valores nas idades de 100 e 110 dias

Conforme tabela 14, os valores dos grupos foram confrontados conforme a idade, e não se observou diferença entre eles ($P < 0,05$). Para o grupo CSM, não foi possível fazer análise estatística devido ao número reduzido de amostras, mas pode-se perceber que, numericamente, os valores são diferentes, e que se tornam mais altos conforme a idade aumenta.

Como foram feitas duas mensurações dos níveis hormonais por dia de coleta, um valor médio destes dois valores foi obtido. Este valor médio diário foi usado para confrontar com o peso médio dos grupos.

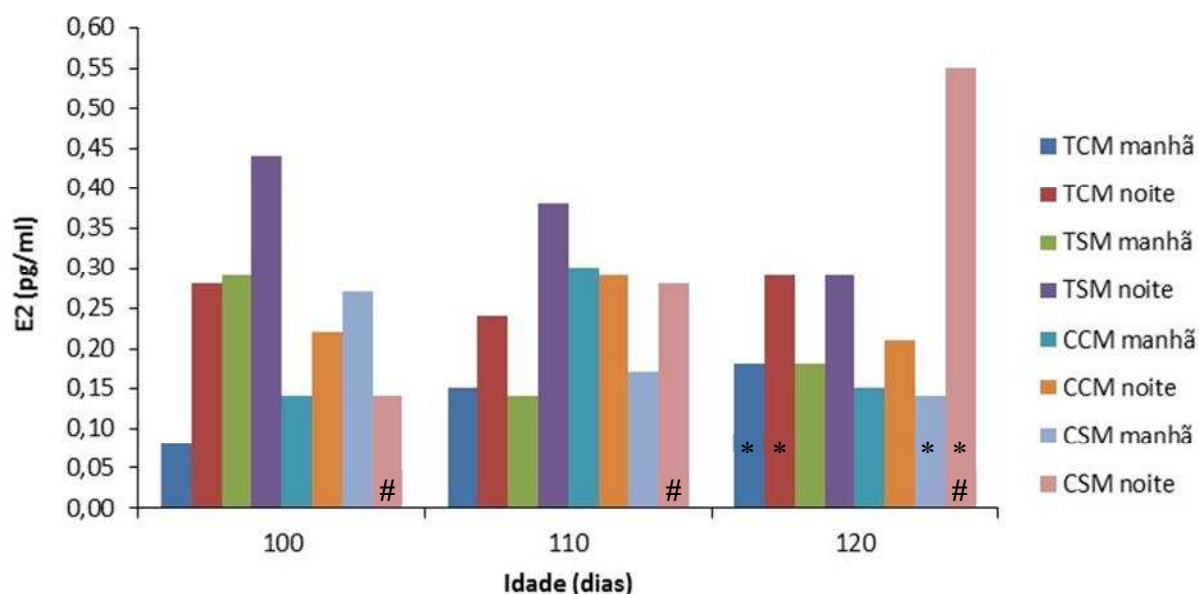


Figura 24: Comportamento do Hormônio 17 β -estradiol (E₂) de acordo com a idade, hora do dia e grupos experimentais (TCM, grupo das coelhas cauterizadas expostas ao efeito do macho; TSM, grupo das coelhas cauterizadas sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo das coelhas controles expostas ao efeito do macho; CSM, grupo das coelhas controles sem a presença do efeito do macho) de coelhas Nova Zelândia. *Indica valores de um mesmo grupo que diferiram (P<0,05) entre si nos dois momentos avaliados. # Indica valores de um mesmo grupo, em um mesmo horário do dia que diferiram (P<0,05).

Ao comparar os valores médios dos grupos por dia e o peso médio dos mesmos grupos na data da coleta de sangue, observou-se que, com 100 dias de vida, o maior valor de estradiol (0,367 pg/mL) foi encontrado no grupo TSM, o qual apresentou, nesta mesma idade, o menor peso médio. Os valores de E₂ para os grupos TCM, CSM e CCM (0,194 pg/mL, 0,232 pg/mL e 0,207 pg/mL, respectivamente) foram muito próximos.

Na idade de 110 dias, o grupo com maior valor de E₂ foi o CSM (0,302 pg/mL), e, quanto ao peso médio, este grupo foi inferior ao CCM. Os valores médios dos demais grupos foram 0,198 pg/ml, 0,236 pg/mL e 0,269 pg/mL para TCM, TSM e CCM respectivamente. Na idade de 120 dias, os grupos TCM, TSM e CSM (0,246 pg/mL, 0,273 pg/mL e 0,241 pg/mL, respectivamente) apresentaram valores próximos enquanto que o grupo CCM (0,183 pg/ml) apresentou a média mais baixa e, em contrapartida, o maior peso médio, concentração de E₂ e ganho de peso.

Existem duas teorias que associam o hormônio E₂ com o desenvolvimento corporal. A primeira diz que a ação do hormônio gonadal feminino, E₂, além de promover o comportamento sexual e estimular o desenvolvimento das características sexuais secundárias também possui efeito anabólico em vacas (Hafez et al., 2004). A

segunda, como descrita por Ignácio et al. (2009), em seu estudo de revisão sobre a associação E₂, massa corporal e atividade física, mostra autores relatando que ausência ou baixa concentração do hormônio E₂ diminui os receptores de leptina no hipotálamo, o que resulta em aumento de ingestão alimentar, e conseqüentemente aumento da massa corporal. Esta situação pode ser contornada com a reposição de E₂.

Tabela 14: Concentração sérica média (média ± erro padrão médio) de estradiol – E₂ (pg/mL), hormônio luteinizante – LH (mUI/mL) e hormônio folículo estimulante – FSH (mIU/mL) de coelhas da raça Nova Zelândia obtidos dos quatro grupos estudados nas idades de 100, 110 e 120 dias de vida e em dois momentos do dia (08:00 e 20:00).

	E ₂		LH		FSH	
	Manhã	Noite	Manhã	Noite	Manhã	Noite
----- 100 dias -----						
TCM	0,08±0,10 ^{aA}	0,28±0,16 ^{aA}	0,31±0,04 ^{aA}	0,34±0,11 ^{aA}	0,22±0,03 ^{aA}	0,24±0,0 ^{aA}
TSM	0,29±0,07 ^{aA}	0,44±0,16 ^{aA}	0,45±0,28 ^{aA}	0,33±0,0 ^{aA}	0,35±0,01 ^{aA}	0,26±0,0 ^{aA}
CCM	0,14±0,04 ^{aA}	0,22±0,13 ^{aA}	0,23±0,03 ^{aA}	0,36±0,10 ^{aA}	0,36±0,10 ^{aA}	0,34±0,30 ^{aA}
CSM	0,27±0,08 ^{aA}	0,14±0,0 ^{a*}	0,37±0,10 ^{aA}	0,29±0,04 ^{aA}	0,33±0,27 ^{aA}	0,21±0,07 ^{aA}
----- 110 dias -----						
TCM	0,15±0,07 ^{aA}	0,24±0,15 ^{aA}	0,28±0,02 ^{aA}	0,34±0,14 ^{aA}	0,22±0,04 ^{aA}	0,53±0,50 ^{aA}
TSM	0,14±0,10 ^{aA}	0,38±0,16 ^{aA}	0,28±0,05 ^{aA}	0,30±0,10 ^{aA}	0,31±0,15 ^{aA}	0,23±0,0 ^{aB}
CCM	0,30±0,18 ^{aA}	0,29±0,29 ^{aA}	0,19±0,0 ^{aA}	0,23±0,04 ^{aB}	0,31±0,0 ^{aA}	0,17±0,05 ^{aA}
CSM	0,27±0,20 ^{aB}	0,28±0,0 ^{a*}	0,44±0,20 ^{aA}	0,50±0,0 ^{aA}	0,21±0,05 ^{aA}	0,25±0,0 ^{aA}
----- 120 dias -----						
TCM	0,18±0,06 ^{bA}	0,29±0,27 ^{aA}	0,36±0,19 ^{aA}	0,25±0,05 ^{aA}	0,19±0,05 ^{aA}	0,18±0,03 ^{aA}
TSM	0,26±0,12 ^{aA}	0,28±0,20 ^{aA}	0,25±0,04 ^{aA}	0,26±0,08 ^{aA}	0,20±0,06 ^{aA}	0,23±0,01 ^{aB}
CCM	0,15±0,0 ^{aA}	0,21±0,16 ^{aA}	0,25±0,0 ^{aA}	0,18±0,03 ^{aB}	0,18±0,0 ^{aA}	0,21±0,04 ^{aA}
CSM	0,14±0,10 ^{bb}	0,55±0,0 ^{a*}	0,31±0,19 ^{aA}	0,15±0,0 ^{aA}	0,25±0,08 ^{aA}	0,18±0,0 ^{aA}

TCM, cauterizado exposto ao efeito do macho; TSM, cauterizado sem a presença do efeito do macho; CCM, controle exposto ao efeito do macho; CSM, controle sem a presença do efeito do macho.

*Valores não puderam ser avaliados pelo número reduzido de amostras.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste F.

Com base nos resultados deste experimento, as fêmeas dos grupos com maiores níveis de E_2 apresentaram menor peso corporal, conforme a revisão de Ignácio et al. (2009). E, ao reavaliar os dados, os animais dos grupos com menores níveis de E_2 apresentaram maior peso corporal e, como descrito anteriormente, níveis menores de E_2 significariam peso maior, e com conseqüente acúmulo de gordura. Este acúmulo não foi observado durante a necropsia, nem durante a avaliação da composição dos músculos vasto medial e reto femoral.

Outro aspecto que também influenciaria esta diferença de massa corporal seria o comportamento de auto-catação que os animais controles longe do efeito do macho apresentaram. Teria sido esta atividade associada à ausência da influência masculina a responsável pelo menor ganho de peso do grupo CSM já que não houve diferença hormonal? Ou se poderia pensar que o efeito do macho exercem papel ainda mais importante no ganho de peso destes animais, independente do comportamento, por este influenciar a liberação de hormônios sexuais e/ou leptina?

A figura 25 mostra os valores para o hormônio luteinizante (LH). encontrados nos dois momentos do dia e nos grupos estudados. O grupo controle deste experimento mostrou que, com o passar dos dias, os valores de LH foram diminuindo. Este mesmo padrão não pode ser aplicado para os demais grupos.

A figura 25 também demonstrou que, na idade de 120 dias, idade na qual as fêmeas seriam iniciadas na reprodução, houve um padrão para todos os grupos de liberação de LH, sendo que no período da manhã, seus níveis circulantes foram superiores aos noturnos. Com base nestes resultados, não se pode afirmar que, nas idades subsequentes, o padrão se repetiria, já que o experimento terminou na idade de 120 dias, mostrando que seriam necessários mais estudos sobre a liberação de LH em idades subsequentes para confirmação deste padrão.

Baseando-se no grupo controle (CCM), os valores para o hormônio folículo estimulante (FSH) foram diminuindo com o passar da idade, além de mostrar que nas idades de 110 e 120 dias, houve inversão no momento de maior liberação de FSH, passando do noturno para diurno (Figura 26). O grupo tratado sem efeito do macho (TSM) apresentou o mesmo padrão do grupo CCM.

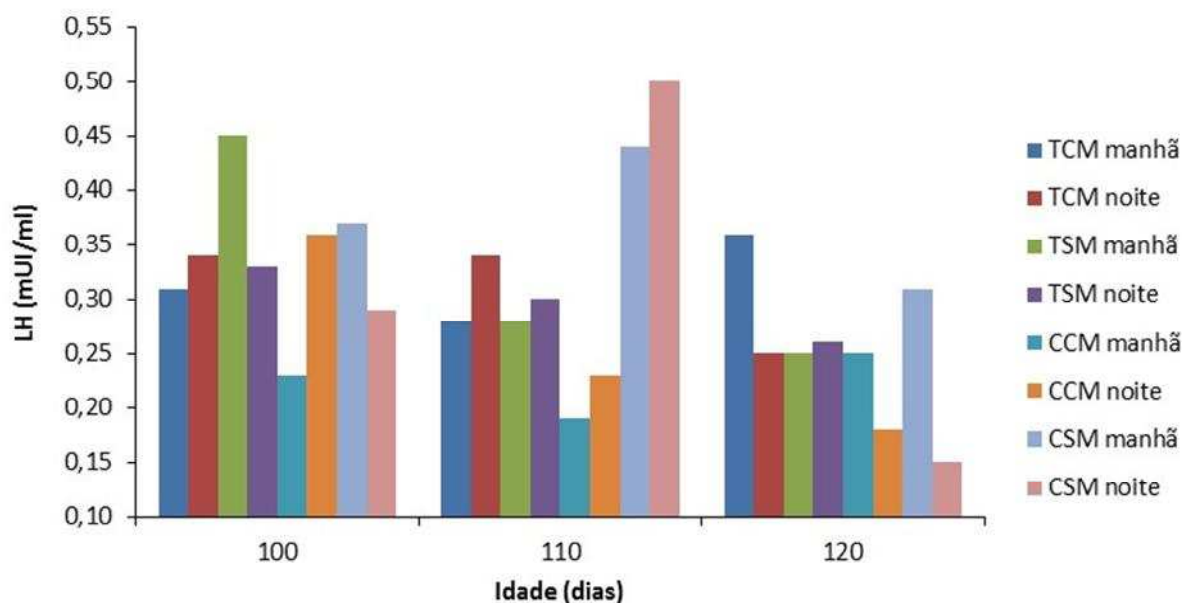


Figura 25: Comportamento do hormônio luteinizante (LH) de acordo com a idade, hora do dia e grupos experimentais de coelhas da raça Nova Zelândia (TCM, grupo das coelhas cauterizadas expostas ao efeito do macho; TSM, grupo das coelhas cauterizadas sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo das coelhas controles expostas ao efeito do macho; CSM, grupo das coelhas controles sem a presença do efeito do macho).

Na análise deste hormônio, destacou-se os valores encontrados para o grupo TCM à noite, nas idades de 110 e 120 dias. Na idade de 110 dias, o valor foi o mais alto, chegando ao dobro dos demais (Tabela 14) e, ao chegar à idade de 120 dias, este valor reduziu em mais de 30%.

Outro ponto a se destacar com relação ao FSH é que, à idade de 120 dias, os valores de todos os grupos e em todos os horários estão mais próximos, não havendo grande divergência entre os valores, como encontrado nas outras idades.

Conforme se verifica na tabela 14, os valores encontrados para o hormônio FSH foram comparados conforme a idade, mostrando haver diferença para os valores noturnos do grupo TSM entre as idades de 100, 110 e 120 dias.

A concentração dos hormônios LH e FSH, neste estudo, independente do grupo experimental diminuiu entre a 14^a e 17^a semanas de vida. Diaz et al. (1991) estudando a concentração destes hormônios encontrou uma concentração de LH constante entre a 14^a e 20^a semanas, e uma concentração crescente de FSH até a 20^a semana. Com base nos resultados destes autores e dos resultados obtidos aqui, mais estudos obtendo concentrações hormonais são necessários para esclarecer o comportamento destes em

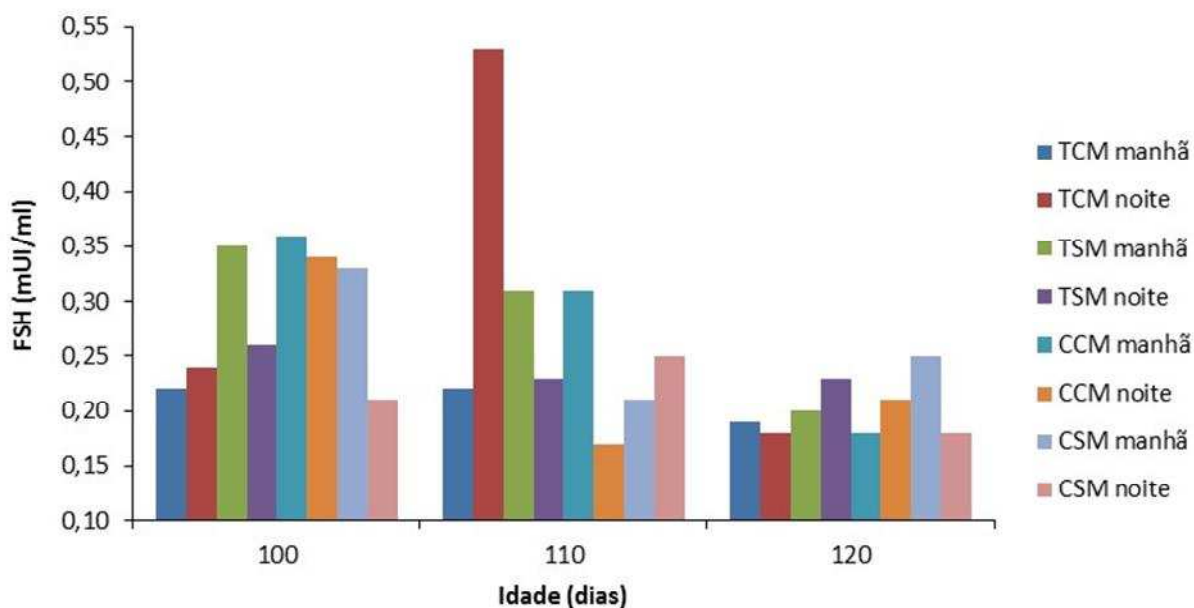


Figura 26: Comportamento do hormônio folículo estimulante (FSH) de acordo com a idade, hora do dia e grupos experimentais de coelhas da raça Nova Zelândia (TCM, grupo das coelhas cauterizadas expostas ao efeito do macho; TSM, grupo das coelhas cauterizadas sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo das coelhas controles expostas ao efeito do macho; CSM, grupo das coelhas controles sem a presença do efeito do macho).

fêmeas em puberdade.

Até então, os hormônios foram avaliados isoladamente. A partir deste momento, foi feita uma média diária dos hormônios e, então, os três hormônios foram reunidos por tratamento em um único gráfico para poder avaliar o comportamento dos mesmos (Figura 27).

Na fisiologia da reprodução, os três hormônios estudados interagem da seguinte forma: o E_2 exerce retroalimentação estimulatória ou inibitória sobre os estímulos que causam sua própria liberação, ou seja, sobre os hormônios hipofisários FSH e LH (Hafez et al., 2004). Mas, estudando especificamente a fisiologia reprodutiva da coelha, fatores externos como manejo, nutrição e ambiente com estímulos auditivos, olfatórios, visuais e estressantes podem gerar sinais neuromoduladores que influenciam na secreção hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e, conseqüentemente, modificam de forma positiva ou negativa os parâmetros reprodutivos (Theau-Clément, 2000; Boiti, 2004).

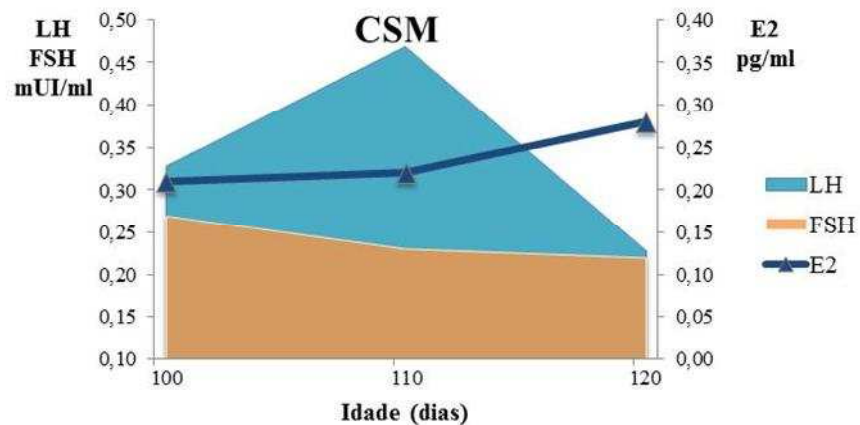
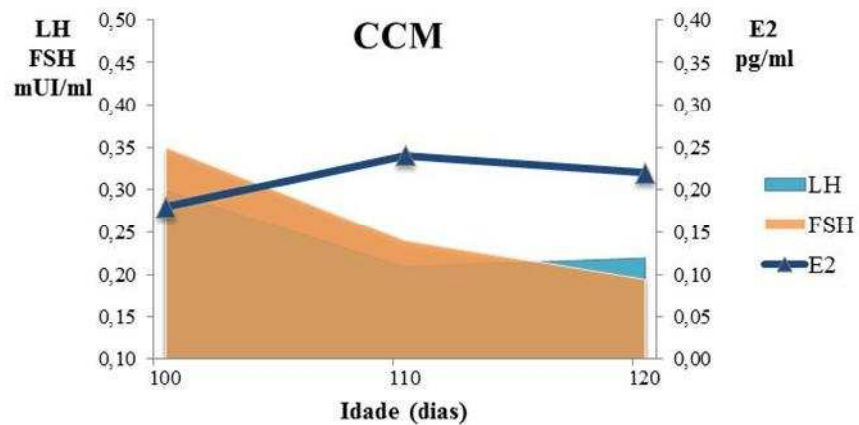
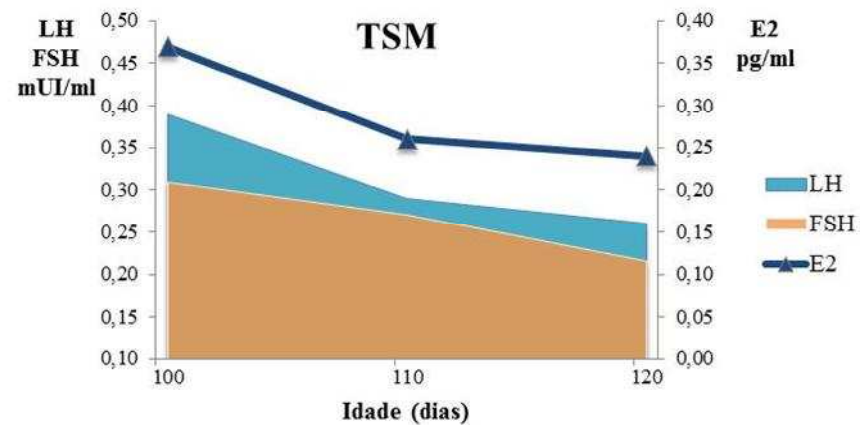
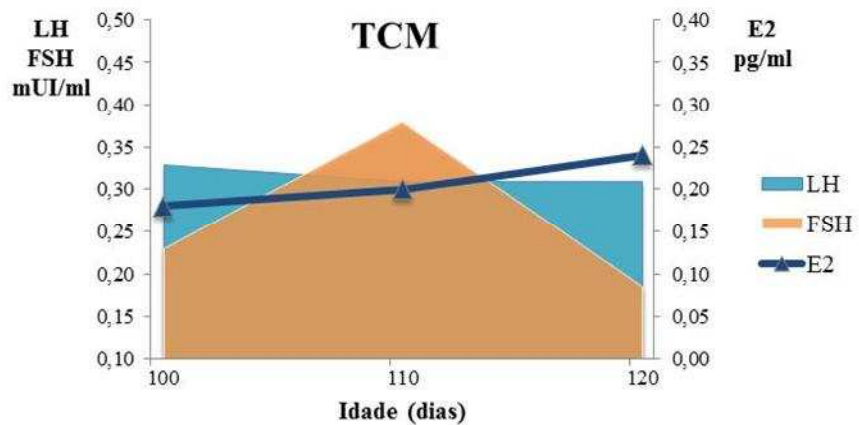


Figura 27: Associação dos hormônios E₂, LH e FSH com a idade e a presença ou não do efeito do macho em coelhas da raça Nova Zelândia.

Além dos fatores externos, fatores internos produzidos por folículos dominantes também influenciam na secreção dos hormônios hipofisários, como a inibina, IGFI e folistatina, sendo que este último inibe a ação da ativina por se juntar a ela impedindo indiretamente, a liberação de FSH pela hipófise, reduzindo seus níveis circulantes (Arias-Álvarez et al., 2007).

A figura 27, correspondente ao grupo TCM, mostra que entre os dias 100 e 110, a concentração do LH está diminuindo, favorecendo o aumento da concentração do FSH, o que acarreta um aumento no número de folículos em crescimento e consequentemente o aumento da concentração sérica do E₂. Neste momento, a alta concentração do E₂ exerce um feedback negativo sobre o FSH e pouco influencia na concentração do LH

Na figura 27, cujo gráfico correspondente ao grupo TSM, observa-se que a concentração do E₂ está no seu máximo, momento onde grande quantidade de folículos são estimulados, exercendo um *feedback* negativo sobre os hormônios hipofisários, e mesmo depois de sua concentração diminuir, continuou alta o suficiente para continuar exercendo efeito negativo sobre os outros hormônios estudados.

O gráfico da figura 27 que corresponde ao grupo CCM demonstra que aos 100 dias, quando o FSH está alto, ocorre estimulação dos folículos com a concentração sérica de E₂ e LH tendendo a aumentar. Devido a este estímulo, a concentração do E₂ torna-se alta o suficiente para exercer *feedback* negativo na secreção dos hormônios hipofisários (LH e FSH).

O último gráfico da figura 27 que corresponde ao grupo CSM mostra que entre as idades de 100 e 110 dias a concentração do hormônio LH aumentou, exercendo efeito positivo sobre a concentração do E₂ e negativo sobre o FSH. A partir deste momento, a concentração de E₂ ficou alta o suficiente para exercer *feedback* negativo nas secreções dos hormônios hipofisários estudados.

4.1.9. Análise histológica

Ao analisar os cortes ovarianos, os folículos foram divididos quanto ao número de ovócitos por folículo (um ovócito - monovular e dois ou mais ovócitos - poliovular), quanto ao estágio de desenvolvimento (primordial, transição, primário, secundário, terciário) e quanto à viabilidade (normal, degenerado e atrésico).

A análise ovariana mostrou que, os folículos do tipo monovular, os grupos tratados (TCM e TSM) apresentaram uma maior quantidade de folículos primordiais normais, quando comparados aos grupos controles. Também mostrou que o grupo com menor quantidade de folículos de transição foi o CSM. Os folículos primários apresentam-se distribuídos de forma similar entre os grupos. Já os grupos tratados (TCM e TSM) apresentaram maior quantidade de folículos secundários, quando comparados aos controles. E o grupo CCM apresentou maior quantidade de folículos terciários.

Já para os folículos do tipo poliovular, os folículos primordiais, de transição e primário se encontram em maior quantidade nos grupos tratados (TCM e TSM) em relação com os controles (Figura 28). Quanto aos folículos degenerados, nos grupos tratados (TCM e TSM) estão presente em maior quantidade, quando comparados aos grupos controle (CCM e CSM) e o TSM apresentaram maior quantidade de folículos atrésicos.

Na análise estatística destes dados, observou-se que a cauterização dos ductos incisivos influenciou ($P < 0,05$) o número de folículos degenerados, folículos primários poliovulares normais (tanto com dois, três e quatro ovócitos). A presença de folículos com dois ovócitos também sofreu influência da cauterização dos ductos incisivos ($P < 0,01$). Quando agrupados os dados quanto à viabilidade, a cauterização dos ductos incisivos influenciou o número folículos degenerados ($p < 0,05$).

Quando avaliados os folículos normais, observou-se grande quantidade de folículos com dois ou mais ovócitos. Este achado não é incomum nas coelhas, como citado por Al-Mufti et al., (1988). No presente estudo, observou-se grande quantidade de folículos poliovulares, como no caso dos grupos TSM e TCM. Este achado sugere que a cauterização dos ductos incisivos influenciou na foliculogênese, gerando grande quantidade de folículos nesta condição, já que nos animais controles estes folículos também foram encontrados, mas em menor quantidade (Figura 29).

Al-Mufti et al. (1988), ao estudar os ovários de coelhas, observou que os folículos poliovulares podem se desenvolver e ovular assim como os folículos monovular. Estes autores destacam que os folículos poliovulares ovulam na sua maioria um único ovócito porque os demais tendem a degenerar, embora possa ocorrer uma ovulação de um folículo com mais de um ovócito, situação observada quando o número de fetos e corpos lúteos não coincide.

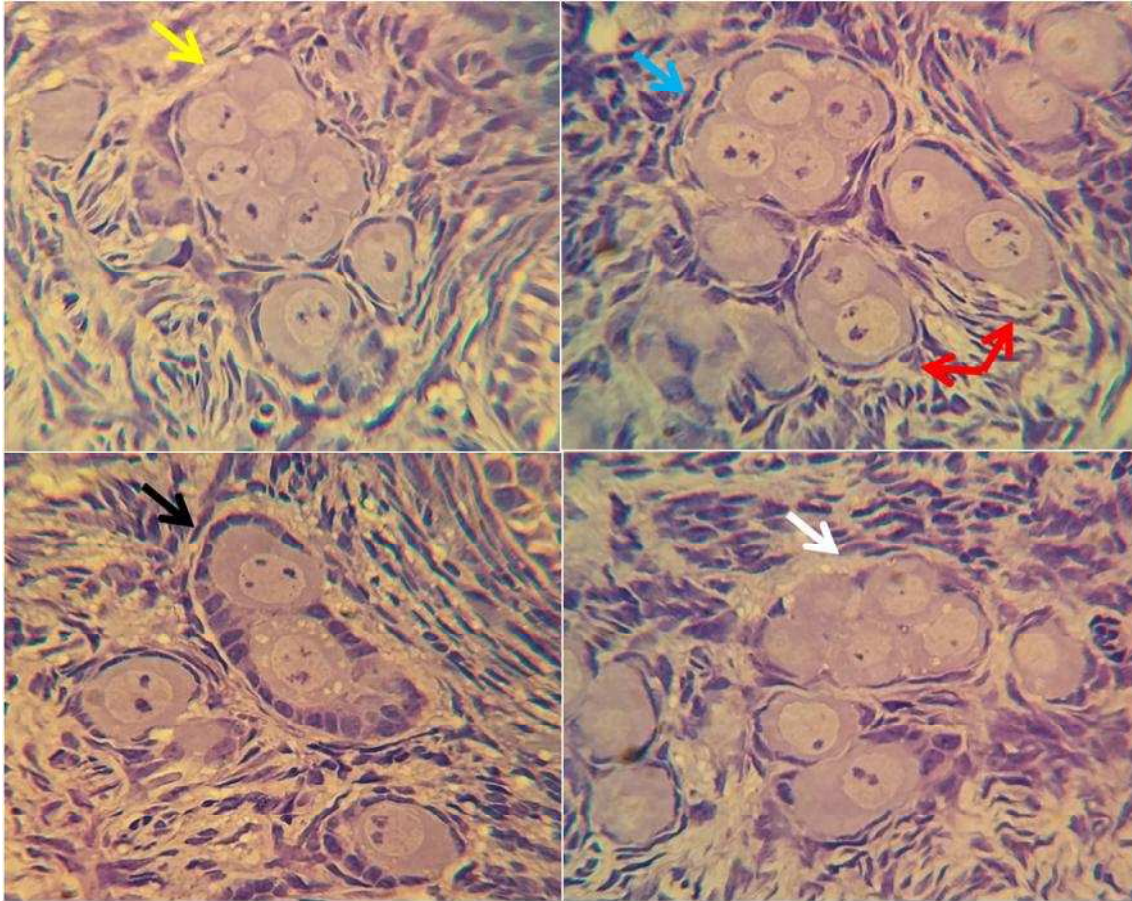


Figura 28: Cortes histológicos de ovários de coelhas da raça Nova Zelândia com destaque para os folículos poliovulares. Seta branca: folículo poliovular primordial com cinco ovócitos; seta preta: folículo poliovular de transição com dois ovócitos; seta amarela: folículo poliovular primordial com sete ovócitos; seta azul: folículo poliovular primordial com quatro ovócitos; seta vermelha: folículo poliovular primordial com dois ovócitos. (Fotos obtidas na objetiva de 40x, Azul de toluidina).

Também se observou que o número de folículos com dois ovócitos é o tipo de folículo poliovular mais encontrado em todos os grupos experimentais, e está mais presente nos grupos tratados (TSM e TCM). Destaca-se que nos dois grupos tratados (TSM e TCM) o número de folículos com três ou mais ovócitos também foi superior aos grupos controles. Dentre os grupos controles, o CCM apresentou uma maior quantidade de folículos poliovulares com diferentes números de ovócitos, enquanto que o CSM apresentou somente folículos com dois e três ovócitos.

Os hormônios estão relacionados com a atividade folicular, devido esta associação, foi feita uma correlação entre os hormônios LH, FSH e E₂ com a quantidade e tipo de folículos encontrados em cada grupo estudado.

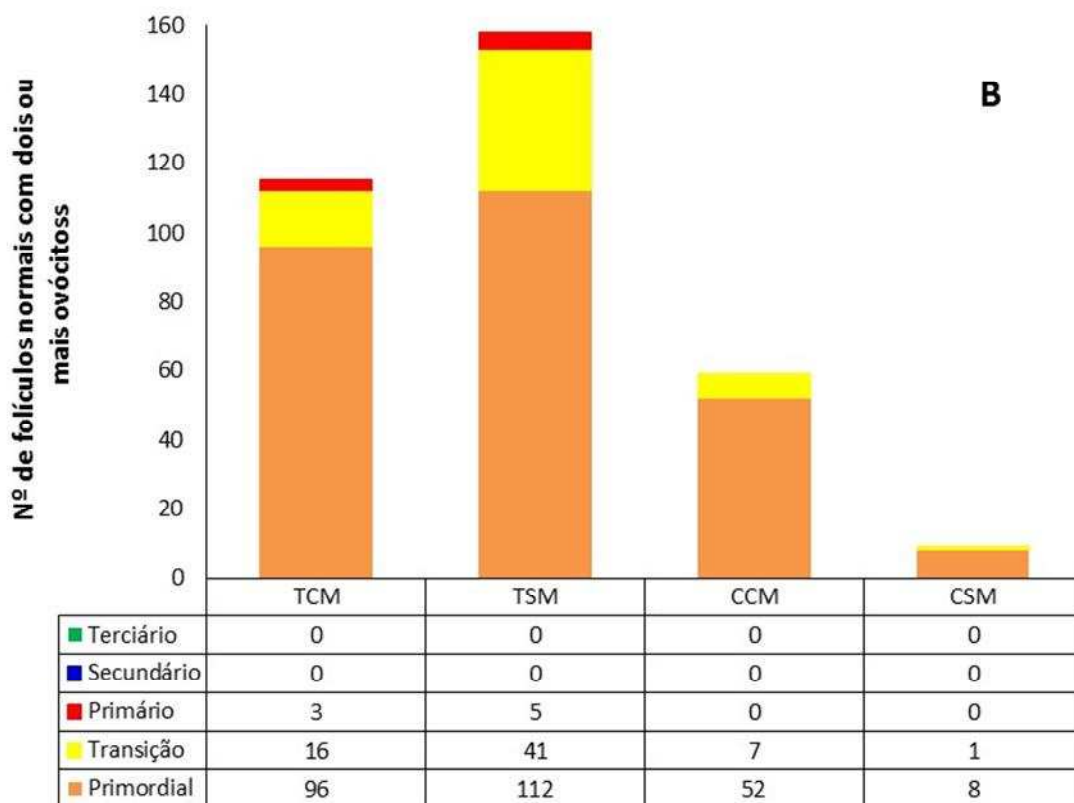
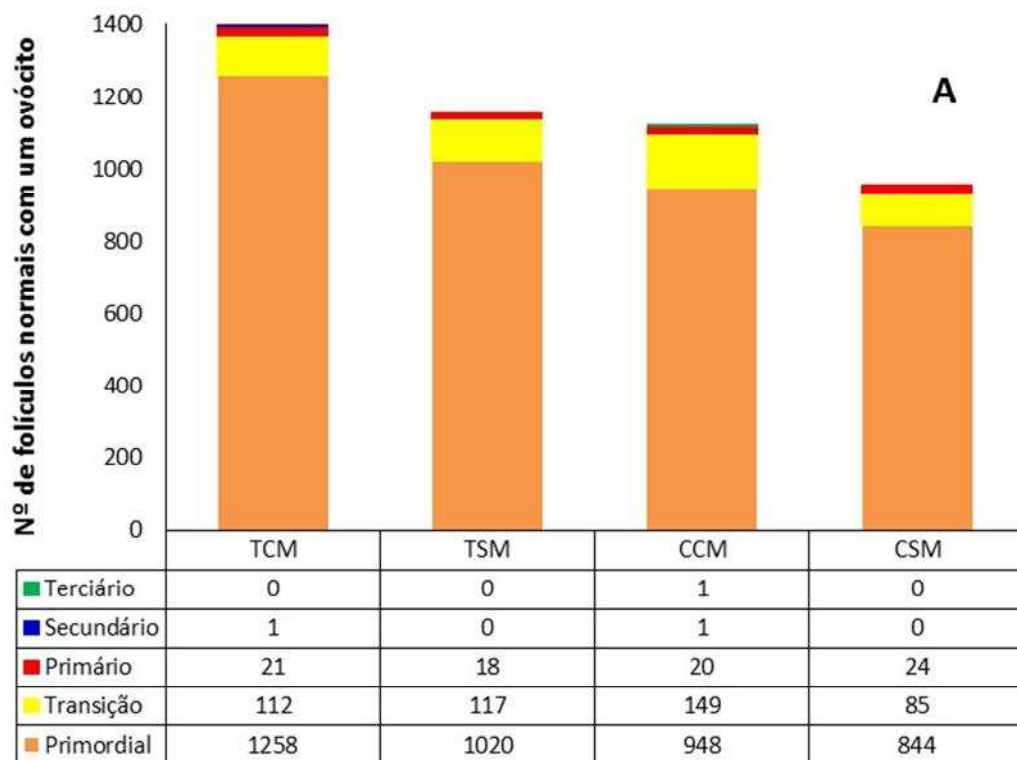


Figura 29: Número de folículos normais com um ovócito (A) e com dois ou mais ovócitos (B) nos diferentes grupos experimentais (TSM, CSM, TCM e CCM) de coelhas da raça Nova Zelândia.

Com base na tabela 15, pode-se dizer que nos grupos tratados (TSM e TCM), uma maior quantidade numérica de folículos normais, degenerados e poliovulares foram encontrados e, após as análises, observou-se que a cauterização influenciou no número de folículos degenerados independente da interação com o macho.

Resumidamente sabe-se que a atividade ovariana sofre influencia dos hormônios hipofisários (LH e FSH) e conseqüentemente estes sofrem ação dos hormônios ovarianos (17β -estradiol e inibina) e a ação destes hormônios nos órgãos alvos é lenta (Hafez et al., 2004). Os valores dos hormônios usados na tabela 16 são pontuais, e seria necessária uma avaliação com dados de dias consecutivos ou até mesmo várias coletas em um único dia, devido a pulsatilidade dos hormônios hipofisários, para se fazer uma associação mais precisa dos mesmos nos ovários e conseqüentemente nos folículos.

O outro órgão que também foi avaliado histologicamente foi o útero. Sua morfometria mostrou que não houve diferença entre as camadas serosa, musculares, incluindo o tecido conjuntivo, luz do órgão e ligamento (Figura 30).

A camada endometrial foi dividida em endométrio, vasos sanguíneos e glândulas endometriais. O endométrio não apresentou diferença entre os grupos, mas quando analisado os vasos e as glândulas, observou que tanto a cauterização como o efeito do macho influenciaram ($P < 0,01$) nos vasos, enquanto que nas glândulas, somente o efeito do macho influenciou ($P < 0,05$) (Figura 30).

Estes dados mostram que a cauterização não causou mudanças significativas no útero já que fêmeas cauterizadas foram capazes de manter a gestação e com número de lâparos desejáveis para a raça.

Tabela 15: População folicular nos ovários de coelhas da raça Nova Zelândia nos quatro grupos experimentais.

		TCM			TSM			CCM			CSM		
		Normal	Deg.	Total	Normal	Deg.	Total	Normal	Deg.	Total	Normal	Deg.	Total
Folículos (1 ovócito)	Primordial	1258	72	1330	1020	40	1060	948	20	968	844	43	887
	Transição	112	11	123	117	32	149	149	11	160	85	4	89
	Primário	21	12	33	18	25	43	20	8	28	24	10	34
	Secundário	1	6	7	0	4	4	1	4	5	0	6	6
	Terciário	0	3	3	0	0	0	1	2	3	0	1	1
Folículos (2 ou mais ovócitos)	Primordial	96	2	98	112	0	112	52	1	53	8	0	8
	Transição	16	0	16	41	0	41	7	0	7	1	0	1
	Primário	3	0	3	5	0	5	0	0	0	0	0	0
	Secundário	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terciário	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atrésicos		99			143			122			136		

TCM, grupo tratado exposto ao efeito do macho; TSM, grupo tratado sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo controle exposto ao efeito do macho; CSM, grupo controle sem a presença do efeito do macho.

Deg: degenerado

Tabela 16: Valores médios e desvios-padrão dos hormônios estradiol (E_2 –pg/mL), luteinizante (LH-mUI/mL) e folículo estimulante (FSH-mUI/mL) e número de folículos normais (FOLNOR), degenerados (FOLDEG), folículos atresícos (FOLATRES) e total de folículos (TFOL) em coelhas da raça Nova Zelândia submetidas ou não a cauterização (T e C) e manejadas na ausência ou presença do macho (SM e CM).

	SM	CM	T	C
E_2	0,25±0,16 ^a	0,22±0,16 ^a	0,26±0,17 ^a	0,21±0,14 ^a
LH	0,27±0,13 ^a	0,25±0,11 ^a	0,28±0,09 ^a	0,24±0,14 ^a
FSH	0,23±0,05 ^a	0,19±0,03 ^a	0,20±0,04 ^a	0,22±0,06 ^a
FOLNOR	284,37±147,20 ^a	335,62±132,90 ^a	352,50±154,31 ^a	267,50±113,53 ^a
FOLDEG	20,62±08,45 ^a	19,00±15,05 ^a	25,87±12,64 ^a	13,75±07,46 ^b
ATRES	34,87±19,37 ^a	27,62±14,13 ^a	30,25±14,96 ^a	32,25±19,46 ^a
TFOL	339,87±154,44 ^a	382,25±138,86 ^a	408,62±149,34 ^a	313,50±129,18 ^a

Não há interação entre cauterização e efeito do macho;

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e dentro de cada grupo de cauterização ou presença ou não do macho diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste F.

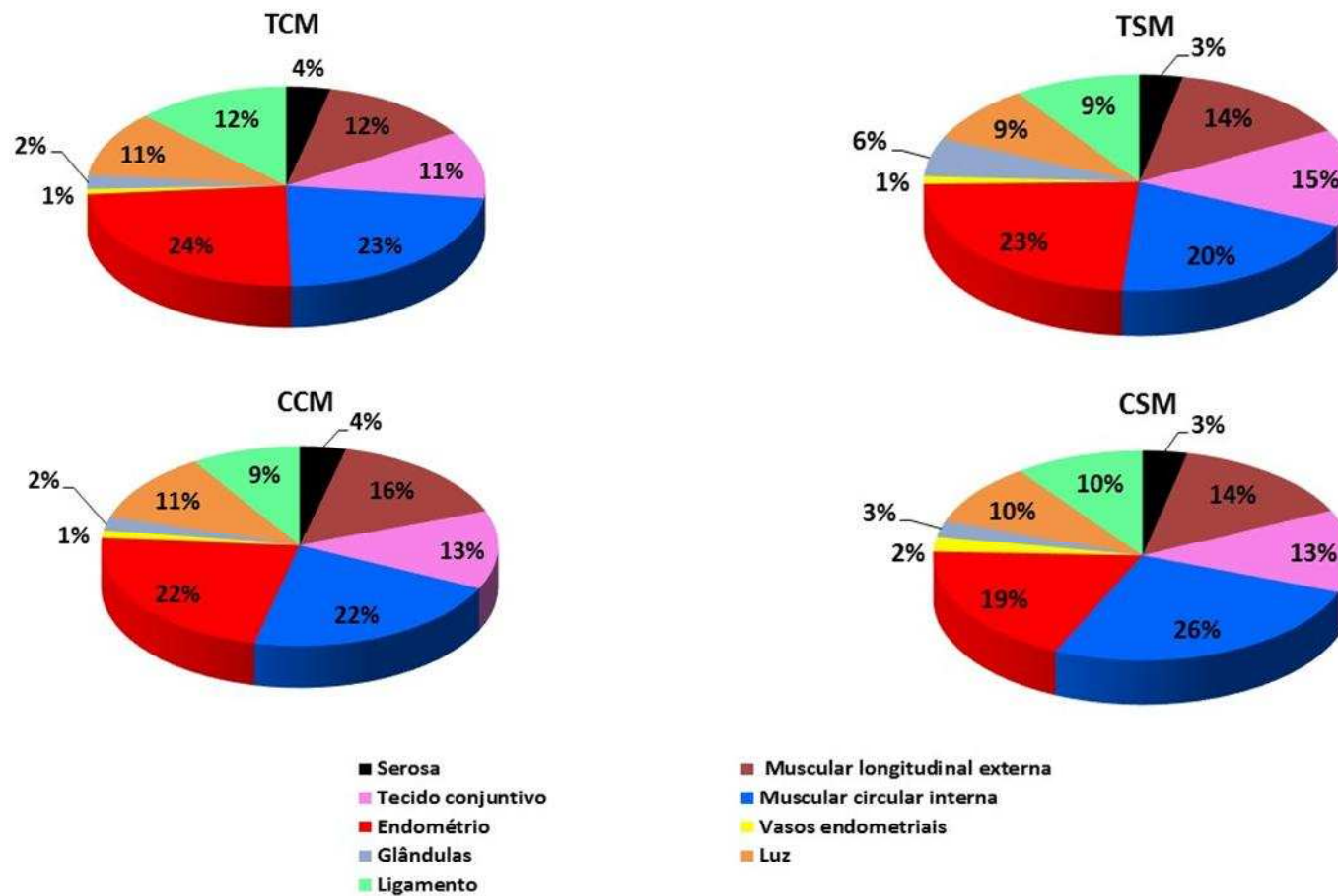


Figura 30: Morfometria uterina obtida por meio de contagem de pontos de coelhas da raça Nova Zelândia (TCM, grupo tratado exposto ao efeito do macho; TSM, grupo tratado sem a presença do efeito do macho; CCM, grupo controle exposto ao efeito do macho; CSM, grupo controle sem a presença do efeito do macho).

4.2. EXPERIMENTO 2. INFLUÊNCIA DA CAUTERIZAÇÃO DOS DUCTOS INCISIVOS NA CAPACIDADE DE GESTAÇÃO E NA HABILIDADE MATERNA DE COELHAS NOVA ZELÂNDIA

As fêmeas pertencentes ao grupo TPR quando apresentadas aos machos mostravam vulva com coloração que indicava que estavam aptas para a cobertura (coloração rosa, vermelha e/ou violeta), e se comportavam como qualquer outra coelha que se inicia na vida reprodutiva. Algumas fêmeas, a princípio, se assustaram com o cortejo feito pelo macho. Depois de adaptadas ao macho, assim como as demais coelhas não submetidas à cauterização dos ductos incisivos, aceitavam a monta apresentando lordose do terço caudal do corpo e elevação da cauda.

As coelhas do grupo TPR apresentadas ao macho pela primeira vez apresentaram taxa de gestação de 80% (4 em 5), o que é considerado aceitável para as reprodutoras do Setor de Cunicultura/DZO/UFV. Desta forma, pode-se afirmar que a inativação do OVN por meio da cauterização dos ductos incisivos não alterou a capacidade de gestação destas fêmeas.

Além da capacidade de gestação, a habilidade de preparar os ninhos para o parto também foi avaliada. Dois dias antes da data prevista para o parto, o ninho era alocado na gaiola e, nestes dois dias, as coelhas os preparavam com seus próprios pelos. Assim como os ninhos das coelhas do Setor de Cunicultura/DZO/UFV, as coelhas do grupo TPR também tiveram seus ninhos avaliados, mostrando que em ambas as situações a habilidade de montar os ninhos foi se aperfeiçoando conforme ganhavam experiência com partos sucessivos.

Após o parto se faz necessário o acompanhamento diário dos ninhos para observar o desenvolvimento dos láparos. Como regra do Setor de Cunicultura, se realiza o remanejamento dos láparos entre as matrizes lactantes para não ocorrer o desgaste excessivo de algumas matrizes, com conseqüente perda de filhotes, enquanto outras matrizes são subutilizadas. Como as coelhas dos grupos TPR e TPP estavam inseridas no manejo do Setor de Cunicultura/DZO/UFV, o mesmo ocorria com elas.

Na tabela 17 são mostrados o número de láparos por parto, os valores para peso ao nascimento, aos 20 dias e aos 30 dias (dia do desmame) de partos para as cinco coelhas do grupo TPR, somando um total de 15 partos. Estes dados mostraram que o

comportamento mãe/láparo foi mantido, que estas fêmeas não negaram os seus próprios láparos e nem os láparos que a ela foram dados, o que comprova a manutenção do reconhecimento materno das crias e da habilidade materna destas coelhas.

As coelhas do grupo TPP que tiveram seus ductos incisivos cauterizados 10 dias após o parto não demonstraram nenhuma diferença no comportamento frente às crias depois da cauterização (Figura 31), e nenhuma alteração de comportamento nos partos posteriores.

Os dados obtidos neste estudo foram confrontados com os dados disponibilizados pelo Setor de Cunicultura/DZO/UFV. Desta forma, foram comparados dados de fêmeas que pariram no mesmo período que as fêmeas do grupo TPR (junho 2013 a janeiro 2014) e que estavam submetidas às mesmas condições de ambiente (temperatura, umidade, luminosidade) e manejo. Desta forma, a comparação torna-se mais real porque, ao se comparar com dados de artigos publicados, muitos vieses (temperatura, umidade, luminosidade, alimentação, e principalmente manejo) não seriam levados em consideração.

Os resultados mostraram que, ao contrário do encontrado nas porquinhas da Índia (Planel, 1953), camundongas (Martel e Baum, 2009) e ratas (Rajendren et al., 1990), as coelhas continuaram aceitando o cortejo dos machos, a capacidade de gestação foi mantida e a habilidade materna preservada, independente do momento da cauterização dos ductos incisivos. Estes resultados mostram que nas coelhas possivelmente ocorra ligação da via olfatória principal e da via vomeronasal.

Tabela 17: Média de lâparos nascidos (LNA), natimortos (LNT), e número de indivíduos (NI) aos 20 e 30 dias de vida. Peso médio (gramas) da ninhada completa (PT) e individual (PI) dos lâparos ao nascer, aos 20 dias e 30 dias de vida (idade do desmame). Os dados se referem às 25 ninhadas das fêmeas da raça Nova Zelândia utilizadas como matrizes no Setor de Cunicultura (DZO/UFV) e das fêmeas cujos ductos incisivos foram cauterizados aos 50 dias de idade e introduzidas na reprodução.

	Lâparos recém nascidos				Lâparos 20 dias			Lâparos 30 dias		
	LNA	LNT	PT	PI	NI	PT	PI	NI	PT	PI
Coelhas cunicultura	8,6±1,3 ^a	0,8±0,9 ^a	486,0±58,0 ^a	64,1±10,0 ^a	8,5±1,1 ^a	2523,9±135,1 ^a	300,1±29,4 ^a	8,4±1,0 ^a	4830,0±552,3 ^a	578,1±58,5 ^a
Coelhas cauterizadas	7,8±1,5 ^a	0,0 ^b	399,6±70,6 ^b	51,6±5,1 ^b	7,2±2,3 ^a	2078,6±1121,9 ^a	270,5±143,3 ^a	7,21±2,3 ^a	4193,2±1792 ^a	544,8±229,3 ^a

As médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.



Figura 31: Coelha da raça Nova Zelândia que teve seus ductos incisivos cauterizados preparando ninho para o parto (A). O ninho com lâparos recém-nascidos (B) e coelha amamentando lâparos (C).

7. CONCLUSÃO

Os experimentos envolvendo a cauterização dos ductos incisivos com consequente inativação do órgão vomeronasal, associado ao efeito ou não do macho e suas consequências sobre os aspectos reprodutivos, comportamentais, composição de carcaça e comprimento do OVN de coelhas da raça Nova Zelândia, permitiram concluir que:

O peso final dos animais foi influenciado pelo efeito do macho e não pela cauterização dos ductos incisivos;

A coloração da vulva sofreu influência do efeito do macho;

Os animais sem influência do efeito do macho gastaram mais tempo com o comportamento de auto-catação;

A cauterização dos ductos incisivos não influenciou no comportamento frente ao macho nem na habilidade materna;

Não foram observadas diferenças morfológicas e morfométricas nos órgãos genitais entre os grupos;

A composição dos músculos e a densidade óssea não mostraram diferenças entre os grupos;

O comprimento do órgão vomeronasal dos animais cujos ductos incisivos foram cauterizados foi menor, sugerindo dimorfismo sexual;

Os ovários mostraram maior número de folículos poliovulares nos animais com os ductos incisivos cauterizados;

Nenhuma das alterações nos órgãos genitais decorrentes da cauterização dos ductos incisivos incapacitou as fêmeas de ficarem gestantes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.R.; WIEKAMP, M.D. The canine vomeronasal organ. **Journal of Anatomy**, v.138, p. 771-787, 1984.
- ADRIAENS, I.; CORTVRINDT, R.; SMITH, J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects of folliculogenesis and developmental oocyte competence. **Human Reproduction**. v.19, n.2, p. 398-408, 2004.
- ALEJANDRE, C.C. Fisiología del aparato reproductor y ritmos de reproducción em cunicultura. Informe técnico. **Boletín de Cunicultura**, n.43, 1988.
- AL-MUFTI, W.; BOMSEL-HELMREICH, O.; CHRISTIDES, J.P. Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, n.1, p.15-25, 1988.
- ALVAREZ, J.C. Trabajos originales. La reproducción en la coneja. **Universidad Autónoma de Barcelona**. Abril, 1985.
- ALVARIÑO, M.R. Aparato reproductor. In: **Control de la reproducción en el conejo**. Editora Mundi-Prensa, p.11-20, 1993.
- ÄNGGÅRD, A.; LUNDBERG, J.M.; LUNDBLAD, L. Nasal autonomic innervation with special reference to peptidergic nerves. **European Journal of Respiratory Diseases. Supplement**. v.128, p.143-149, 1983.
- ARIAS-ÁLVAREZ, M.; GARCÍA-GARCÍA, R.M.; REBOLLAR, P.G.; LORENZO, P.L. Desarrollo folicular en la coneja. **Información Técnica Económica Agrária -ITEA**, v.103, n.4, p.173-185, 2007.
- ARIAS-ÁLVAREZ, M.; GARCÍA-GARCÍA, R.M.; TORRES-ROVIRA, L.; GONZALEZ-BULNES, A.; REBOLLAR, P.G.; LORENZO, P.L. Influence of hormonal and non hormonal estrus synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early post partum period. **Theriogenology**, v.73, p.26-35, 2010. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.07.017)
- BAUM, J. Contribution of pheromones processed by the main olfactory system to mate recognition in female mammals. **Frontiers in Neuroanatomy**, v.6, artigo.20, 2012. (doi: 10.3389/fnana.2012.00020)
- BAKKER, J.; BAUM, M.J. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.21, p. 220-262, 2000. (doi: 10.1006/fne.2000.0198)
- BARGMAN, C.I. Olfactory receptor, vomeronasal receptors, and the organization of olfactory information. **Cell**, v.90, p.585-587, 1997.
- BEREPUDO, N.A.; NODU, M.B.; MONSI, A.; AMADI, E.N. Reproductive response of prepubertal female rabbit to photoperiod and/or male presence. **World Rabbit Science**, v.2, p. 83-87, 1993.
- BEYER, C.; HOFFMAN, K.L.; GONZÁLEZ-FLORES, O. Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: Similarities and differences with the rat. **Hormones and Behavior**, v. 52, p.2-11, 2007. (doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.027)

- BOITI, C. Underlying physiological mechanisms controlling the reproductive axis of rabbit does, **8th World Rabbit Congress**, Puebla (Mexico), p.186-206, 2004.
- BOUCHER, S., I PUYOL, O. P., I JANSÁ, J. P., I RIBA, J. R., TRAN, G. Relación entre el color de la vulva y factores reproductivos en conejas multiparas. **Boletín de Cunicultura**, v.42, p. 45-49, 1988.
- BOUSSIT, D. Reproduction et insemination artificielle en cuniculture. Ed.: **l'Association Française de Cuniculture**. Lempdes. Francia. 234 pp. 1989.
- BRASIL, A.F.; FERREIRA, A.M.R.; MORAES, I.A.; PISSINATTI, A. Estudo da atresia folicular em fêmeas de *Leontopithecus rosalia* de diferentes posições hierárquicas. **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v.27, suplemento, 2007.
- BRECCHIA, G.; BONANNO, A.; GALEATI, G.; FEDERICI, C.; MARANESI, M.; GOBBETTI, A.; ZERANI, M.; BOITI, C. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: Effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. **Domestic Animal Endocrinology**, v.31, p.105-122, 2006.
- BRENNAN, P.A. The vomeronasal system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.58, p.546-555, 2001.
- BREWER, N.R. Biology of the rabbit. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.45, n.1, p. 8-24, 2006.
- BROOM, R. Comparative anatomy of the mammalian organ of Jacobson. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**, v.39, p.233-255, 1897; citado por SMITH, T.D.; SIEGEL, M.I.; MOONEY, M.P.; BURDI, A.R.; BURROWS, A.M.; TODHUNTER, J.S. Prenatal growth of the human vomeronasal organ. *The Anatomical Record*, v.248, p.447-455, 1997.
- CHENG, H.; DOOLEY, M.P.; HOPKINS, S.M.; ANDERSON, L.L.; YIBCHOK-ANUN, S.; HSU, W.H. Development of rabbit embryos during a 96-h period of in vitro culture after superovulatory treatment under conditions of elevated ambient temperature. **Animal Reproduction Science**, v.56, n.3, p. 279-290, 1999.
- CONDE, C.; COSTA, V.; TOMAZ, C. PROSTCOM: Un conjunto de programas para registro y procesamiento de datos comportamentales en investigaciones de Fisiología y Farmacología. **Biotemas**, v.13, n.1, p. 145-159, 2000.
- DÍAZ, P.; GONSÁLVES, L.F.; ALVARIÑO, J.M.R.; TOR, M. Concentración plasmática de FSH y LH en la pubertad de la coneja. **Archivos de Zootecnia**, v.40, p.327-334, 1991.
- DØVING, K.B.; TROTIER, D. Structure and function of the vomeronasal organ. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p.:2913-2925, 1998.
- DULAC, C.; KIMICHI, T. Neural mechanisms underlying sex-specific behaviors in vertebrates. **Current Opinion in Neurobiology**, v.17, n.6, p. 675-683, 2007.
- EISTHEN, H.L. Phylogeny of the vomeronasal system and of receptor cell types in the olfactory and vomeronasal epithelia of vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, v.23, p.1-21, 1992.
- EMERICK, L.L. **Efeito da obstrução dos ductos incisivos sobre as características reprodutivas e produtivas em machos nelore no período pré-puberal**. Tese de doutorado. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 2012, 135p.

- FEE, A.R.; PARKES, A.S. Studies on ovulation: III. Effect of vaginal anaesthesia on ovulation in the rabbit. **The Journal of Physiology**, v.70, p.385-388, 1930.
- FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2a. Edição; Editora Roca, São Paulo, 2008.
- FOLTÁN, R.; ŠEDÝ, J. Behavioral changes of patients after orthognathic surgery develop on the basis of the loss of vomeronasal organ: a hypothesis. **Head & Face Medicine**, v. 5, p.5, 2009.
- FOOTE, R.H.; CARNEY, E.W. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. **Reproductive Toxicology**, v.14, p.477-493, 2000.
- FRANK H. Ablation des bulbes olfactifs chez la lapine impubère. Répercussions sur le tractus génital et le comportement sexuel. **Societe de Biologie**, v.160, p.389-390, 1966.
- FRANKENBERG, S.; SCHNEIDER, N.Y.; FLETCHER, T.P.; SHAW, G.; RENFREE, M.B. Identification of two distinct genes at the vertebrate TRPC2 locus and their characterization in a marsupial and a monotreme. **BMC Molecular Biology**, v.12, p.39, 2011.
- FREITAS, A.R. Curvas de crescimento na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.786-795, 2005.
- FRENCH, K.; RANDALL, D.; BURGGREN, W. **Eckert. Fisiología animal: Mecanismos y Adaptaciones**. España. Editora Interamericana, p.253, 300, 1998.
- GOGOL, P. Effect of prostaglandin F2 α on reproductive performance in rabbit does. **Annual Animal Science**, v.9, n.4, p. 395-400, 2009.
- GOSALVEZ, L.F.; DIAZ, P.; RODRIGUEZ, J.M. Evolución de la población de foliculos antrales en la coneja en torno de la pubertad. **Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales**, v.4, n.3, p.175-183, 1989.
- GRONDONA, K.E.B. **Morfometria do órgão vomeronasal de ratos adultos**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2005, 99p.
- GRONDONA, K.E.B. **Efeito da obstrução dos ductos incisivos sobre as características reprodutivas e produtivas em machos nelore no período pré-puberal**. Tese de doutorado. Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, 2012, 104p.
- HAFEZ, E.S.E.; JAINUDEEN, M.R.; ROSNINA, Y.; Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E.; **Reprodução animal**. 7^a. Ed. Editora Manole, 2004.
- HALPERN, M. The organization and function of the vomeronasal system. **Annual Review of Neuroscience**, v.10, p.325-362, 1987.
- HAMMOND, J.; MARXHALL, F.H.A. **Reproduction in the rabbit**. Ed: Oliver and Boyd. Edinburg. Scotland. 210. 1925.
- HERNÁNDEZ, J.A.; SÁNCHEZ, J.S.; PÉREZ-MARTÍNEZ, M. Características morfométricas de los órganos genitales de conejas Nueva Zelandia con distintos pesos corporales en el periodo de transición peripuberal. **Veterinaria México**, v.41, n.3, p.211-218, 2010.
- HILL, M.; WHITE, W.E. The growth and regression of follicles in the oestrous rabbit. **The Journal of Physiology**, v80, p.174-178, 1933.

- HOUCK, L.D. Pheromone communication in amphibians and reptiles. **Annual Review of Physiology**, v.71, p.161-176, 2009.
- HUDSON, R.; DISTEL, H. Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. **Journal of Comparative Physiology**, v.167, n.2, p. 222-230, 1990.
- HUTT, K.J.; McLAUGHLIN, E.A.; HOLLAND, M.K. Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. **Cell and Tissue Research**, v.326, n.3, p.809-822, 2006.
- IGNACIO, D.L.; FRANKENFELD, T.G.P.; FORTUNATO, R.S.; VAISMAN, M.; WERNECK-DE-CASTRO, J.P.S.; CARVALHO, D.P. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n.3, p. 310-317, 2009.
- JACOBSON, L. (1813). Anatomisk Beskrivelse over et nyt Organ I Huusdyrenes Næse. **Veterinær Selskabet's Skrifter** [in Danish] v.2, p. 209–246, citado por DØVING, K.B.; TROTIER, D. Structure and function of the vomeronasal organ. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.2913–2925, 1998.
- JELINKOVA, L.; KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; GUERRIER, P. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbits oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.210-215, 1994.
- KELLER, M.; LÉVY, F. The main but not accessory olfactory system is involved in the processing of socially relevant chemosignals in ungulates. **Frontiers in Neuroanatomy**. v.6, artigo 39, 2012. doi:10.2289/fnana.2012.00039
- KENNEDY, K.L.; FLOYD, A.A.; CLARKSON, A.M.; LEE, V.H. Epidermal growth factor regulation of connexin 43 in cultured granulosa cells from preantral rabbit follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.64, p.61-69, 2003.
- KEVERNE, E.B. The vomeronasal organ. **Science**, v.286, p.716-720, 1999.
- KEVERNE, E.B. Mammalian pheromones: from genes to behaviour. **Current Biology**, v.12, p.807-809, 2002.
- KISHK, W.; AWAD, M.; AYOUB, M. Non-hormonal substances for the induction of ovulation in rabbit does. **7th World Rabbit Congress**. Valencia. España, 2000.
- KLEIN, E. Memoirs: Contributions to the minute anatomy of the nasal mucous membrane. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v.2, n.81, p. 98-113, 1881.
- KRANZFELDER, D.; KORR, H.; MESTWERDT, W.; MAURER-SCHULZE, B. Follicle growth in the ovary of the rabbit after ovulation-inducing application of human chorionic gonadotropin. **Cell and Tissue Research**, v.238, p. 611-620, 1984.
- LEBAS, F.; COUDERT, P.; ROCHAMBEAU, H.; THÉBAULT, R.G. **El conejo: cría y patología**. FAO: Producción y sanidad animal, n°19. ISBN 92-5-303441-6. 1996
- LEBAS, F. **Biologie du Lapin**. Ce texte comporte 9 parties : 1 Taxonomie et origine du Lapin - 2 Extérieur et morphologie du corps - 3 Squelette et croissance musculaire - 4 Appareil digestif et digestion - 5 Appareil respiratoire - 6 Les reins et l'excrétion rénale - 7 Reproduction - 8 La

- circulation sanguine - 9 L'œil et la vision. <http://www.cuniculture.info/Docs/indexbiol.htm>. 2002.
- LEFÈVRE, B.; MARTINET, L.; MORET, B. Environnement et comportement d'oestrus. In Proc.: 1er Congrès International Cunicole, Dijon (France), Communication n°61, 1976, citado por THEAU-CLEMENT, M. Preparation of the rabbit doe to insemination: a review. **World Rabbit Science**, v.15, p. 61-80, 2007.
- MACCHIARELLI, G.; VIZA, E.; NOTTOLA, S.A.; FAMILIARI, G.; MOTTA, P.M. Cellular and microvascular changes of the ovarian follicle during folliculogenesis: a scanning electron microscopic study. **Archives of Cytology and Histology**, v.55, p.191-204, 1992.
- MAILLET, G.; BRÉARD, E.; BENHAÏM, A.; LEYMARIE, P.; FÉRAL, C. Hormonal regulation of apoptosis in rabbit granulosa cells in vitro: evaluation by flow cytometric detection of plasma membrane phosphatidylserine externalization. **Reproduction**, v.123, p.243-251, 2002.
- MANDARIN-DE-LACERDA, C.A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Editora UERJ. Rio de Janeiro. 131p. 1995.
- MARIANA, J.C.; HULOT, F.; DREVIN, C.; TOMASSONE, R.; POUJARDIEU, B. Estimation de la durée moyenne de croissance d'un follicule d'ovarie de lapine agée de 20 semaines, dans deux souches. **Archives de Biologie**, v.100, p. 47-63, 1989.
- MARTEL, K.L.; BAUM, M.J. Adult testosterone treatment but not surgical disruption of vomeronasal function augments male-typical sexual behavior in female mice. **The Journal of Neuroscience**, v.29, p. 7658-7666, 2009.
- MARTÍN, M. Fisiología y manejo reproductivo de la coneja en inseminación. **Cunicultura**. v. 20. 1995.
- MARTÍN BILBAO, M. Manejo en inseminación artificial: factores que afectan a la calidad seminal y al índice de fertilidad. In: **XXI Symposium de Cunicultura: Amposta: 23, 24 y 25 de mayo de 1996**. Asociación Española de Cunicultura (ASESCU), 1996.
- MARTINS, A.; SILVA, S.; MOURÃO, J.L.; PINHEIRO, V. Efecto de las restricciones alimentarias sobre el crecimiento de conejos de los 35 a 70 días de edad. **XXXVII Symposium de Cunicultura Barbastro**, 24-25 de mayo de 2012.
- MAZOUZI-HADID, F.; THEAU-CLEMENT, M.; BERCHICHE, M. Sécrétion de 17 β oestradiol au moment de la saillie chez la lapine, en fonction de la réceptivité et de la saison. **14^{ème} Journées de la Recherche Cunicole**, 22-23 novembre, 2011, Le Mans, France.
- McCOTTER, R.E. The connection of the vomeronasal nerves with the accessory olfactory bulb in the opossum and other animals. **The Anatomical Record**, v.6, p.299-318, 1912.
- McNITT, J.I. Endocrinological approaches for commercial rabbit production. **Journal of Applied Rabbit Research**, v.15, p. 364-397, 1992.
- MEREDITH, M. Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. **Chemical Senses**, v.26, p.433-445, 2001.
- MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIÉ, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of the embryos. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement** , v.54, p.449-460, 1999.

- MONNIAUX, D.; CARATY, A.; CLEMENT, F.; DALBIES-TRAN, R.; DUPONT, J.; FABRE, S.; GÉRARD, N.; MERMILLOD, P.; MONGET, P.; UZBEKOVA, S. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *INRA Productions Animales*, v.22, n.2, p.59-76, 2009.
- NAKAMUTA, S.; NAKAMUTA, N.; TANIGUCHI, K.; TANIGUCHI, K. Histological and ultrastructural characteristics of the primordial vomeronasal organ in lungfish. **The Anatomical Record**, v.295, p.481-491, 2012.
- NEGUS, V.E. The Comparative Anatomy and Physiology of the Nose and Paranasal Sinuses. E&S Livingstone, Edinburgh, 1958 citado por SMITH, T.D.; SIEGEL, M.I.; MOONEY, M.P.; BURDI, A.R.; BURROWS, A.M.; TODHUNTER, J.S. Prenatal growth of the human vomeronasal organ. **The Anatomical Record**, v.248, p.447-455, 1997.
- OLA, S.I.; OYEGBADE, M.O. Buck effect on rabbit oestrous: vulva colour, vaginal lumen cells and ovarian follicle populations. **World Rabbit Science**, v.20, p.71-79, 2012.
- PETERS, H.; LEVY, E. CRONE, M. Oogenesis in rabbit. **Journal of Experimental Zoology**. v.158, p.169-180, 1965.
- PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. **Journal of Morphology**, v.61, p.351-383, 1935.
- PLANEL, H. Etudes sur la physiologie de l'organe de Jacobson. **Archives d'Anatomie, d'Histologie et d'Embryologie**, v.36, p.197-205, 1953.
- POWERS, J.B.; WINANS, S.S. Vomeronasal organ: Critical role in mediating sexual behavior in the male hamster. **Science**, v.187, p.961-963, 1975.
- PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female reproductive system. In: EURELL, J.A.; FRAPPIER, B.L. **Dellmann's Textbook of Veterinary Histology**. 6th Edition..Blackwell Publishing. 2006.
- PUJOL, J.A.R. La aceptación de la monta en la coneja doméstica. **Cunicultura**. Universitat Autònoma de Barcelona, 1992.
- RAJENDREN, G.; DUDLEY, C.A.; MOSS, R.L. Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual receptivity in female rats. **Neuroendocrinology** v.52, p.368-372, 1990.
- REBOLLAR, P.G.; UBILLA, E.; ALVARIÑO, J.C.; ILLERA, J.C.; SILVÁN, G. Influencia del nivel de receptividad sexual sobre el estradiol plasmático y la respuesta ovulatoria durante el postparto en la coneja. **Revista Española de Fisiología**, v.48, n.1, p.13-18, 1992.
- REBOLLAR, P.G.; ALVARIÑO, J.M.R.; DEL ARCO, J.A.; Bueno, A. Control del celo en conejas nulíparas: manejo y tratamiento con PMSG. **Información Técnica Económica Agraria -ITEA**, v.16, n.1, p.455-457, 1995.
- REBOLLAR, P.G.; MILANÉS, A.; PEREDA, N.; MILLÁN, P.; CANO, P.; ESQUINO, A.I.; VILLARROEL, M.; SILVÁN, G.; LORENZO, P.L. Oestrus synchronization of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or eCG injection: reproductive parameters and endocrine profiles. **Animal Reproduction Science**, v.93, p.218-230, 2006. (doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.06.032)

- REBOLLAR, P.G.; BONANNO, A.; DI GRIGOLI, A.; TORNAMBE, G.; LORENZO, P.L. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.316-328, 2008.
- REKWOT, P.I.; OGWU, D.; OYEDIPE, E.O.; SEKONI, V.O. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.30, p.157-170, 2001.
- RODRÍGUEZ, T.M. Inducción de la ovulación. **Boletín de Cunicultura**, v.134, p.51-54, 2004.
- ROMEU, A.; MOLINA, I.; TRESGUERRES, J.A.F.; PLA, M.; PEINADO, J.A. Effect of recombinant human luteinizing hormone versus human chorionic gonadotrophin: effects on ovulation, embryo quality and transport, steroid balance and implantation in rabbits. **Molecular Human Reproduction**, v.1, n.3, p.126-132, 1995.
- SAEG **Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.**
- SALVETTI, P. **Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine: Application à la gestion des ressources génétiques**. Tesis Doctoral. Universidad de Lyon. Francia. 2008, p.180.
- SÁNCHEZ, M.L.; GIMENO, A.C.; MARTINEZ, A.A. Coloración de la vulva de las conejas en distintas fases reproductivas. In: **XIV Symposium de Cunicultura**: Manresa, 12, 13 y 14 de junio de 1989. Asociación Española de Cunicultura (ASESCU), 1989. p.123-136.
- SANTOS, T.A. Fisiologia do ovário e da fecundação, p. 39-53. In OLIVEIRA, C.F. **Manual de ginecologia**, Lisboa: Permanyer Portugal, 2009.
- SEGOVIA, S.; GUILLAMÓN, A. Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. **Developmental Brain Research**, v.5, p.209-212, 1982.
- SEGOVIA, S.; GUILLAMÓN, A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behavior. **Brain Research Reviews**, v.18, p.51-74, 1993.
- SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v.26, n.1, p.57, 1970.
- SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p.1691-1704, 2004.
- SMITH, T.D.; SIEGEL, M.I.; MOONEY, M.P.; BURDI, A.R.; BURROWS, A.M.; TODHUNTER, J.S. Prenatal Growth of the Human Vomeronasal Organ. **The Anatomical Record**, v.248, p.447-455, 2007.
- SMITH, T.D.; GARRETT, E.C.; BHATNAGAR, K.P.; BONAR, C.J.; BRUENING, A.E.; DENNIS, J.C.; KINZNGER, J.H.; JOHNSON, E.W.; MORRISON, E.E. The vomeronasal organ of New World Monkeys (Platyrrhini). **The Anatomical Record**, v.294, p.2158-2178, 2011.
- SMITZ, J.; NOGUEIRA, D.; ALBANO, C.; CORTVRINDT, R.; DEVROEY, P. Improving in vitro maturation of oocytes in the human taking lessons from experiences in animal species. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p.11-17, 2001.
- SU, C.Y.; MENUZ, K.; CARLSON, J.R. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. **Cell**, v.139, p.45-59, 2009.

- SUÁREZ, R.; GARCIA-GONZÁLEZ, D.; CASTRO, F. Mutual influences between the main olfactory and vomeronasal systems in development and evolution. **Frontiers in Neuroanatomy**. V.6, artigo 50, 2012.
- SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of *in-vivo* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, v.9, n.1, p.35-48, 2003.
- TANIGUCHI, K.; MOCHIZUKI, K. Comparative morphological studies on the vomeronasal organ in rats, mice and rabbits. **Nippon Juigaku Zasshi**, v.45, p.67-76, 1983.
- THEAU-CLEMENT, M.; BOITI, C.; MERCIER, P.; FALIÉRES J. Description of the ovarian status and fertilizing ability of primiparous rabbit does at different lactation stages. *In Proc.: 7th World Rabbit Congress*, 4-7 July, 2000, Valencia, España. Vol. A. 259-272.
- THEAU-CLEMENT, M. Advances in biostimulation methods applied to rabbit reproduction. *In Proc.: 7th World Rabbit Congress*, 4-7 July, 2000, Valencia, España. 61-79 2000.
- THEAU-CLEMENT, M. Preparation of the rabbit doe to insemination: a review. **World Rabbit Science**, v.15, p.61-80, 2007.
- TORRES, S.I.P. **Efeitos das restrições de alimento ou de água sobre as performances zootécnicas e comportamento de coelhos em crescimento**. Tese de doutorado. Departamento de Zootecnia Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 2010.
- UBEDA-BAÑÓN, I.; PRO-SISTIAGA, P.; MOHEDANO-MORIANO, A.; SAIZ-SANCHEZ, D.; DE LA ROSA-PRIETO, C.; GUITIERREZ-CASTELLANOS, N.; LANUZA, E.; MARTINEZ-GARCIA, F.; MARTINEZ-MARCOS, A. Cladistic analysis of olfactory and vomeronasal systems. *Frontiers in Neuroanatomy*, v.5, artigo 3, 2011.
- UBILLA, E.; REBOLLAR, P.G.; PAZO, D.; ESQUINO, A.I.; ALVARINO, J.M.R. Pituitary and ovarian response to transient doe-litter separation in nursing rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.361-366, 2000. (doi: 10.1530/jrf.0.1180361).
- UBILLA, E.; REBOLLAR, P.G. Influence of the postpartum day on plasma estradiol-17b levels, sexual behaviour, and conception rate, in artificially inseminated lactating rabbits. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.337-344, 1995 (doi: 10.1016/03784320(94)01366-T)
- VAN DER HURK, R. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.
- VEGA, M.D.; BARRIO, M.; QUINTELA, J.J.; BECERRA, J.J.; CAINZOS, J.; PRIETO, A.; RODRIGUEZ-ZAMORA, A.; HERRADÓN, P.G. Evolución del manejo reproductivo em cunicultura. **Información Técnica Económica Agrária -ITEA**, v. 108, n.2, p. 172-190, 2012.
- VILLEE, C.A. *Biologia*. Ed. Interamericana. México. p.474-475. 1994. In: **Avaliação do comportamento reprodutivo caprino e ovino com o uso do efeito do macho interespecie**. VITALIANO, A.B. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará. 2011. Fortaleza, Ceará.
- VOLOSCHIN, L.M.; GALLARDO, E.A. Effect of surgical disconnection of the medial basal hypothalamus on post coital reflex ovulation in the rabbit. **Endocrinology**, v.99, p.959-962, 1976. doi: 10.1210/endo-99-4-959

- von MIHALKOVICS, V. Nasenhöhle und Jacobsonsches Organ. **Anatomy and Embriology**. Berlin 11, 1–108, 1899 citado por DØVING, K.B.; TROTIER, D. Structure and function of the vomeronasal organ. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.2913-2925, 1998.
- WILSON, K.C.; RAISMAN, G. Age-related changes in the neurosensory epithelium of the mouse vomeronasal organ: extended period of postnatal growth in size and evidence for rapid cell turnover in the adult. **Brain Research**, v.185, p.103-113, 1980.
- WITT, M.; WOŹNIAK, W. Structure and function of the vomeronasal organ. In: HUMMEL, T.; WELGE-LÜSSEN, A.: **Taste and Smell. An Update. Advances in Otorhinolaryngology**. Basel, Karger, v 63, p.70-83, 2006.
- WYSOCKI, C.J. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.3, p.301-341, 1979.
- WYSOCKI, C.J.; LEPRI, J.L. Consequences of removing the vomeronasal organ. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.39, p.661-669, 1991.
- WYSOCKI, C.J.; MEREDITH, M. The vomeronasal system, 1987. In: **Neurobiology of Taste and Smell**. T.E. Finger, ed. John Wiley & Sons, New York, p. 125-150, 2000.

9. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 87/2013, intitulado "Cauterização do ducto incisivo em coelhas pré-púberes e seu efeito na puberdade, no desenvolvimento gonadal e na vida reprodutiva". Coordenado pelo professor, Laércio dos Anjos Benjamin do Departamento de Veterinária, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 10/12/2013, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 87/2013, named "Cauterizing duct incisive in rabbits prepubertal and its effect at puberty, gonadal development and reproductive life", is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Laboratory of Animals (SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on December 10, 2013 approved this process. This certificate expire in 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV