

João Simões de Almeida

Controlo populacional do Elefante Africano: A imun contracepção

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador: Prof. Doutora Ana Godinho

Co-Orientador: Dr. Rui Bernardino

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2012

*Mundo não se fez para pensarmos nele,
Mas para olharmos para ele e estarmos de acordo...
Eu não tenho filosofia: tenho sentidos...
Se falo na Natureza não é porque saiba o que ela é,
Mas porque a amo, e amo-a por isso,...*

Alberto Caeiro - O guardador de rebanho

AGRADECIMENTOS

A realização do estágio curricular só foi possível, graças à equipa que me aceitou, nesta medida agradeço francamente ao Dr. Ulf Tubessing pela sua paciência inesgotável e pelo talento único na arte de ensinar, à Dra. Minty Soni pela amizade e inúmeros conhecimentos que transmitiu, à enfermeira e amiga Cheri Morkel pela constante disponibilidade e dedicação e a toda a equipa de trabalhadores da *Super Game Dealers*, que participou na minha formação, que culmina na elaboração do presente trabalho.

Dirijo os sinceros reconhecimentos ao Dr. Rui Bernardino e à Doutora Ana Godinho pelo tempo e conselhos que me deram, e a todos os professores da Universidade Lusófona que me ajudaram a chegar a este ponto, em especial ao Doutor Pedro Faísca, à Dra. Marta Costa, à Dra. Margarida, ao Dr. Joaquim, à Dra. Lisa Mestrinho, à Dra. Odete Almeida e ao Dr. Pedro Almeida.

Agradeço também e de forma especial à minha família, pai, mãe e irmãos, que tornaram este sonho possível.

À Isabel por ser a minha inspiração, apoio e motivação.

Ao Buda por ser um espírito indomável e por me ensinar o que é amizade, amor pela natureza, coragem, e desprendimento.

RESUMO

A imun contracepção tem sido proposta como possível ferramenta para controlar populações de elefantes que ultrapassem as capacidades do habitat onde vivem. Até à data a única técnica imun contraceptiva testada em elefantes selvagens foi a vacina contra a zona pelúcida de elefantes fêmea utilizando zona pelúcida porcina (pZP) numa vacina que induz a formação de anticorpos anti-zona pelúcida e consequente bloqueio do processo de fertilização. A literatura disponível revela que tal vacina tem uma eficácia contraceptiva que varia entre 22% e 100%, pode ser administrada à distância através de um dardo, é segura para animais gestantes, não passa na cadeia alimentar e é reversível, pelo menos a médio prazo.

O estudo realizado no âmbito deste trabalho, teve como objectivo avaliar a técnica utilizada para a vacinação com pZP da população de elefantes fêmea na Makalali game reserve (Africa do Sul) em relação ao método, tempo, efeitos secundários, e custos envolvidos. Todos os animais foram vacinados a partir de um helicóptero, o processo teve uma duração média por elefante de 2.8 minutos, observou-se efeitos secundários locais em 4 indivíduos, duas das três manadas evidenciaram alterações comportamentais após a vacinação, e o custo total da operação foi de 3417 dólares americanos.

Palavras-chave: Elefantes, imun contracepção, zona pelúcida porcina

ABSTRACT

Immunocontraception has been proposed as a possible tool for managing elephant populations existing beyond the capacity of the habitat. To date the only immunocontraceptive technique tested in wild elephants was the zona pellucida vaccine for female elephants using porcine zona pellucida (pZP) in a vaccine that induces the formation of anti - zona pellucida and consequent blocking of the fertilization process. The available literature shows that this vaccine has a contraceptive efficacy ranging between 22% and 100%, it can be administered remotely via a dart, it is safe for pregnant animals, non-transferable in the food chain and it is reversible, at least in the medium term.

The study conducted within the framework of this work, aimed to evaluate the technique used for the vaccination with pZP of population of female elephants at the Makalali game reserve (South Africa) in relation to the method, time, side effects, and costs involved.

All the animals were vaccinated from a helicopter, the process had a mean duration of 2.8 minutes per elephant, it was observed local side effects in 4 individuals, two of the three herds showed behavioral changes after vaccination, and the total cost of operation was 3417 USD.

Key words: Elephants, immunocontraception, porcine zona pelucida

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	11
1.1. Breve descrição da reprodução de elefantes, relevante para o seu controlo populacional	12
1.1.1. Organização social	12
1.1.2. Fisiologia e ciclo reprodutivo de elefantes fêmea	14
1.1.2.1. Puberdade	14
1.1.2.2. Ciclo éstrico	14
1.1.2.3. Gestação, intervalo entre partos, e lactação	15
1.1.3. Fisiologia reprodutiva de elefantes machos	17
1.1.3.1. Puberdade	18
1.1.3.2. Alterações endócrinas relacionadas com o <i>musth</i>	19
1.2. Anatomia do aparelho reprodutivo, fêmeas	20
1.3. Anatomia do aparelho reprodutivo, machos	22
1.4. Como escolher um contraceptivo	23
1.4.1. Eficácia	23
1.4.2. Fiabilidade para administração á distância	23
1.4.3. Reversibilidade	24
1.4.4. Seguro para animais gestantes	24
1.4.5. Segurança em fêmeas lactantes	25
1.4.6. Transmissão na cadeia alimentar	25
1.5. Métodos de controlo populacional que não envolvem o aparelho reprodutivo	27
1.5.1. Abate a tiro, o exemplo Sul-africano	27
1.5.2. Translocação	28
1.5.2.1. Como capturar e transportar elefantes	29
1.5.2.2. Captura	29
1.5.2.3. Monotorização do animal imobilizado	29
1.5.2.4. Factores a ter em conta no local de destino	30
1.6. Métodos de controlo populacional que envolvam o aparelho reprodutivo	32
1.6.1. Cirurgia	32
1.6.1.1. Vasectomia em elefantes macho	33
1.6.1.2. Esterilização cirúrgica de elefantes fêmea	34

1.6.2. Métodos hormonais	35
1.6.2.1. Contraceptivos esteróides	35
1.6.2.2. Super agonistas da GnRH	36
1.6.2.3. Imunocontracepção	37
1.6.2.3.1. GnRH	38
1.6.2.3.2. Proteína da zona pelúcida porcina – pZP	40
1.6.2.3.2.1. Utilização de pZP em larga escala	42
1.6.2.3.2.2. Eficácia de 90%	42
1.6.2.3.2.3. Reversibilidade dos efeitos contraceptivos	43
1.6.2.3.2.4. Capacidade de administração à distância	43
1.6.2.3.2.5. Seguro para animais gestantes	44
1.6.2.3.2.6. Ausência de efeitos secundários significantes	44
1.6.2.3.2.7. Ausência de passagem na cadeia alimentar	45
1.6.2.3.2.8. Efeitos no comportamento individual e social	45
1.6.2.3.2.9. Custo reduzido	45
1.6.2.3.2.10. Selecção e resistência genética	47
1.7. Exemplo de controlo populacional com pZP	51
1.8. O futuro	52
2. Material e métodos	55
2.1. Local de estudo	55
2.2. Elefantes	55
2.3. Vacina e adjuvantes	56
2.4. Dose	56
2.5. Dardos usados nas vacinações	57
2.6. Sucesso da administração da vacina	58
2.7. Efeitos locais da vacinação	59
2.8. Custos da vacinação	59
3. Resultados	60
4. Conclusão /Discussão	64
5. Considerações finais	66
6. Bibliografia	67

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro1. A influência da densidade populacional em elementos reprodutivos variáveis em 4 parques Africanos.	16
Quadro2. Propriedades de um contraceptivo ideal, e avaliação das opções disponíveis.	26
Quadro3. Custos estimados para uma vasectomia por laparoscopia em elefantes macho.	33
Quadro4. : Revisão dos principais estudos contraceptivos com pZP com referencia á espécie, duração, tamanho da amostra, protocolo de vacinação e eficácia contraceptiva.	48
Quadro 5. Títulos de anticorpos de elefantes fêmea vacinadas com a vacina tradicional e com a vacina de uma só administração.	52
Quadro 6. Taxa de recuperação dos dardos	62
Quadro 7. Custos da operação de 2010	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfil sérico de progesterona, prolactina e FSH, durante o ciclo éstrico de elefantes fêmea.	7 15
Figura 2. Progesterona sérica de uma fêmea acíclica.	17
Figura 3. Um macho a exhibir sinais de <i>musth</i> , secreções da glândula temporal, membros molhados e incontinência urinária.	20
Figura 4. Aparelho reprodutor de um elefante macho.	21
Figura 5. Aparelho reprodutor de um elefante fêmea.	22
Figura 6. Operação de abate com recurso a um helicóptero.	27
Figura 7. Transporte de elefantes mortos durante uma operação de abate.	28
Figura 8. Elefante sob efeito de anestesia a ser içado para um camião de transporte.	30
Figura 9. Captura de elefantes com recurso a um helicóptero para guiar as manadas até ao local desejado e para administração do anestésico.	30
Figura 10. Elefante macho anestesiado a ser rodado para decúbito lateral a fim de evitar dificuldades respiratórias por compressão torácica.	32
Figura 11. Preparação do elefante para laparoscopia	34
Figura 12. Mecanismos de acção e locais onde diferentes contraceptivos hormonais actuam.	37
Figura 13. Mecanismo de controlo hormonal e locais de acção dos anticorpos anti-GnRH em machos e em fêmeas.	39
Figura 14. Mecanismo de acção proposto para a vacina com pZP.	41
Figura 15. Caracterização da amostra relativamente á presença de fêmeas por manada.	56
Figura 16. Locais seleccionados para a administração da vacina.	57
Figura 17. Espingardas de dardos Dan-inject JM DB e JM.	58
Figura 18. Dardo Dan – inject com transmissor rádio.	58
Figura 19. Elefante anestesiado para revacinação e avaliação do estado reprodutivo na Makalali Game Reserve.	59
Figura 20. Tempo médio de vacinação por elefante, nas 3 manadas.	61
Figura 21. Presença de efeitos secundários locais após a vacinação.	61
Figura 22. Tempo gasto na recuperação dos dardos nas diferentes manadas.	62
Figura 23. Operação de revacinação com recurso a um helicóptero.	63

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Percentagem

μ - Micrograma

CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*

FSH - Hormona luteinizante

GMPGR - *Greater Makalali Game Reserve*

GnRH - Hormona libertadora de gonadotropina

IEP - Intervalo entre partos

IM - intramuscular

IUCN - *International Union for the Conservation of Nature*

Kg - quilograma

Km - quilometro

KNP - *Kruger National Park*

LH - hormona luteinizante

m - metro

mg - miligrama

ml - mililitro

pZP - zona pelúcida procina

ZP - zona pelúcida

1. INTRODUÇÃO

Durante a primeira metade do século XX, o aumento da ocupação de terra pela população humana, a caça furtiva e a crescente procura de marfim empurraram as populações de Elefante-Africano, *Loxodonta africana*, para uma situação de perigo de extinção - *endangered* segundo o International Union for the Conservation of Nature (IUCN). Em 1990, a comercialização de marfim foi totalmente banida pelo Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). Alguns países africanos (África do Sul, Zimbabwe, Botswana, Namíbia) tinham já implementado medidas para proteger os elefantes do risco de extinção. Nesses países, as áreas de conservação vedadas e patrulhadas por equipas anti-caça furtiva permitiram o crescimento exponencial das populações de elefantes.

Em meados dos anos 60 era claro que as populações de elefantes prosperavam dentro de parques e áreas de conservação que se tornaram “ilhas” protegidas que não permitiam a migração natural das manadas e se tornaram, portanto, pequenas demais. De modo a controlar o número de indivíduos foi realizado o abate anual de grupos familiares. Em 1990, porém, a pressão de grupos internacionais de direitos dos animais levou à cessação dos abates; desde então o número de elefantes tem crescido sem controlo. Actualmente existem cerca de 470 000 elefantes em África, estando na sua maioria concentrados nos países do sul e sudoeste do continente (Delsink *et al.*, 2007).

A influência humana no habitat e rotas de migração naturais dos elefantes, não permitem que estes animais tenham a influência positiva de regeneração florestal, alimentação de outras espécies, especialmente aves, enriquecimento dos solos, que têm naturalmente, mas pelo contrário, faz com que a sua presença seja associada à degradação das zonas protegidas.

Grandes densidades de elefantes são altamente destrutivas para os habitats, requerem altas concentrações de recursos hídricos e alimentares e são, em última análise, um problema ecológico pela conversão de áreas de floresta em zonas de savana, tornando os habitats impróprios para várias espécies de herbívoros, aves e pequenos mamíferos (Kirkpatrick, 1998).

Existem apenas duas maneiras eficazes para controlar uma população de animais: aumentando a taxa de remoção, normalmente através do abate ou translocação; ou diminuindo a taxa de adição, através do controlo de nascimentos (Kirkpatrick & Rutberg, 2001). Actualmente as populações de elefantes nos parques do sul de África são grandes demais para

serem translocadas e o abate é objecto de controvérsia ética e debate público (Whyte *et al.*, 1999). Por estas razões têm sido desenvolvidos métodos para reduzir a taxa de nascimentos através da contracepção.

Nos Estados Unidos surgiram problemas similares de sobrepopulação de espécies de veados e cavalos selvagens, tendo sido desenvolvidas formas não letais de controlo populacional baseadas em métodos não invasivos de contracepção (Kirkpatrick & Rutberg, 2001). Foram examinados diferentes métodos: químicos não hormonais, hormonas esteróides, hormonas não esteróides, e imunocontracepção, mas por várias razões (que serão referidas posteriormente) os três primeiros foram considerados impraticáveis abrindo caminho para o desenvolvimento da imunocontracepção como método de controlo populacional (Kirkpatrick & Rutberg, 2001).

A imunocontracepção com recurso à proteína da Zona Pelúcida porcina (pZP) ser um método seguro, eficaz, reversível e possível de ser administrado à distância em diversos ungulados e cavalos, tornando-se um candidato óbvio para a aplicação em elefantes. Os primeiros testes em elefantes selvagens foram iniciados no *Kruger National Park* (KNP) em 1995, após um estudo imunohistoquímico que provou ser possível induzir contracepção em elefantes com recurso à pZP. Os primeiros resultados revelaram uma eficácia na redução de fertilidade de 80%, sem prejudicar as gestações decorrentes, sem efeitos secundários hormonais visíveis e com 0% de incorporação do princípio activo na cadeia alimentar, no caso da morte de um animal tratado (Delsink *et al.*, 2007). Estes resultados reforçaram a aplicabilidade deste método de contracepção em populações de elefantes em liberdade.

1.1 BREVE DESCRIÇÃO DA REPRODUÇÃO DE ELEFANTES RELEVANTE PARA O SEU CONTROLO POPULACIONAL

1.1.1 Organização Social

Os elefantes vivem em grupos sociais dominados por fêmeas. Estes grupos são constituídos pela matriarca (normalmente uma fêmea mais velha), pelas filhas sexualmente maduras e as suas crias, das quais fazem parte machos sexualmente imaturos (Owen-Smith, 1998).

As fêmeas vivem toda a vida com a manada na qual nasceram. Os machos abandonam o grupo quando atingem a maturidade sexual, aproximadamente com 12-14 anos de idade (Pole, 1996 a & b). Estes machos são forçados, pelas fêmeas adultas, a deixar o grupo e podem juntar-se com outros machos jovens formando manadas de solteiros (grupos formados por machos jovens), procurar e permanecer alguns anos com outra família, ou ambas as situações (Pole, 1996 b). A transição para machos adultos e sexualmente maduros dura alguns anos; quando atingem essa fase passam a viver sozinhos (Pole, 1996 b)

O comportamento reprodutivo dos elefantes pode ser caracterizado como promíscuo porque machos e fêmeas acasalam com mais que um indivíduo durante um determinado ciclo éstrico; no entanto, por cada gestação, uma só cria é produzida. Dado que apenas um macho pode ser o progenitor, este comportamento é também descrito como poliginia sequencial (Hollister-Smith, 2005).

O modo de comunicação com outros elefantes e com o ambiente em que vivem depende de um sistema complexo de receptores sensoriais, constituído por sensores tácteis, visuais, vibratórios, auditivos e receptores químicos (Shulte *et al.*, 2007). A comunicação por sinais químicos tem sido considerada como um dos meios mais importantes de comunicação. Este facto tem sido confirmado por estudos recentes que caracterizam este método como crucial nas sociedades de elefantes (Shulte *et al.*, 2007). Os sinais químicos, também descritos como sinais honestos, são libertados na urina, no fluido da glândula temporal, no muco vaginal, nas glândulas dos dígitos e outras partes do corpo. Estes reflectem a condição fisiológica, a idade, o sexo e a condição reprodutiva e metabólica do transmissor e a sua interpretação depende do estatuto do receptor (Shulte *et al.*, 2007). Tanto em enriquecimento ambiental, de elefantes em cativeiro, como para resolver conflitos entre elefantes e humanos, este tipo de sinais tem sido cada vez mais desenvolvido e utilizado. Exemplo disso é a utilização de sinais químicos de *musth*, (ciclo pelo qual os elefantes macho adultos passam, caracterizado por um aumento da agressividade, procura constante de fêmeas, secreções glandulares abundantes, e aumento dos níveis de testosterona) (Breed, 2001) por parte das populações humanas, com o intuito de afastar manadas de elefantes das suas plantações.

1.1.2 Fisiologia e ciclo reprodutivo de elefantes fêmea

1.1.2.1 A puberdade

Dependendo do estado nutricional, da densidade populacional e do estatuto social, os elefantes fêmea em estado selvagem atingem a puberdade entre os 10 -12 anos de idade (Laws 1969). Laws (1996) estudou quatro populações de elefantes, na *Mokomasi Game Reserve* (Uganda), no *Tsavo National Park* (Kenya), no *Murchison Falls National Park* (Uganda) e na *Budongo Central Forest Reserve* (Uganda) com densidades populacionais de elefantes de: <3, 3, 5.9 e 6 a 7 elefantes por 2.6 Km², respectivamente. A idade média na primeira ovulação foi 11, 12.5, 18 e 20 anos de idade, respectivamente. Estas diferenças foram atribuídas ao stress, densidade dependente, social e nutricional (Laws, 1969).

A relação densidade/idade de início da puberdade deve ser levada em conta quando se consideram métodos de controlo populacional. Alguns métodos propostos e usados que reduzem populações sem afectar a fertilidade farão, inevitavelmente, aumentar a taxa reprodutiva e de crescimento populacional. O intervalo de idades da primeira gestação varia entre os 9 e 18 anos (Owen-Smith, 1988); contudo, em famílias capturadas e transportadas para zonas de baixa densidade de elefantes foram reportadas várias gestações avançadas em fêmeas com 9 anos de idade, o que indica que o início da puberdade ocorreu entre 7-8 anos (Delsink *et al.* 2006).

1.1.2.2 Ciclo éstrico

O ciclo éstrico tem uma duração de 15 a 16 semanas, com uma fase lútea de 8 a 11 semanas e uma fase folicular entre as 4 e 6 semanas. O estro persiste por 2 a 6 dias; nesta fase as fêmeas acasalam com vários machos (Western & Lindsay, 1984).

É durante o fim da fase folicular e início da fase lútea que as fêmeas se encontram mais receptivas e férteis. Podem ser observados elefantes em estro em qualquer altura do ano, mas durante, e nos meses seguintes às chuvas (Novembro a Março), a frequência de ciclos é mais elevada (Brown *et al.*, 2004).

Elefantes fêmea permanecem férteis durante 40 a 50 anos; findo este tempo ocorre um rápido declínio da fertilidade (Owen & Smith, 1998).

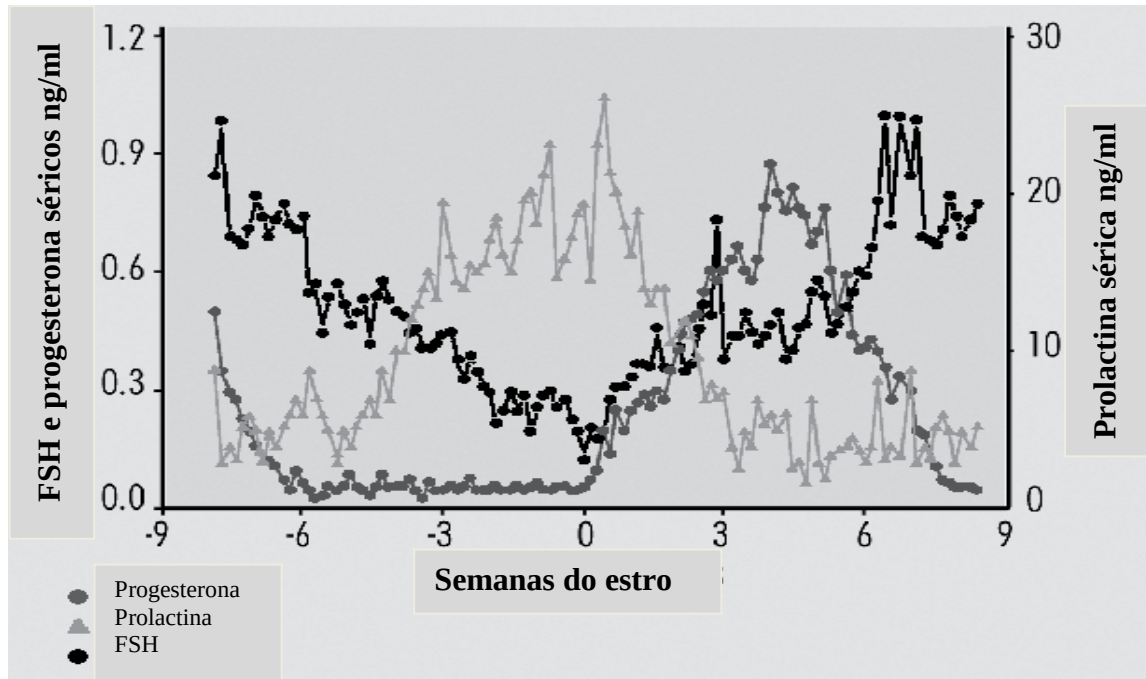


Figura 1: Perfil sérico de progesterona, prolactina e FSH, durante o ciclo éstrico de 7 elefantes fêmea. A semana 0 representa o estro (adaptado de Brown *et al.*, 2004).

1.1.2.3. Gestação, intervalo entre partos (IEP) e lactação.

O período entre partos é um factor determinante na taxa de crescimento populacional e depende da disponibilidade de recursos, como alimento e água, e da densidade de elefantes. A última relação foi demonstrada por Laws (1969) num estudo de carcaças de elefantes abatidos em quatro parques africanos (Quadro 1). A relação entre disponibilidade de recursos e endocrinologia reprodutiva foi, também, demonstrada por Wittemyer *et al.* (2007) que estudou um grupo de elefantes em *Buffalo Springs National Park*. O autor comparou o índice de vegetação com a concentração de metabolitos de progesterona nas fezes, durante a gestação e o ciclo éstrico. A concentração de metabolitos de progesterona foi claramente superior em fêmeas gestantes e não gestantes durante a época das chuvas (Wittemyer *et al.*, 2007). A manipulação do IEP com recurso a controlo reprodutivo é, portanto, uma forte ferramenta para conter a taxa de crescimento populacional.

Quadro 1: A influência da densidade populacional, sobre elementos reprodutivos variáveis, em 4 parques Africanos (adaptado de Laws, 1969).

	Mokosami Game Reserve	Tsavo National Park	Murchison Falls National Park	Budongo Central Forest Reserve
Elefantes por km quadrado	4,8	4,8	4,5	9,7
Idade à primeira ovulação	11	11.5	14	20
Intervalo entre partos (anos)	4-5	6-7	6-7	Sem dados
% de fêmeas em anestro, não lactantes, com menos de 25 anos	Sem dados	7.9	8.6	Sem dados

A gestação dos elefantes africanos tem, normalmente, duração de 22 meses, o que constitui aproximadamente 50% do IEP; isto significa que, após o parto, as fêmeas não exibem ciclo éstrico durante aproximadamente 2 anos. A figura 2 mostra um exemplo do perfil sérico de uma fêmea acíclica.

Em condições normais, as fêmeas adultas têm um período de lactação permanente, de uma gestação para outra (Whyte, 2001). A duração do período de lactação registado no Tsavo National Park (Quênia) foi de 7-8 anos (Laws. 1969). O mesmo autor sugere também que à medida que o IEP aumenta, a percentagem de fêmeas lactantes diminui.

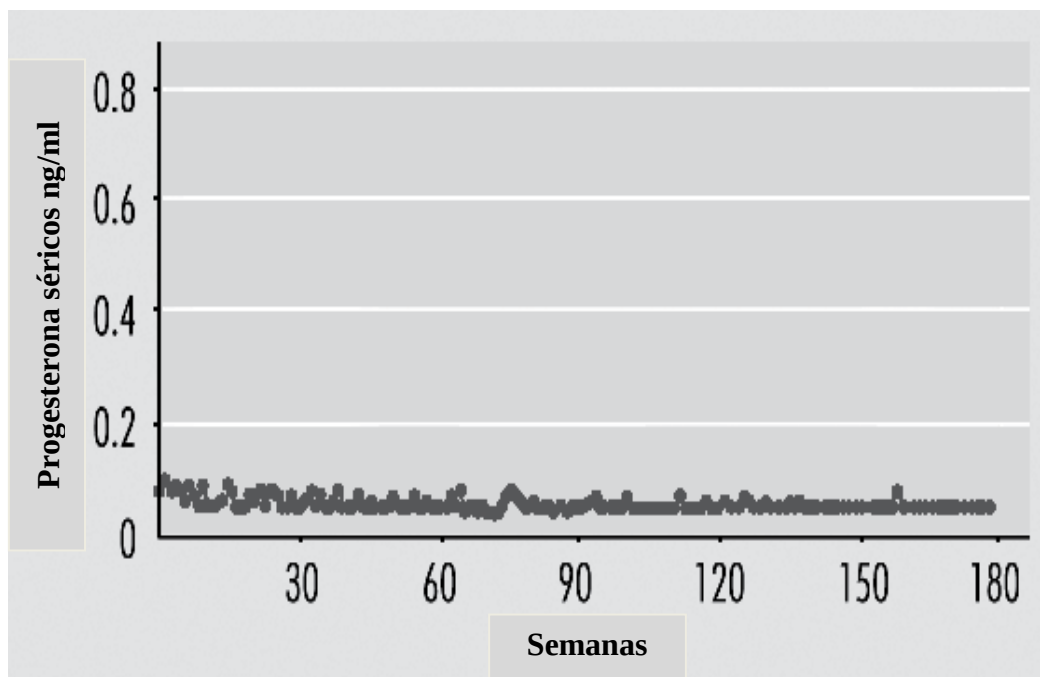


Figura 2: Progesterona sérica de uma fêmea acíclica (adaptado de Brown *et al.*, 2004).

1.1.3 Fisiologia reprodutiva de elefantes africanos machos

O estatuto social e o comportamento reprodutivo, regulados por androgénios de origem testicular, são factores determinantes que afectam a probabilidade de um macho conseguir acasalar (Bertschinger *et al.*, 2001). Um estudo de 30 anos realizado em *Amboseli Natural Park* (Quênia) analisou ADN fecal para determinar a paternidade de elefantes jovens, revelando que 50% dos progenitores tinham mais que 45 anos e 70% estavam em *musth* na altura do acasalamento (Hollister-Smith, 2005).

O tamanho e a força interessam para determinar o ranking social, mas existe outro factor que ajuda a explicar o porquê dos machos mais velhos terem maior probabilidade de acasalar. Rasmussen & Riddle (2002) encontraram diferenças marcantes no conteúdo em feromonas nas secreções da glândula temporal em elefantes asiáticos machos, sendo superior em machos com mais de 35 anos e bastante inferior nos jovens. O conteúdo em feromonas nos jovens parece afastar as fêmeas, ao passo que nos adultos com mais de 35 anos acontece o contrário. Embora este tenha sido um estudo realizado com elefantes asiáticos, as semelhanças na fisiologia reprodutiva entre ambas as espécies permitem inferir que na espécie africana o processo seja equivalente (Schulte *et al.*, 2007).

O parágrafo anterior explica os factores mais importantes na selecção natural dos progenitores. Contudo, há que considerar a intervenção humana e a sua influência na selecção

natural e qualidade dos progenitores, a caça, que faz diminuir o número de animais troféu (machos adultos), a translocação e o abate de machos dominantes.

1.1.3.1 Puberdade

A espermatogénese inicia-se, em elefantes africanos machos, entre os 7 e 15 anos, atingindo o potencial máximo entre 10 – 17 anos (Owen-Smith, 1988). Hanks (1972) associou o início da espermatogénese com o peso testicular – 650 a 700 g.

Os elefantes machos abandonam o seu grupo natal por volta dos 14 anos, passando a viver num ambiente altamente dinâmico de alterações sexuais, sociais e comportamentais, a maioria do tempo sozinhos ou em grupos de machos (Poole, 1994; Lee, 1997). A idade da puberdade e de dispersão pode, no entanto, ser alterada por actividades humanas, como a caça e a destruição de habitat (Owen-Smith, 1988).

Estão documentadas duas tácticas reprodutivas em elefantes machos sexualmente activos:

- a) Táctica não competitiva, dos animais jovens que não se encontra em *musth*, associada a uma aproximação lenta e persistente (aproximadamente 25 % de sucesso reprodutivo)
- b) Táctica do *musth*, em machos mais velhos e associada a uma investida intensa de curta duração (75 % de sucesso) (Rasmussen, 2005).

Em elefantes africanos selvagens, os primeiros sinais de *musth* ocorrem por volta dos 25 anos de idade; na ausência de machos mais velhos/dominantes, estes sinais podem notar-se mais cedo. Em animais jovens, os períodos de *musth* são irregulares e menos previsíveis, ao passo que em animais a partir dos 35-40 anos, o *musth* é de maior duração, mais regular e previsível (Poole, 1982; 1987; 1994).

O descrito no parágrafo anterior representa a tendência geral. No entanto, a intensidade e duração destes períodos variam de macho para macho, mesmo entre os da mesma idade, e de ano para ano, no mesmo indivíduo, o que indica que o “tipo” de *musth* varia com as condições locais de alimento e densidade populacional (Poole, 1994).

Os elefantes machos em *musth* abandonam o seu território, viajam longas distâncias, descansam e alimentam-se menos, passando a maioria do tempo à procura de fêmeas em estro (Hall-Martin, 1987).

As fêmeas receptivas escolhem preferencialmente o macho dominante de uma determinada área, por norma um macho em *musth*, porque apresenta um nível de

agressividade que ultrapassa todas as hierarquias em grupos de machos. Durante confrontos entre elefantes, o vencedor é, invariável e independentemente do tamanho corporal, o animal em *musth* (Poole, 1989).

Existe uma postura característica associada a elefantes em *musth*, particularmente visível quando se movem: a cabeça ergue-se acima da linha dos ombros e as orelhas estão abertas e elevadas (Armstrong, 2002). Emitem ainda, constantemente, sons de baixa frequência, inferior a 14Hz (infra-som), que atingem longas distâncias e níveis de pressão sonora até 108 decibéis (Poole, 1994).

Outros sinais de *musth* incluem a libertação constante de urina de cheiro intenso e característico, associada à descoloração esverdeada do pénis (Moss, 1981), aumento de tamanho e contínua secreção das glândulas temporais (figura 3).

Embora a perda de condição corporal dos elefantes africanos durante o *musth* seja atribuída à diminuição de ingestão de alimento e aumento do exercício, foi provado em elefantes asiáticos em *musth* mantidos presos que estes perderam peso apesar de receberem e comerem a mesma quantidade de alimento (Poole, 1989), facto que pode ser explicado pelo aumento de androgénio e consequentemente do metabolismo basal.

Foi ainda demonstrado em elefantes asiáticos que as alterações relacionadas com o *musth* nos níveis de testosterona e triglicéridos apresentavam padrões semelhantes, que a actividade da lipase aumenta antes e logo depois do período de *musth* e que existe um aumento da quantidade de proteína e albumina na urina durante esse mesmo período (Rasmussen, 1999).

1.1.3.2 Alterações endócrinas relacionadas com o *musth*

O *musth* está associado a um aumento transitório dos níveis de androgénios (Ganswindt *et al.*, 2002). O papel da glândula adrenal neste aumento ainda é desconhecido, tal como se o aumento de androgénios gonodais é antecedido ou precedido de actividade adrenal (Ganswindt *et al.*, 2002).

Para além do aumento de androgénios, foi também sugerido que as alterações comportamentais e físicas associadas ao *musth* estarão relacionadas com uma elevação dos níveis de glucocorticóides, o que resultaria da actividade adrenal. A perda de peso e o aumento de actividade, notórios durante o *musth*, permitem teorizar que este representa uma forma de *stress*; estudo recente mostrou uma correlação positiva entre testosterona e cortisol em elefantes africanos naquele estado (Brown *et al.*, 2007). Ganswindt (2003) obteve

resultados contrários num estudo com elefantes selvagens em que não foram encontradas evidências de elevação de glucocorticóides durante o *musth* ou a actividade sexual, e obteve provas de que aquele provoca um efeito supressor na glândula adrenal (Ganswindt *et al.*, 2003; 2005a).

É necessária mais informação sobre o que regula o *musth* e que mecanismos estão envolvidos nas alterações fisiológicas e comportamentais, tanto para interesse científico como para o desenvolvimento de estratégias para lidar com elefantes-problema em estado selvagem.

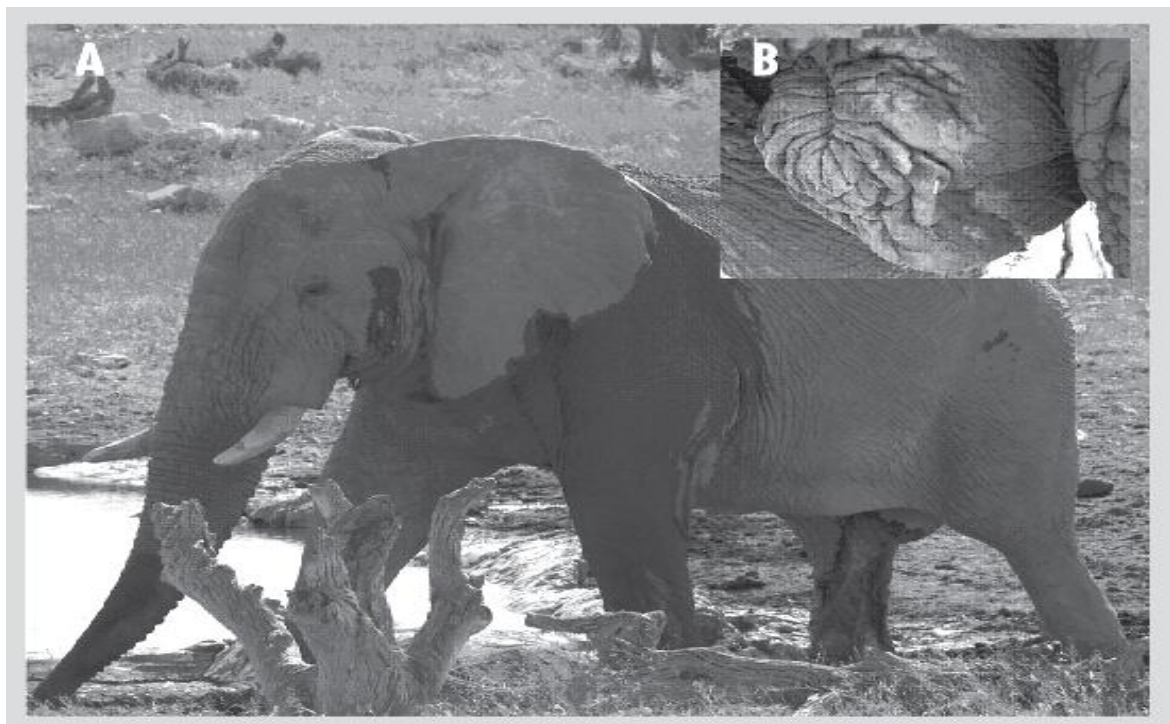


Figura 3. Um macho a exibir sinais de *musth*: secreções da glândula temporal, membros molhados e incontinência urinária (fotografia: Bertschinger, *Parque Nacional Etosha Namíbia*, 2007).

1.2 Anatomia do aparelho reprodutivo – fêmeas

As fêmeas de elefante africano têm ovários relativamente pequenos, face ao tamanho corporal; medem aproximadamente 7 x 5 x 2.5 cm e são compostos pela medula e pelo córtex, onde se encontram os folículos e corpos lúteos. Não existem folículos até ao início da puberdade e em animais adultos um folículo dominante ovula no fim do estro, quando atinge aproximadamente 15 a 25 mm. O corpo lúteo típico, pós ovulação, mede 25 mm e encontra-se na superfície do córtex ovariano, enquanto que corpos lúteos acessórios, vistos durante a

gestação, são menores e intra-corticais. O número de corpos lúteos acessórios aumenta no fim da gestação e nesta fase podem existir 10 corpos lúteos em cada ovário. Os ovidutos medem aproximadamente 10 cm de comprimento e os ovários estão localizados perto do fim dos cornos uterinos onde terminam os ovidutos. O útero destas fêmeas mede entre 0.8 e 1.5 metros e é caracterizado pelo corpo curto de 5 a 10 cm e pelos longos cornos uterinos (figura 4). O lúmen dos cornos uterinos pode medir até 45 mm de diâmetro. O endométrio é composto por uma mucosa homogênea que fica mais proeminente e irregular durante o estro. O cérvix é em tudo, menos no tamanho, semelhante ao das éguas, composto por várias pregas longitudinais e termina na vagina, também ela dotada de numerosas pregas longitudinais. Ao contrário da maioria dos mamíferos, o pênis dos machos não penetra totalmente na vagina para deposição de sêmen; em vez disso, durante o estro a vagina é coberta por um muco espesso que serve para transporte dos espermatozoides. O canal urogenital é uma estrutura tubular localizada ventralmente ao ânus e é extremamente longo, medindo de 1 a 1.4 metros. O clítoris é uma estrutura proeminente facilmente visível.

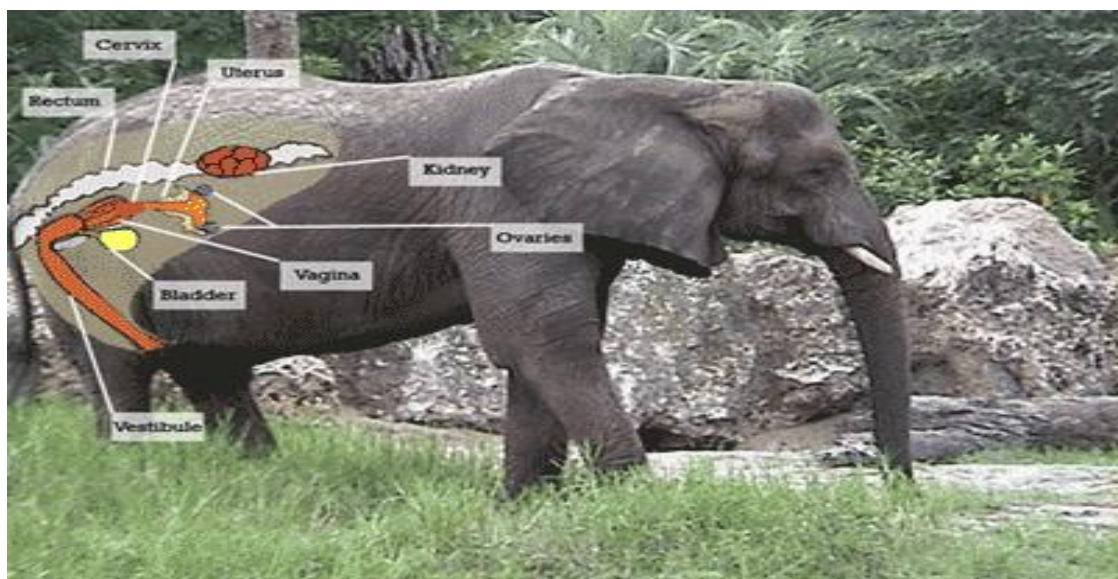


Figura 4. Anatomia do aparelho reprodutivo feminino (Elephant Information Network , 2005

1.3 Anatomia do aparelho reprodutor – machos

Os testículos dos elefantes são intra-abdominais e estão localizados na face dorsal da cavidade abdominal, caudalmente aos rins. Os elefantes não têm plexo pampiniforme para baixar a temperatura testicular, no entanto, a sua temperatura corporal varia entre 35 e 36 °C, um valor semelhante ao da temperatura testicular noutros mamíferos. Os testículos são ovais e variam de tamanho com a idade e estatuto social, podendo medir entre 2 a 12 cm. Nos elefantes, o epidídimo não está aderente à superfície dos testículos, como acontece em testículos escrotais; num animal adulto mede cerca de 200 cm e pode ser dividido em três zonas distintas: cabeça, istmo e cauda (figura5). A ampola é uma porção alargada do ducto deferente, classificada como glândula sexual acessória; tem como função o armazenamento de sêmen e localiza-se dorsalmente à porção caudal da bexiga.

As vesículas seminais são as maiores glândulas sexuais acessórias dos elefantes e podem conter até 1.5 L de fluido, rico em frutose, que constitui 50% do ejaculado. As glândulas estão localizadas ao lado da ampola e dorso - lateralmente em relação à bexiga. A próstata de elefantes africanos é trilobulada e localiza-se ventralmente em relação à uretra e caudalmente à ampola. As últimas glândulas acessórias são as bulbouretrais. Estas glândulas pares têm 10 cm de diâmetro e estão imediatamente caudais à raiz do pénis. Têm como função a limpeza da uretra antes da ejaculação e a lubrificação vaginal.

Os elefantes adultos apresentam um pénis muito vascularizado, com 1 metro de comprimento, 25 cm de diâmetro e até 27 kg de peso. Quando erecto, tem a forma de um S e os seus movimentos são independentes do resto do corpo.

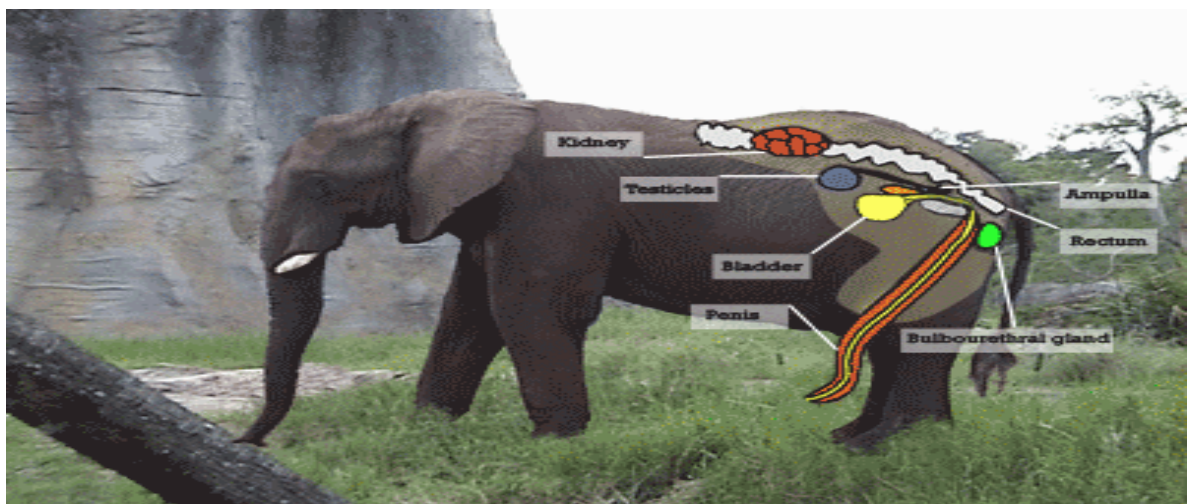


Figura 5. Anatomia do aparelho reprodutivo masculino (*Elephant Information Network*, 2005)

1.4 COMO ESCOLHER UM CONTRACEPTIVO

Os planos de contracepção para animais selvagens têm o objectivo de reduzir a taxa de reprodução da espécie em questão, para valores capazes de estabilizar uma determinada população sem prejudicar o ecossistema e os animais alvo (Kirkpatrick, 2001). Como tal, o método escolhido deve ser extremamente eficaz (90%) e fiável, ter a capacidade de ser administrado à distância, sem a necessidade de manipular os animais, ser seguro para usar em fêmeas gestantes e lactantes, ser reversível, não provocar efeitos secundários, não passar na cadeia alimentar, ter efeitos mínimos no comportamento e estatuto social e ser económico (Kirkpatrick & Turner, 1991).

1.4.1 Eficácia

Para a contracepção de animais selvagens em cativeiro é desejável 100% de eficácia de um determinado contraceptivo, facto que limita as escolhas a métodos com eficácia comprovada para a espécie em questão. Até à data, o acetato de megestrol é o contraceptivo mais usado com eficácia comprovada em animais em cativeiro; no entanto, este método provoca efeitos indesejáveis e não é eficaz em alguns grupos, o que levou ao desenvolvimento de alternativas (Asa *et al.*, 2005). Outros métodos menos utilizados variam dramaticamente na sua eficácia: a utilização da pZP não é recomendada em carnívoros nem primatas, mas funciona bem na maioria dos ungulados e paquidermes (Kirkpatrick, 2001); os implantes de agonista da GnRH são eficazes em carnívoros, mas muito variáveis em ungulados, especialmente machos (Asa *et al.*, 2005). Ao contrário de animais em cativeiro, a contracepção de animais em estado selvagem é considerada satisfatória com níveis de eficácia entre 60 e 70%, porque neste caso não se pretende evitar que um determinado animal se reproduza, mas sim impedir que a taxa de crescimento populacional aumente.

1.4.2 Fiabilidade para administração à distância, sem manipulação dos animais

Uma variável na eficácia de um contraceptivo é a certeza de que este foi administrado na sua totalidade (Asa *et al.*, 2005). A dose necessária para o efeito de um medicamento pode constituir um problema, se o volume for grande demais para a utilização de dardos como meio de administração. As preparações de pZP que utilizam um adjuvante específico podem tornar-

se demasiado viscosas quando injectadas a baixas temperaturas, sendo necessária a utilização de uma agulha de grande diâmetro (14G) ou aguardar pela melhor altura do dia para se administrar a preparação. Espécies com pele muito espessa (girafas, hipopótamos e elefantes) ou com uma grande camada subcutânea (ursos e cetáceos) requerem uma cuidadosa escolha de agulhas, dardos e armas para que a administração seja eficaz.

Os contraceptivos orais são limitados na utilização em indivíduos ou grupos de animais na medida em que alteram o sabor ou forma do alimento, o que pode resultar em menos consumo e consequente diminuição da dose do medicamento. Outro problema da administração de contraceptivos no alimento é o facto de, em grupos de animais, a quantidade de alimento ingerido depender do estatuto social de cada indivíduo e nestes casos alguns animais receberem doses baixas do medicamento.

A anestesia e a cirurgia são procedimentos necessários no que diz respeito ao uso de técnicas de contracepção permanentes como a castração, a vasectomia, a ovariectomia, a laqueação de trompas e a ovário-histerectomia, mas representam um elevado risco para muitas espécies (Asa *et al.*, 2005) e envolvem elevados custos, constituindo portanto um método menos recomendado (Bokout *et al.* 2005).

1.4.3 Reversibilidade

Ao contrário dos métodos cirúrgicos, a grande maioria dos métodos contraceptivos são reversíveis. No entanto, um factor importante na sua reversibilidade é a previsibilidade do fim do efeito contraceptivo de um determinado medicamento (Kirkpatrick & Turner, 1991).

Medicamentos como o acetato de megestrol são facilmente reversíveis na medida em que basta descontinuar o tratamento para cessar o efeito, enquanto técnicas como as que recorrem à pZP e aos agonistas da GnRH (Desrolina[®]) têm tempos de reversibilidade menos previsíveis (Asa *et al.*, 2005).

1.4.4 Segurança em animais gestantes

Em programas de contracepção aplicados a grupos de animais em liberdade é difícil identificar fêmeas gestantes e como tal é necessário utilizar um medicamento seguro, tanto para a fêmea como para o feto (Turner *et al.*, 1996). Muitos contraceptivos direccionados para fêmeas interferem com a gestação - GnRH, ou com o parto - progestagénios. Embora os

estrogénios não interfiram com a gestação em si, alguns relatos indicam a existência de defeitos fetais relacionados com o seu uso em fêmeas gestantes (Shirley & Bundren, 1995). Estudos com elefantes, burros, veados e cavalos medicados com pZP indicam que a sua utilização em animais gestantes não provoca nenhum efeito prejudicial tanto para a fêmea como para o feto (Turner *et al.*, 1996; Kirkpatrick *et al.*, 1997; Delsinky *et al.*, 2003)

1.4.5 Segurança em fêmeas lactantes

A utilização de pZP ou agonistas da GnRH não provoca nenhum tipo de alteração na produção de leite nem no crescimento e desenvolvimento de possíveis crias porque, sendo ambos produtos derivados de proteínas, são metabolizados e eliminados durante processos digestivos (Asa, 2005). Pelo contrário, estrogénios e progestagénios, sendo hormonas esteróides, são excretados no leite e podem ter efeitos prejudiciais para as crias (Asa, 2005).

1.4.6 Transferência para cadeia alimentar

Para se administrar uma substância com efeito duradouro em animais selvagens é essencial ter a certeza que apenas o animal medicado vai sofrer os efeitos de tal medicamento. Um contraceptivo ideal tem que limitar os seus efeitos apenas ao paciente alvo e não ser passível de se propagar na cadeia alimentar no caso da morte do animal, e consumo da sua carcaça, tanto por animais como por humanos (Asa, 2005).

Características	Métodos cirúrgicos		Esteróides		GnRH - agonistas		Imunocontracepção	
	Gonadectomia	Vasectomia	Orais	Implantes	Injectáveis	Implantes	pZP	GnRH
Eficácia contraceptiva ♀	100%	100%	100%	100%	≤100%	≤100%	70-100%	70-100%
Eficácia contraceptiva ♂	100%	100%	Fraca	Fraca	≤100%	≤100%	N	70-100%
Administração à distância	N	N	N	N	S	N	S	S
Reversível	N	N	S	S	S	S	S	S
Efeitos comportamentais / sociais	Afecta comportamento	N	Afecta comportamento	Afecta comportamento	I	S	S	S
Efeitos negativos para a saúde	Obesidade	N	S	S	N	N	Tumefacção local	Tumefacção local
Passagem na cadeia alimentar	N	N	S	S	N	N	N	N
Seguro para fêmeas gestantes	n/a	n/a	N	N	I	I	S	S
Custos económicos	Elevados	Elevados	Elevados	Médios	Médios	Médios	Médio	Médio

Quadro 2: Propriedades de um contraceptivo ideal e avaliação das opções disponíveis. Adaptado de Bertschinger (unpublished data)

Legenda: N – não; S – sim; n/a – não aplicável; I - indeterminado

1.5 METODOS DE CONTROLO POPULACIONAL QUE NÃO INVOLVEM O APARELHO REPRODUTOR.

1.5.1 Abate a tiro - o exemplo sul-africano

Durante quase duas décadas, o abate a tiro de famílias de elefantes foi considerado a única opção para controlar a enorme e crescente população de elefantes em áreas destinadas à conservação da biodiversidade. No KNP foi estimado que, para evitar a destruição do habitat e consequente perda de biodiversidade causada por elefantes, a população deveria ser mantida entre 7000 e 8500 animais

(0.32 elefantes/Km²) (Van Wyk & Fairall, 1969). O programa de abate decorreu entre 1967 e 1994 e eliminou, aproximadamente, 17 200 animais (Aarde, 1998).

Vários estudos (Van Wyk & Fairall's, 1969; Laws, 1969) demonstraram que, como resposta à diminuição abrupta da densidade de elefantes, o IEP diminui e a taxa de crescimento populacional aumenta. Assim, o abate de elefantes como medida de controlo populacional funcionará apenas se praticado frequentemente (todos os anos), como resposta ao aumento da taxa de crescimento.

Método

O método usado para abate consiste em sobrevoar a área em questão, utilizando um helicóptero, abater a tiro famílias inteiras com uma espingarda de alto calibre, manuseada por um atirador experiente, que deve acertar directamente no cérebro, provocando o mínimo de *stress* e sofrimento ao animal (figura 6).

Esta medida obteve resultados ambíguos, foi fortemente criticada por parte da comunidade científica e por diversos grupos de defesa dos direitos animais; em 1996 foi banida pelo ministério do ambiente da República Sul-Africana.

O método provoca graves alterações comportamentais entre grupos de elefantes (quando não se abate a família inteira), é eticamente questionável e deve apenas ser usado em

Figura 6. Operação de abate com recurso a um helicóptero (KNP, 1985).



combinação com medidas de controlo reprodutivo (imunocontracepção), em situações urgentes (como ameaça directa a humanos) ou quando considerada a única opção viável.

Actualmente, a população de elefantes no KNP é de cerca de 16 000 indivíduos, número considerado muito acima da capacidade do habitat, estimada em 7000 (VanWyk & Fairall, 1969) e está a provocar danos potencialmente irreversíveis na vegetação. Esta situação levou os responsáveis pela gestão do parque a voltar a considerar o abate como medida de controlo populacional.



Figura 7. Transporte de elefantes mortos durante uma operação de abate (KNP, 1985)

1.5.2 Translocação

Outra medida proposta para diminuir a população de elefantes numa determinada área é a captura, imobilização e transporte de famílias de elefantes para um novo local.

Equipas de captura e transporte, altamente experientes e bem equipadas, podem tornar uma operação potencialmente complicada num procedimento relativamente seguro e rápido de realizar. É essencial para o sucesso destas operações a selecção de animais pouco agressivos, a captura e transporte de famílias inteiras e uma avaliação detalhada da zona “receptora”.

1.5.2.1 Como capturar e transportar elefantes

O processo pode ser dividido em 6 fases: captura, carga do animal para um contentor especial para administração do antídoto, administração do antídoto, transporte para o camião, viagem para o destino e libertação.

1.5.2.2 Captura

A captura de elefantes envolve a utilização de opióides 1000 vezes mais potentes que a morfina, como a Etorfina – Hidralazina (M99[®]), e por isso só pode ser efectuada por um veterinário altamente experiente e especializado. Drogas como a anterior, associadas a um tranquilizante, normalmente Azaperona (Stressnil[®]), possibilitam a captura e transporte de um elefante de qualquer tamanho (DuToit, 2001). É necessário um avião leve, para detectar o grupo a capturar, um helicóptero potente mas suficientemente ágil, e conduzido por um piloto experiente para que se consiga disparar o dardo e, se possível, encaminhar o animal até uma zona próxima dos camiões e da equipa no terreno.

Após a queda do elefante, procede-se a um rápido exame veterinário, move-se o animal para decúbito lateral (o decúbito esternal não permite uma boa ventilação) (figura 10) e carrega-se, com auxílio de uma grua ou tapete rolante, para um contentor adjacente ao camião, onde é administrado o antídoto da Etorfina, Diprenorfina – Hidralazina (M50-50[®]) (figura 8). Após cerca de dois minutos da administração do antídoto, o elefante levanta-se e automaticamente recua para o contentor de transporte no camião. Dependendo do tempo da viagem, devem ser administrados tranquilizantes de longa duração, como o Haloperidol, cujo efeito dura sensivelmente 8 horas, ou a Perfenazina, de efeito prolongado por vários dias, e ainda ter água suficiente à disposição (DuToit, 2001).

1.5.2.3 Monitorização do animal imobilizado

A frequência respiratória (FR) considerada normal num elefante adulto situa-se entre 6 e 10 respirações por minuto e é audível. Quando se trata de uma cria ou animal jovem, deverá posicionar-se uma mão na tromba para que se consigam sentir as respirações.

A temperatura corporal normal (T °C) varia entre 36 e 37°C e os animais imobilizados devem ser molhados abundantemente com água fresca para evitar a hipertermia. É importante evitar a captura destes animais quando a temperatura do ar ultrapassa os 20°C.

Outro componente do exame físico a realizar é a avaliação da cor das membranas mucosas e o tempo de repleção capilar (TRC) observado na cavidade oral, bem como a procura de lesões típicas de febre aftosa em regiões endémicas.

A frequência cardíaca ideal (FC) de um elefante adulto situa-se geralmente perto dos 30 batimentos por minuto e pode ser avaliada nas artérias localizadas nas orelhas.

1.5.2.4 Factores a ter em conta no local de destino

A área de destino dos animais capturados deve ter mais que 10 000 hectares e o número mínimo de animais a introduzir deve ser de 15 elefantes. Os animais devem ser soltos numa área vedada, durante 24 horas.

A captura deverá ser realizada preferencialmente entre Maio e Junho, quando as temperaturas são adequadas e a pastagem é suficiente para os animais.

Dentro das zonas “receptoras”, devem ser vedados os locais onde se situem casas, veículos e água que lhes não seja destinada, para impedir o acesso dos animais.

É importante que elefantes machos com altura ao garrote superior a 2.2 metros constituam 15% do grupo reintroduzido (DuToit, 2001).

Muitos grupos de elefantes são transportados e libertados em reservas privadas que não ultrapassam 10 000 hectares de área (DuToit, 2001). Nestes casos é importante ter em conta os seguintes aspectos para evitar a fuga do grupo:

- A introdução de fêmeas com crias é fortemente aconselhada, pois a presença de crias parece restringir os movimentos da manada.
- A presença da matriarca da manada está associada a tentativas de fuga e comportamentos agressivos (DuToit, 2001); deve-se por isso evitar a sua captura.
- Libertação da manada num campo de exercício de aproximadamente 1 hectare, com vedação eléctrica, durante um período mínimo de 24 horas.

Actualmente, as principais restrições na utilização deste método são a falta de zonas receptoras, a dificuldade logística para o aplicar em grandes populações e o custo que envolve este tipo de operação (DuToit, 2001).



Figura 8. Elefante sob efeito de anestesia a ser içado para um caminhão de transporte (*African Parks Network*, 2010).



Figura 9. Captura de elefantes com recurso a um helicóptero para conduzir as manadas até ao local desejado e para administração do anestésico (*African Parks Network*, 2010).



Figura 10. Elefante macho anestesiado a ser rodado para decúbito lateral a fim de evitar dificuldades respiratórias por compressão torácica (*African Parks Network*, 2010).

1.6 MÉTODOS DE CONTROLO POPULACIONAL QUE ENVOLVEM O APARELHO REPRODUTOR.

1.6.1 Cirurgia

A cirurgia como método contraceptivo tem sido largamente aplicada em espécies domésticas com alto nível de sucesso. Em elefantes, no entanto, este método de controlo populacional não é considerado prático em grandes populações. Trata-se dum procedimento arriscado que envolve custos elevados (Delsink, 2006).

Existem três técnicas cirúrgicas: a gonadectomia, tanto para machos como para fêmeas, um método irreversível que provoca alterações comportamentais; a ligadura das trompas de Falópio em fêmeas e a vasectomia em machos. A última opção tem sido utilizada com algum sucesso em elefantes (Delsink, 2006), mas é pouco prática quando se trata de um grande número de animais.

1.6.1.1 Vasectomia em elefantes machos – aplicações, desvantagens e custos

Os machos vasectomizados passam por períodos de *musth*, exibem comportamentos reprodutivos e mantêm o estatuto social (Stetter *et al.*, 2006). Em 2006, o Dr. Mark Stetter realizou com sucesso vasectomias por laparoscopia (testículos intra-abdominais) em quatro machos da Welgevond Game Reserve (África do Sul). O procedimento durou 3 a 4 horas por animal. Em 2007 voltou ao mesmo local para repetir o procedimento em mais cinco elefantes; desta vez fê-lo em 2 a 3 horas por animal.

Em pequenas populações (de 10 a 20 machos), a esterilização, recorrendo à vasectomia, provoca uma significativa redução na taxa de fertilidade, perceptível 22 meses após a realização da cirurgia (Stetter *et al.*, 2006). Comparando com outros métodos, como a imun contracepção, em que é necessária a administração de três vacinas iniciais e um reforço anual, este é mais vantajoso no sentido em que basta apenas um procedimento por elefante para atingir o objectivo (Bokhout *et al.*, 2005).

Desvantagens da vasectomia:

- Elevado custo;
- Carácter invasivo;
- Irreversível;
- Direcção para machos adultos dominantes, podendo alterar o processo de selecção natural.

As condicionantes descritas fazem deste método uma opção apenas aplicável em pequenas populações.

Quadro 3. Custos estimados para realização de uma vasectomia, por laparoscopia, em elefantes machos. Adaptado de Bokhout *et al.*, 2005.

Procedimento	Custo por elefante (US\$)
Captura e anestesia	1 000
Custos de equipamento	300
Equipa cirúrgica	1 000
Total	2 300



Figura 11. Preparação do elefante para laparoscopia (Stetter *et al.*, 2005).

1.6.1.2 Esterilização cirúrgica de elefantes fêmeas

Em 2004, duas fêmeas em estado selvagem foram esterilizadas por laparoscopia pela primeira vez na história, na Phinda Game Reserve, África do Sul (Delsink, 2006). Os animais foram capturados e dirigidos até um local definido para realizar a cirurgia, posicionados em decúbito lateral para a iniciar num dos lados do animal e rodados para o outro lado para terminar o procedimento cirúrgico (Stetter *et al.*, 2005). Esta foi a primeira cirurgia abdominal realizada em elefantes selvagens. Embora tenha sido um procedimento longo e os animais tenham demorado algum tempo a recuperar (dois dias até se juntarem ao resto da manada), as feridas cirúrgicas fecharam sem complicações e ambos os animais recuperaram sem problema (Stetter *et al.*, 2005). Embora estas cirurgias tenham sido um marco na história da contracepção em elefantes, os custos, o tempo e a logística envolvida tornam esta opção inviável para ser usada em larga escala.

Princípios básicos para o procedimento cirúrgico: laparoscopia em elefantes africanos no estado selvagem (Stetter, 2005)

Em todos os animais anestesiados é essencial que se mantenha o paciente num estado de inconsciência sem alterar os parâmetros fisiológicos normais, e que se proporcione analgesia e relaxamento muscular (Stetter *et al.*, 2005). Os elefantes africanos pesam entre 2000 e 5000kg, são agressivos e vivem em áreas inóspitas de difícil acesso. O animal-alvo é

identificado de helicóptero e injectado com Etorfina-Hidralazina através de um dardo disparado por um veterinário ou atirador experiente com supervisão do primeiro. Quando sob efeito da droga, é transportado para o local onde os cirurgiões e o equipamento se encontram. Fazem-se medições de parâmetros anestésicos, o animal é cateterizado (geralmente na orelha) e a anestesia é mantida com *bolus* de Etorfina-Hidralazina. A laparoscopia em elefantes pode demorar entre 2 a 5 horas. Para não se correrem riscos, o elefante é entubado com um tubo endotraqueal especial (para mega-vertebrados) de 50 mm de diâmetro e 2 metros de comprimento e ventilado com um equipamento especial capaz de ventilar animais até 7000kg.

A monitorização anestésica é feita com pulsometria, pressões directa e indirecta e análise ácido/base sanguínea. Uma vez terminado o procedimento, administra-se o antídoto (Diprenorfina e/ou Naltrexona) e liberta-se o paciente.

1.6.2 Métodos Hormonais

Os métodos hormonais utilizados como contraceptivos baseiam-se na administração de progestagénios, estrogénios, androgénios e agonistas da GnRH sob forma de implantes subcutâneos.

1.6.2.1 Contraceptivos esteróides

O uso de implantes com progestagénios de longa acção foi aplicado com elevado nível de eficácia em carnívoros. Porém, devido à elevada incidência de efeitos secundários, este tem sido substituído por fármacos mais seguros (Munson *et al*, 2002). Outra razão para este método não ser considerado útil no controlo de elefantes é o facto de os estrogénios se integrarem na cadeia alimentar através das fezes, que constituem alimento para inúmeras espécies de aves, répteis e insectos, susceptíveis de sofrerem os efeitos prejudiciais dos esteróides.

Apesar do referido, em 1996 iniciou-se um estudo com 10 elefantes fêmeas no KNP para testar a eficácia de contraceptivos esteróides em elefantes selvagens. Os elefantes foram capturados e administrados com cinco implantes de silicone contendo estradiol, libertando uma dose diária de 300 µg/animal (Goritz *et al.*, 1999). As fêmeas não estavam gestantes e todas tinham crias pequenas. Os implantes foram eficazes como contraceptivos e duraram cerca de um ano (Bartlett, 1997; Whyte & Grobler, 1998). O estudo foi pouco conclusivo

quanto à reversibilidade do método pois passado um ano alguns animais ainda estavam no IEP.

Os efeitos secundários mais notórios, provenientes da aplicação dos implantes, foram o permanente estado de estro durante 12 meses associado à constante presença de machos e a separação precoce das crias das suas progenitoras (duas delas acabaram por desaparecer e foram dadas como mortas) (Goritz *et al.*, 1999).

Para além do referido, os custos e a logística que envolvem a captura e imobilização de elevado número de animais para aplicar os implantes subcutâneos, fazem desta uma opção inviável para o controlo reprodutivo de elefantes em liberdade (Bertschinger *et al.*, 2004).

1.6.2.2 Super agonistas da GnRH

A Deslorelina[®] é um agonista sintético da hormona GnRH e tem vindo a ser utilizada como alternativa aos implantes de progestina em carnívoros e primatas (Bertschinger *et al.*, 2001). Uma vez administrado o implante, são libertados elevados níveis de deslorelina (GnRH sintético) que, por *feedback* negativo, diminuem a secreção de GnRH no hipotálamo. Os implantes subcutâneos têm efeito durante 6 a 12 meses, até 24 meses, provocando uma diminuição nos níveis de produção de LH e FSH, podendo, portanto, ser empregues em ambos os sexos. A Deslorelina tem sido utilizada com sucesso em chitas (ambos os sexos), leões, leopardos (ambos os sexos) e babuínos (Bertschinger *et al.*, 2001; 2002; 2004; 2006).

Embora este método seja adequado para as espécies referidas, o seu uso em ungulados tem eficácia muito variável e para espécies em liberdade seria pouco prático, já que para a aplicação do implante é necessário capturar e imobilizar os animais.

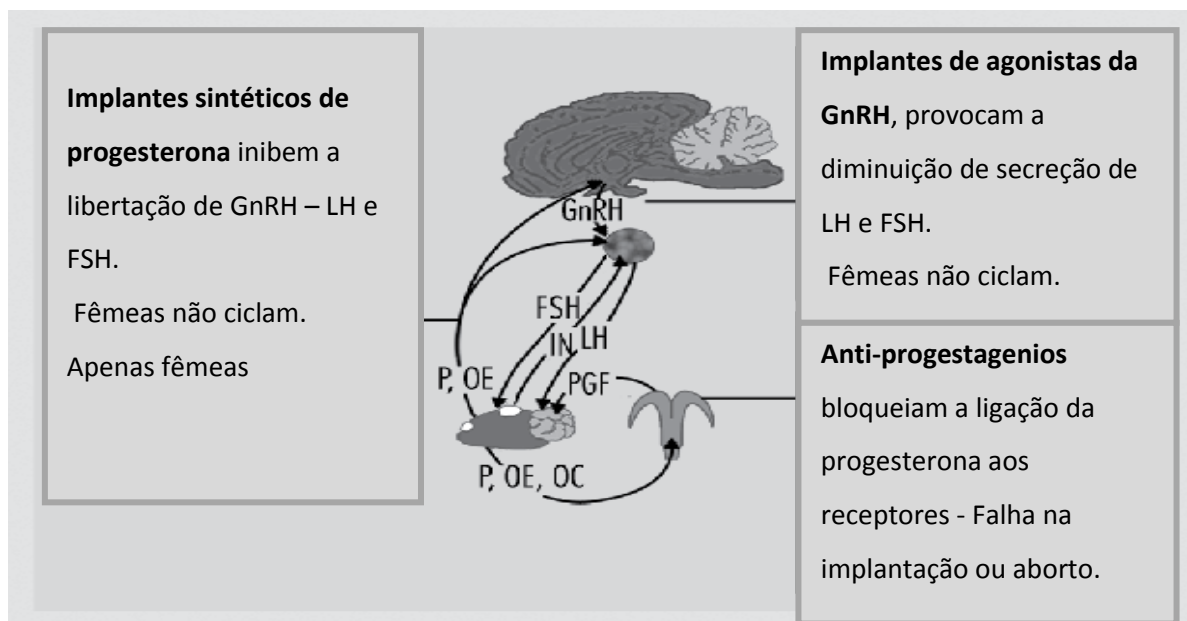


Figura 12. Mecanismos de acção e locais onde diferentes contraceptivos hormonais actuam adaptado de Bertschinger (2002).

1.6.2.3 Imunocontraceção

A imunocontraceção baseia-se no mesmo princípio da prevenção de doenças através da vacinação, com a diferença que esta estimula uma resposta imune contra moléculas exógenas enquanto a imunocontraceção produz anticorpos contra moléculas endógenas essenciais para o processo de fertilização (Fayer-Hosken *et al.*, 2000).

Embora existam muitas moléculas que possam ser usadas como alvo de imunocontraceção, especialmente duas têm sido mais investigadas e desenvolvidas, ZP e GnRH.

A GnRH é uma hormona libertada pelo hipotálamo que controla o sistema endócrino da reprodução, estimulando a liberação de hormonas como a LH e a FSH, que por sua vez regulam o funcionamento dos ovários e testículos. A vacinação contra a GnRH inibe a função reprodutiva, provocando nos animais tratados um estado de pré-puberdade (Stout & Colen, 2004).

A vacinação contra proteínas da zona pelúcida (ZP) baseia-se na importância desta na reprodução, uma matriz extracelular que rodeia o oócito e que desempenha um papel determinante na adesão, penetração e fertilização dos espermatozóides (Fayer-Hosken *et al.*, 2000). O mecanismo exacto da indução da infertilidade através deste mecanismo varia entre espécies e não é totalmente compreendido. Os anticorpos anti-ZP impedem a adesão dos

espermatozóides ao oócito, bloqueando os receptores ou alterando a formação da zona pelúcida e assim impedem indirectamente a adesão e penetração dos espermatozóides (Muller *et al.*, 1997), resultando ambas as situações em infertilidade temporária.

Uma parte determinante para o sucesso de qualquer vacina é o adjuvante, que aumenta a eficácia da vacina por estimular o sistema imunitário a produzir maiores concentrações de anticorpos. Sem surpresa, as vacinas contra GnRH e ZP variam na sua eficácia dependendo do adjuvante utilizado. Por outro lado, adjuvantes eficazes são muitas vezes substâncias agressivas que podem induzir tumefacções no local de injeção, abscessos ou reacções sistémicas como febre ou anafilaxia (Lyda *et al.*, 2005).

1.6.2.3.1 GnRH

A hormona GnRH é constituída por um péptido pequeno muitas vezes chamado de *Master Hormone*, por ser responsável pelo controlo dos mecanismos reprodutivos tanto nas fêmeas como nos machos (Miller *et al.*, 2000). O péptido que constitui a GnRH é semelhante em todos os mamíferos e não é imunogénico dado ser uma molécula pequena e reconhecida pelo sistema imunitário como *self* (Miller *et al.*, 2000).

Para que ocorra resposta imune contra a hormona é necessário conjugá-la com uma proteína de transporte com maior peso molecular e com vários epítomos de células T (Muller *et al.*, 1997), como por exemplo a hemocianina de molusco, pigmento transportador de oxigénio que provoca uma boa resposta imune, não só por ser uma molécula grande, mas também por ser filogeneticamente distante dos mamíferos. Os anticorpos anti-GnRH induzem infertilidade ligando-se à GnRH em circulação, impedindo que esta se ligue aos receptores da glândula pituitária e, conseqüentemente, a libertação de FSH e LH (figura 13). A ausência destas hormonas em circulação provoca atrofia testicular e ovárica, promovendo um constante estado de anestro nas fêmeas e uma significativa diminuição da espermatogénese nos machos.

Este método contraceptivo foi experimentado em gatos, porcos, veados, gado bovino e equinos, principalmente em machos (Miller *et al.*, 2000).

Em 2003 foi iniciado um estudo para testar a eficácia da vacinação contra GnRH no controlo do comportamento agressivo e do *musth* em elefantes machos (De Nys, 2005). Foram vacinados 5 machos, dois agressivos e três não agressivos. Monitorizou-se o comportamento e a concentração de epiandosterona fecal antes da primeira vacina (fase 1), analisaram-se os mesmos parâmetros após a primeira, depois da segunda e da terceira vacinas (fases 2,3,4) e dois e quatro meses após a administração da primeira vacina (fases 5 e 6).

Antes da primeira vacinação, as concentrações de epiandosterona fecal eram substancialmente mais elevadas nos machos agressivos. Passados quatro meses, os machos agressivos melhoraram o comportamento e tal como os outros três não exibiram sinais de *musth*. O efeito do tratamento teve uma duração de 6 a 9 meses (De Nys, 2005).

Um elefante africano macho vacinado contra a GnRH no Bowman Zoo, Canadá, morreu por razões não relacionadas com a vacinação. No exame pós-morte apresentava testículos marcadamente atrofiados indicando que, para além de suprimir a produção de testosterona, a vacina também diminui a espermatogénese (Berstinger & Cover, unpublished data), permitindo inferir que este método pode ser usado como contraceptivo em elefantes macho.

Possíveis aplicações em elefantes fêmeas

Uma das críticas à vacina contra a GnRH é o facto de provocar anestro permanente em fêmeas, o que, em animais que vivem em manadas, é um efeito indesejável.

Até à data, apenas quatro fêmeas foram tratadas com esta vacina. Sendo ainda demasiado cedo para tirar conclusões, este método foi, no entanto, empregue com sucesso em inúmeros estudos com éguas e veados fêmeas (Garza *et al.*, 1986; Dalin *et al.*, 2002; Imboden *et al.*, 2004; Elhay *et al.*, 2007) e pode ser considerado como um possível método de contracepção em elefantes.

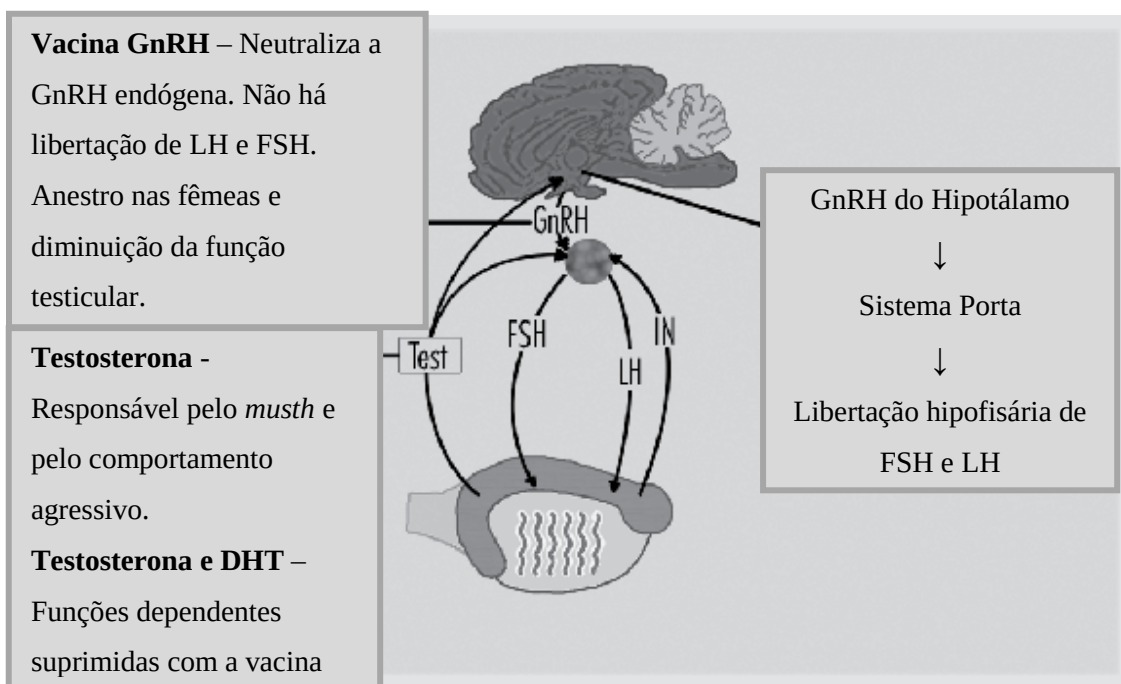


Figura 13. Mecanismo de controlo hormonal e locais de acção dos anticorpos anti-GnRH em machos e fêmeas (adaptado de Bertschinger *et al.*, 2004b)

1.6.2.3.2 Proteína da zona pelúcida porcina – pZP

A zona pelúcida é a estrutura extracelular que rodeia e protege os oócitos dos mamíferos e é composta por três glicoproteínas / receptores, ZP1, ZP2 e ZP3 (Wolgemuth *et al.*, 1984). A zona pelúcida desempenha funções fundamentais no processo de fertilização que é iniciado pela ligação dos espermatozóides ao oócito.

Em suínos foi demonstrado que as glicoproteínas ZP3 e ZP1 constituem os receptores de ligação ao espermatozóide e que ZP2 tem a função de bloquear a polispermia - adesão e penetração de mais que um espermatozóide (Moller & Wassarman, 1989). A ligação do espermatozóide aos receptores da zona pelúcida inicia a cascata de transdução de sinal que vai determinar a reacção acrossómica (Gupta *et al.*, 1997). A reacção acrossómica consiste na libertação de enzimas proteolíticas que facilitam a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e consequente fertilização.

A zona pelúcida porcina constitui, actualmente, o princípio activo de eleição para o fabrico de vacinas contra a zona pelúcida em espécies selvagens. É fácil obter em grandes quantidades (de ovários de porcos abatidos em matadouros) e os anticorpos que induz reconhecem os epítomos da zona pelúcida de muitas espécies-alvo (Fayer-Hosken *et al.*, 1997, 1999; Barber & Fayer-Hosken, 2000).

Os primeiros relatos da utilização da zona pelúcida porcina como contraceptivo podem ser atribuídos aos trabalhos de Sacco & Shivers (1973) e Shivers *et al.* (1972), que demonstraram que os anticorpos produzidos contra as proteínas da zona pelúcida porcina bloqueiam os receptores e inibem a adesão do espermatozóide ao oócito (figura 14). Pouco tempo depois, descobriu-se que a formação espontânea de anticorpos anti-ZP causava infertilidade em humanos (Shivers & Dunbar, 1977) e que proteínas da zona pelúcida porcina podiam, também, bloquear a fertilidade em humanos (Sacco, 1977). Na mesma altura Palm *et al.* (1979) demonstraram que os anticorpos contra a pZP eram específicos e não reagiam com outros tecidos ou hormonas.

Estas descobertas deram início a vários estudos com primatas não humanos, para tentar desenvolver o método e aplicá-lo mais tarde em humanos (Gulyas *et al.*, 1983; Sacco *et al.*, 1986). Três principais razões levaram a que a contracepção com pZP deixasse de ser considerada útil para utilização em humanos: o sistema imunitário é variável entre pacientes e por isso também a sua resposta imune e a eficácia do contraceptivo; o tempo que leva para o efeito ser revertido é também muito variável; em algumas espécies como babuínos, coelhos, e

porcos da Guiné, a vacina provoca alterações prejudiciais no funcionamento dos ovários (Wood *et al.*, 1981).

Menos de uma década depois, Liu *et al.* (1989) demonstraram que era possível induzir contracepção em éguas com pZP. Nos dezanove anos seguintes, a vacina com pZP foi desenvolvida e usada como método contraceptivo em manadas de cavalos selvagens nos Estados Unidos, com elevados níveis de eficácia e segurança (Kirkpatrick *et al.*, 1990, 1991, 1992; Kirkpatrick & Turner, 2002, 2003, 2007). Os resultados do trabalho feito com cavalos levaram a que o método fosse aplicado em veados (McShea *et al.*, 1997; Naugle *et al.*, 2002; Rutberg *et al.*, 2004) e muitas outras espécies em zoológicos (Kirkpatrick *et al.*, 1995; Frank *et al.*, 2005).

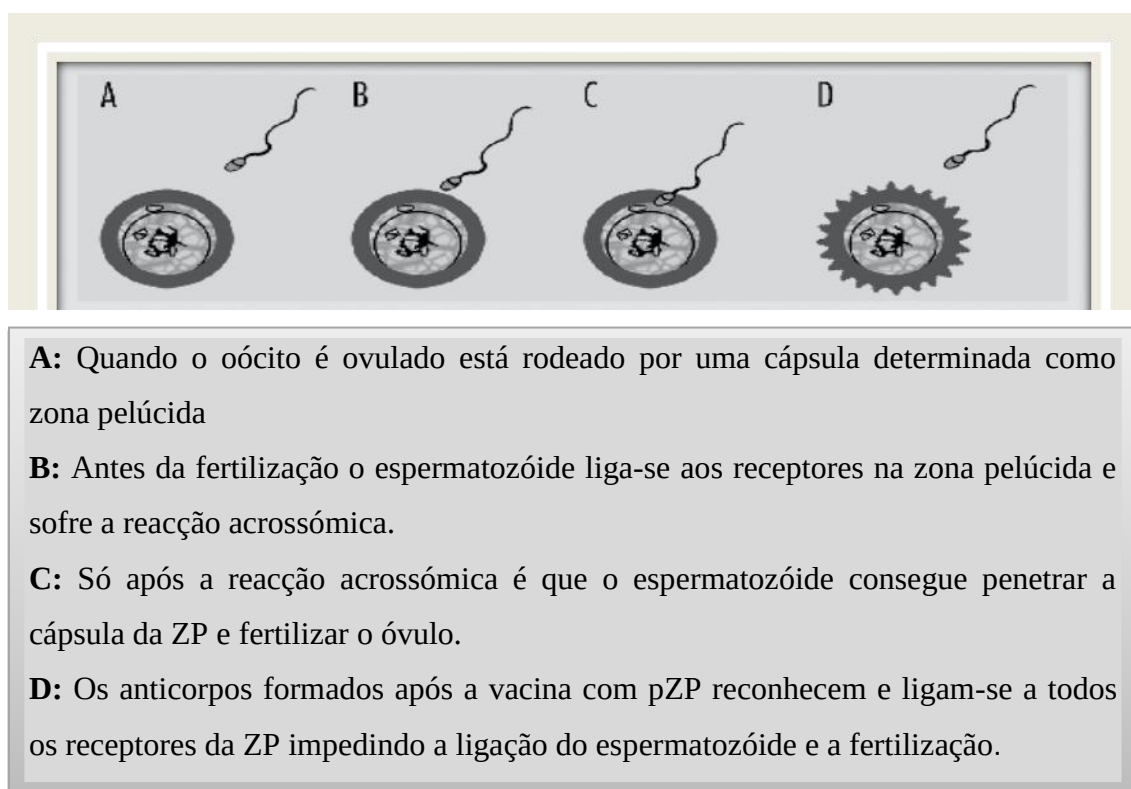


Figura 14. Mecanismo de acção proposto para a vacina com pZP (adaptado de Bertschinger *et al.*, 2004).

As aplicações de pZP a várias espécies de animais selvagens e o sucesso desta técnica aproximam a proteína da zona pelúcida porcina da definição do contraceptivo ideal para espécies em liberdade (Kirkpatrick & Turner, 1991). A vacina resulta numa eficácia perto dos 90%, pode ser administrada à distância com dardos, os efeitos contraceptivos são reversíveis, não provoca alterações sociais ou comportamentais nos animais tratados, não tem efeitos

secundários prejudiciais para a saúde, não circula na cadeia alimentar, é segura para utilizar em animais gestantes e pode ser produzida e aplicada a um custo relativamente reduzido.

Os primeiros elefantes tratados com pZP foram animais mantidos em parques zoológicos. Os testes iniciais pretendiam determinar as doses certas e o protocolo mais eficiente para utilizar em populações em liberdade (Kirkpatrick & Rutberg, 2001). Os resultados deste estudo foram promissores e, em 1995, a administração dos parques nacionais da África do Sul, em conjunto com a Humane Society dos Estados Unidos, iniciou um projecto no Parque Nacional Kruger para avaliar a eficácia e segurança do método em elefantes selvagens (Fayes-Hosken *et al.*, 1997, 2000; Kirkpatrick & Rutberg, 2001). Os resultados em termos de eficácia e segurança a curto prazo foram positivos, mas há ainda vários possíveis factores negativos a ter em conta (Fayer-Hosken *et al.*, 1997, 2000).

1.6.2.3.2.1 Pré-requisitos da utilização de pZP como contraceptivo em larga escala

Para avaliar objectivamente a possibilidade do uso de um contraceptivo em larga escala é necessário clarificar se um determinado método cumpre os requisitos de um contraceptivo *Gold Standard* (Frayne & Hall, 1999; Kirkpatrick & Rutberg, 2001)

1.6.2.3.2.2 Eficácia de 90%

Os resultados de vários estudos realizados com pZP relatam valores de eficácia muito variáveis o que, possivelmente, se deve à maneira como os resultados são expressos, por exemplo: uma percentagem de animais que não ficou gestante durante um determinado tempo ou uma percentagem da redução da taxa de gestação entre um grupo tratado e um grupo de controlo. Em outras espécies, que não elefantes, a eficácia da pZP varia entre 78% e 0% de animais gestantes após e durante o tratamento (McShea *et al.*, 1997). Os dois estudos mais credíveis e duradouros realizados com elefantes relatam uma taxa pós-vacinal de gestação que varia entre 44% e 0% entre fêmeas imunizadas (Delsink *et al.*, 2003). O quadro nº 4 sumariza os estudos com pZP e a sua eficácia.

1.6.2.3.2.3 Reversibilidade dos efeitos contraceptivos

Um dos pré-requisitos, considerado atributo importante do contraceptivo de animais selvagens, é a sua reversibilidade. Idealmente, deveria permitir que uma determinada população, sob controlo reprodutivo, começasse a procriar novamente no momento da interrupção do tratamento contraceptivo e num curto espaço de tempo, em caso de diminuição populacional. Teoricamente, os efeitos contraceptivos de um imun contraceptivo devem parar uma vez que os títulos de anticorpos caiam para um nível abaixo do necessário para produzirem efeito (Barber & Fayer-Hosken, 2000). Estudos com cavalos (duração de quatro anos) e elefantes (um ano) demonstraram que, após um ano da vacinação (curso de três vacinas), os animais voltam ao estado reprodutivo normal (Miller *et al.*, 2001; Powel & Monfort, 2001; Kirkpatrick & Rutberg, 2001). Contudo, cavalos vacinados por maiores períodos de tempo demoraram cerca de quatro anos a recuperar a fertilidade (Mcshea *et al.*, 1997) porque a imunização com pZP provocou um declínio na taxa de ovulação (Kirkpatrick *et al.*, 1997).

1.6.2.3.2.4 Capacidade de administração à distância sem manipulação dos animais

Existem duas formas de imunizar um animal sem necessidade de o capturar, através de um dardo ou bala biodegradável ou por via oral no alimento.

As desvantagens do uso de comprimidos orais são a necessidade de certeza que a vacina não é destruída pelo sistema digestivo (Kirkpatrick & Rutberg, 2001) e a possibilidade de imunizar outro que não o animal-alvo. Para administrar a vacina através de um dardo ou bala é necessário incorporar o antigénio pZP e o adjuvante na bala ou carregar o dardo com a mistura para assegurar uma correcta administração após impacto (Muller *et al.*, 1997). Entre as desvantagens deste método, no que respeita à utilização em grandes populações de animais, encontra-se a necessidade de múltiplas administrações da vacina para obter um título eficaz de anticorpos (Fayer-Hosken *et al.*, 1999; Kirkpatrick & Rutberg, 2001; Pimm & Van Aarde, 2001; Bertschinger *et al.*, 2003; Delsink *et al.*, 2003). Para ultrapassar o problema surgiram progressos recentes com o objectivo de desenvolver um protocolo de imunização com uma só administração da vacina (Turner *et al.*, 2007; Kirkpatrick & Rutberg, 2001). A chave para tais protocolos consiste no uso de microesferas ou grânulos biodegradáveis não tóxicos, para transportar o antígeno e o adjuvante, e conseguir que a taxa de degradação seja programada

para que o princípio activo seja libertado com um atraso previsível (Kirkpatrick, 2003). Nos primeiros testes com pZP incorporada em polímeros biodegradáveis foram conseguidos títulos de anticorpos anti-pZP equivalentes aos atingidos com duas administrações da vacina convencional (Turner *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005). A prova de que níveis de contracepção eficazes por longos períodos são possíveis, com uma só administração, está nos resultados obtidos num estudo realizado com focas cinzentas imunizadas com uma dose de pZP incorporada em lipossomas, sendo-lhes induzida a infertilidade por um período de seis anos (Kirkpatrick & Rutberg, 2001).

As preocupações com este método baseiam-se na possibilidade de este tipo de vacinas, desenhadas para longos períodos de imunização através da libertação lenta do antigénio, poderem causar imunotolerância em vez de manter títulos de anticorpos a um nível contraceptivo (Kirkpatrick *et al.*, 1997).

1.6.2.3.2.5 Segurança em animais gestantes

Uma vacina de cariz imunocontraceptivo deve ser segura para a utilização em animais gestantes dado que, em espécies como esta, com um período de gestação não sazonal e longo, torna-se quase impossível não injectar alguns gestantes.

Consequências como a distocia, anomalias fetais ou o nascimento de crias débeis seriam efeitos secundários inaceitáveis para um contraceptivo de animais selvagens. Felizmente, os estudos realizados com veados, burros, cavalos e elefantes indicam que a vacina com pZP não deteriora as gestações nem provoca qualquer tipo de alterações prejudiciais para as fêmeas e/ou crias (Turner & Liu *et al.*, Kirkpatrick *et al.*, 1997; Fayer-Hosken *et al.*, 1999, 2000; Delsink *et al.*, 2003).

1.6.2.3.2.6 Ausência de efeitos secundários significativos

A severidade da reacção no local de injeção da vacina com pZP varia conforme o adjuvante adicionado e o local onde o dardo acerta. O adjuvante mais usado neste tipo de vacina é o *Freuds Complet Adjuvant* e está associado a tumefacções locais, abcessos e claudicações (Turner *et al.*, 1996; Nettles, 1997; Fayer-Hosken *et al.*, 1999). Contudo, nenhum outro efeito negativo foi, até à data, reportado em elefantes (Fayer-Hosken *et al.*, 1999). Uma das preocupações associadas ao uso de pZP é a possibilidade da transmissão, pela

vacina, de agentes infecciosos (como vírus) provenientes dos porcos. No entanto, apesar de não haver evidência de tal transmissão nos estudos realizados, está a ser desenvolvida uma vacina com pZP sintética, como prevenção (Kirkpatrick & Rutberg 2001).

A principal preocupação, em relação ao recurso à pZP como método contraceptivo a longo prazo, é a falta de conhecimento das possíveis alterações ligadas ao seu uso continuado, no que diz respeito à actividade ovárica e ao seu efeito na saúde e comportamento animal. Os elefantes representam um desafio a este respeito devido à sua grande longevidade e complexidade social (Miler *et al.*, 2001; Pimm & Van Aarde, 2001).

1.6.2.3.2.7 Ausência de passagem na cadeia alimentar

Tanto a vacina convencional como a de libertação lenta com compostos biodegradáveis não passam na cadeia alimentar nem provocam efeitos contraceptivos após ingestão (Kirkpatrick *et al.*, 1990; Kirkpatrick & Turner, 2001).

1.6.2.3.2.8 Efeitos mínimos no comportamento individual e social

O uso de hormonas esteróide, como método contraceptivo, é altamente desaconselhado em animais selvagens pelos seus efeitos acentuados no comportamento social, como a separação dos animais tratados das manadas a que pertencem (Fayer-Hosken *et al.*, 2000).

Até à data não foram reportados efeitos deteriorantes no comportamento social de animais tratados com pZP (Kirkpatrick *et al.*, 1997; Kirkpatrick & Rutberg, 2001; Powel & Monfort, 2001) e assume-se que a vacinação não altera a secreção de hormonas reprodutivas; como tal, fêmeas tratadas exibem ciclos éstrico normais (Barber & Fayer-Hosken, 2000). No entanto, enquanto alguns estudos não reportaram alterações de ciclicidade associadas à vacina (Fayer-Hosken *et al.*, 2000; Kirkpatrick & Rutberg, 2001), outros reportam anomalias como:

- Alterações no funcionamento ovárico em cavalos (Miller *et al.*, 2001);
- Alterações na ciclicidade em primatas (Nettles, 1997) e veados (Muller *et al.*, 1997);
- Redução na taxa de ovulação em cavalos (Kirkpatrick *et al.*, 1992);
- Redução na produção de estrogénios em babuínos (Miller *et al.*, 2001) e cavalos (Kirkpatrick *et al.*, 1997);
- Alteração na estrutura ovárica em primatas (Nettles, 1997);
- Inflamação folicular em veados (McShea *et al.*, 1997).

Os efeitos nos ciclos éstricos tendem a agravar-se com a duração de elevados títulos de pZP em circulação, mas não é consensual se a falta de ciclos é positiva ou negativa para o comportamento social.

Os elefantes africanos vivem em grupos sociais altamente complexos constituídos por fêmeas e os seus descendentes mais recentes. Os machos abandonam a manada quando atingem a maturidade sexual e passam a viver em grupos de machos ou solitários (Rasmussen & Shulte, 1998). Só quando uma fêmea está em estro e receptiva é que os machos adultos interagem com as manadas matriarcais (Moss, 1983). Uma consequência óbvia do uso de pZP em elefantes é a diminuição do número de crias; no entanto, não é clara a forma como este facto afecta o comportamento social das manadas (Rasmussen & Shulte, 1998).

Uma outra alteração resultante do uso de pZP é o aumento da frequência de ciclos éstrico e, portanto, o aumento das interacções com machos adultos. Quando gestantes, as fêmeas de elefante só voltam a ter um ciclo éstrico passados dois anos (Rasmussen & Shulte, 1998) e, como tal, ciclos éstricos contínuos não representam uma característica normal no ciclo reprodutivo de elefantes selvagens. Não é clara a forma como o aumento de ciclos éstricos, devido à imunocontracepção, pode afectar o comportamento dos machos ou que alterações podem causar a constante visita de machos adultos aos grupos matriarcais. Em guaxinins, o aumento de ciclos éstricos devido a imunocontracepção levou a um aumento nas interacções macho-fêmea (Ji *et al.*, 2000), ao passo que em veados o aumento do número de fêmeas cíclicas diminuiu o interesse dos machos dominantes (Miller *et al.*, 2001). Os efeitos que estas alterações podem ter em elefantes devem seguir padrões semelhantes mas, a curto prazo, são difíceis de prever.

1.6.2.3.2.9 Custo reduzido

Para a utilização em larga escala em elefantes selvagens, o método contraceptivo tem que ser económico. Whyte *et al.* (1998) afirmam que o uso de pZP como contraceptivo em populações de elefantes, ou em grandes áreas de conservação, pode ser impossível devido à logística e custos das operações. Pimm & Van Aarde (2001) calcularam que os custos para controlar a população de elefantes no KNP, através de imunocontracepção, excediam o orçamento anual da South African National Parks, organização responsável pela gestão de todas as áreas protegidas na África do Sul. Pelo contrário, Fayer-Hosken *et al.* (2001)

defendem que, se tal método foi economicamente viável para controlar populações de veados e cavalos, também o deve ser para elefantes.

O desenvolvimento de vacinas eficazes após apenas uma administração vai, com certeza, reduzir drasticamente os custos envolvidos na imun contracepção (Fayer-Hosken *et al.*, 2001).

1.6.2.3.2.10 Selecção e resistência genética

Em teoria, animais saudáveis, com uma resposta imune vigorosa, devem desenvolver infertilidade como resposta à vacina com pZP mais facilmente que animais fracos, com o sistema imune comprometido (Muller *et al.*, 1997; Nettles, 1997; Miller *et al.*, 2001). Se tal for verdade na prática, a imun contracepção irá favorecer animais com fraca resistência a doenças e facilitar a reprodução de indivíduos geneticamente menos aptos. Contudo, enquanto Muller *et al.* (1997) afirmam que os genes desempenham um papel determinante na resposta aos antígenos, Kirkpatrick *et al.* (1997) defendem que a resposta individual à vacina com pZP depende mais da dose, adjuvante e via de administração do que da imunocompetência.

A longo prazo, é também possível que o mecanismo de selecção natural favoreça indivíduos geneticamente resistentes a um determinado contraceptivo, mas esse problema pode ser ultrapassado pelo desenvolvimento de múltiplas vacinas, com pequenas diferenças de composição, para uso rotativo (Magiafoglou *et al.*, 2003).

Quadro 4: Revisão dos principais estudos contraceptivos com pZP com referência à espécie, duração, tamanho da amostra, protocolo de vacinação e eficácia contraceptiva (adaptado de Perdock *et al.*, 2007).

Referência	Espécie/duração	Tamanho da amostra			Protocolo de imunização	Resultados/Eficácia
		Total	Tratada	Controlo		
Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1990	Cavalos selvagens, 3 Anos	32	26	6	Início: 65µg pZP (0,5 ml) + FCA (0,5 ml) Protocolo 1: 2x reforços de 65µg pZP + FIA (0,5 ml) Protocolo 2: 1x reforços de 65µg pZP + FIA (0,5 ml)	Protocolo 1: 50% (1ºano), 51% (2ºano), 0% (3ºano) crias produzidas Protocolo 2: 62% (1ºano), 37% (2ºano), 12% (3ºano) crias produzidas Controlo: 33% (1ºano), 33% (2ºano), 50% (3ºano) crias produzidas Não tratada: 45,4% crias produzidas no 3ºano
Turner <i>et al.</i> , 1992	Veado cauda branca	9	7	2	65µg pZP (0,5 ml) + FCA (0,5 ml)	pZP tratada: 100% redução Controlo: 86% crias produzidas

Turner, Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1996	Veado cauda branca	95	43	52	Início: 65µg pZP (0,5 ml) + FCA (0,5 ml) Reforço (s): 65µg pZP (0,5 ml) + FIA (0,5 ml) Diferentes tipos de reforço: 1, 2 ou 3 injeções	Durante tratamento: 100% redução Controlo: 94% (média) crias produzidas Microesferas menos eficazes
Turner, Liu, <i>et al.</i> , 1996	Burros selvagens	27	16	11	a) 1ª Injeção: 65µg pZP + FCA 2ª Injeção: 65µg pZP + FIA (3 semanas) b) 130µg pZP + FCA Reforço: 65µg pZP (0,5 ml) + FIA (10/12 meses)	0% Burros gestantes no grupo a) 33% Burros gestantes no grupo b) 54% Burros gestantes no controlo
Referência	Espécie/duração	Tamanho da amostra			Protocolo de imunização	Resultados/Eficácia
		Total	Tratada	Controlo		
McShea <i>et al.</i> , 1997	Veado Cauda Branca 2 Anos	28	19	9	a) Início: 65µg pZP + FCA (0,5 ml) Reforço 1: 65µg pZP + FIA (1 mês) b) Início: 65µg pZP + FCA (0,5 ml) + microesferas 65µg pZP (libertação em 4-6 semanas) Reforço 2º ano: 65µg pZP + FIA	Grupo a): 0% e 10% produziram crias (2 anos) Grupo b): 78% e 22% produziram crias (2 anos) Grupo Controlo: 82% e 89% produziram crias (2 anos)

Turner <i>et al.</i> , 1997	Cavalos selvagens	156	73	83	a) Início: 65µg pZP + FCA (0.5ml) Reforço: 65µg + FIA (0.5ml) b) Início: 65µg pZP + FCA (0.5ml) c) Início: 65µg pZP + FCA (0.5ml) +microesferas d) Grupo não tratado	a) 4.5% de fêmeas com sucesso reprodutivo b) 28.6% de fêmeas com sucesso reprodutivo c) 20% de fêmeas com sucesso reprodutivo d) 53% de fêmeas com sucesso reprodutivo
Fayer-Hosken <i>et al.</i> , 2000; Bertschinger <i>et al.</i> , 2003	Elefantes 2 anos	37	19	18	Início: 600µg pZP + 5 mg S-TDCM Reforço: 1: 600µg pZP + 5 mg S-TDCM (2 semanas) Reforço: 2: 600µg pZP + 5 mg S-TDCM (4 semanas) 600µg pZP + 5 mg S-TDCM	20% de fêmeas gestantes tratadas no 1º ano 80% de fêmeas gestantes no grupo controlo 0% de fêmeas gestantes tratadas após dois anos
	Segundo ano	19	4	3		
Delsink <i>et al.</i> , 2003	Elefantes 2 Anos	23	23	0	Início: 600 µg pZP + FMA Reforço 1: 1:400µg pZP + FIA (3 semanas) Reforço 2: 2:400µg pZP + FIA (6 semanas)	100% de controlo reprodutivo

Legenda: FCA – *Freud's Complete Adjuvant*; FIA-*Freud's Incomplete Adjuvant*; FMA-*Freud's Modified Adjuvant*; pZP- *Porcine Zona Pelúcida Protein*; S-TDCM-*Synthetic Trahalose Dicorynomylcolate Adjuvant*.

1.7 Exemplo de controlo populacional com pZP

Parque Nacional Kruger 1995-2000: A primeira tentativa em elefantes selvagens

Em 1995, os cientistas associados ao desenvolvimento da vacina contra a ZP propuseram à administração do KNP a realização de um projecto para testar a eficácia e segurança da pZP como método contraceptivo em elefantes.

O primeiro passo consistiu no teste do grau de homologia entre a zona pelúcida porcina e a de elefante (Fayer-Hosken *et al.*, 1999). Para este fim, realizou-se um estudo imuno-histoquímico que recorreu a ovários de elefantes mortos nas últimas operações de abate em 1995 e anticorpos anti-ZP de coelho. Secções de ovário foram expostas aos anticorpos anti-ZP, secas e marcadas com anticorpos *imuno-gold-labelled goat anti-rabbit* para permitir a visualização dos complexos antigénio-anticorpo. Os resultados revelaram que as cápsulas de ZP dos oócitos de elefantes ficaram distintamente marcadas nas secções histológicas. Depois dos resultados obtidos, três fêmeas de elefante pertencentes a jardins zoológicos americanos foram tratadas com a vacina, para determinar um protocolo de vacinação eficaz. Todos os animais desenvolveram títulos de anticorpos anti-ZP semelhantes aos dos cavalos que foram tratados com pZP com sucesso (Fayer-Hosken *et al.*, 1997; 1999).

Em 1996, iniciou-se um estudo piloto com 21 fêmeas vacinadas e 20 de controlo, no KPN, com o propósito de testar o potencial contraceptivo da pZP. A primeira inoculação (600 µg) foi administrada com uma seringa, à mão, após captura dos animais para colocação de um colar transmissor, e os dois reforços subsequentes foram administrados, com um intervalo de seis semanas, por dardo disparado de um helicóptero. Um ano mais tarde, 44% dos animais tratados e 89% do grupo de controlo estavam gestantes; uma das fêmeas vacinadas tinha uma cria, indicando que estava gestante na altura do tratamento, cria essa perfeitamente saudável.

Nesse mesmo ano, trataram-se mais dez fêmeas, com a diferença de que os reforços foram administrados na segunda e quarta semana; um ano mais tarde apenas duas (20%) estavam gestantes. Os oito animais não gestantes receberam mais um reforço e, após um ano (dois anos a partir do início do estudo), foram capturados para a realização de um exame ecográfico. Nenhum dos animais estava gestante e o aparelho reprodutivo estava, ecograficamente, normal (Fayer-Hosken *et al.*, 2000).

1.8 O FUTURO

1. Vacinas de uma só administração

Vacinas de uma só administração são formulações que conseguem induzir uma resposta imune e formação de anticorpos suficientes para garantir a eficácia contraceptiva por um ou mais anos sem a necessidade de reforços, libertando a vacina e o adjuvante lentamente (lipossomas) ou em intervalos (polímeros de *lactide-glycolid*) (Turner *et al.*, 2002). Este tipo de formulação é mais prática e barata e provoca menos distúrbios nas manadas de elefantes a serem tratadas, significando que o tratamento pode ser aplicado a populações maiores com taxas de sucesso mais elevadas. As formulações com polímeros de lactide-glycolide foram testadas extensivamente em cavalos selvagens e resultaram na redução da taxa de fertilização em 89%, em 266 fêmeas tratadas durante um ano (Turner *et al.*, 2002).

2. Teste em elefantes de cativeiro

Em 2006, três fêmeas foram injectadas com a vacina imunocontraceptiva em polímeros de *lactid-glycolide* e, para comparar, outras seis fêmeas foram tratadas com a fórmula tradicional. Passados dois meses, foram medidos os títulos de anticorpos nas nove fêmeas (quadro 5). Verificou-se que as tratadas com a vacina em polímeros apresentaram títulos de anticorpos anti-ZP consideravelmente superiores aos das fêmeas vacinadas duas vezes (primeira vacina e reforço após um mês) com a fórmula tradicional (Van Rossum, 2006; Turner *et al.*, 2008).

Quadro 5: Títulos de anticorpos de elefantes fêmeas vacinadas com a vacina tradicional e com a vacina de uma só administração (Bertschinger *et al.*, 2007).

Método de vacinação tradicional	Título de anticorpos anti-pZP na diluição de 1:270.
Fêmea1	0.246
Fêmea2	0.918
Fêmea3	0.915
Fêmea4	0.969
Fêmea5	0.970

Fêmea6	0.354
Vacina de uma administração	Título de anticorpos anti-pZP na diluição de 1:270.
Fêmea1	1.138
Fêmea2	1.431
Fêmea3	1.058

Este tipo de alternativa deve ser estudada e aplicada a pequenas populações selvagens para testar a sua eficácia, duração e reversibilidade. Pequenas alterações na estrutura dos polímeros puderam ainda prolongar o efeito contraceptivo por mais um ou dois anos (Turner *et al.*, 2008).

1.9 Objectivos

O objectivo principal deste trabalho centrou-se na avaliação da eficácia da técnica de revacinação com a vacina imunocontraceptiva pZP, com recurso a um helicóptero, de três manadas de elefantes.

Os objectivos específicos:

Avaliação da eficácia da técnica de revacinação.

Avaliação de efeitos secundários da vacina, tempo despendido em cada operação, custos da revacinação.

Avaliação da reacção social das manadas ao helicóptero e às vacinas.

Comparação da operação de revacinação de 2010 com os anos e métodos anteriores.

2. Material e métodos

Para a realização desta tese foram realizadas 3 operações, na Greater Makalali Private Game Reserve, integradas no plano de revacinação anual, com a vacina contraceptiva pZP de 23 elefantes fêmea.

2.1 Local de Estudo

A Greater Makalali Private Game Reserve (GMPGR) localiza-se na província de Limpopo, África do sul, (30.49°S, 24.00°E) a 300 metros de altitude. É caracterizada por floresta mista, onde predomina a espécie *Cobretum apiculatum*, e recebe cerca de 400 mm anuais de precipitação e tem de 10 000 hectares de área.

2.2 Elefantes

Os animais foram identificados de acordo com características individuais que incluíram sexo, padrões das orelhas, tamanho dos dentes, cicatrizes, massas corporais, pelagem da cauda e padrão venoso das orelhas. Antes do início do estudo, no ano 2000, todos os elefantes excepto juvenis, estavam totalmente identificados com resenhos e fotografias.

Durante a operação de revacinação de 2010 vacinamos as 23 fêmeas existentes na reserva num total de 3 manadas compostas por 47 animais adultos e sub-adultos.

Os 23 animais vacinados que fazem parte da população da reserva estavam distribuídos por 3 manadas que foram identificadas como, a manada norte, sul e meio. A primeira operação de vacinação teve como alvo a manada sul, com 7 fêmeas (n=7), a segunda a meio com 5 fêmeas (n=5) e a terceira operação a manada norte com 11 fêmeas (n=11); (figura 15).

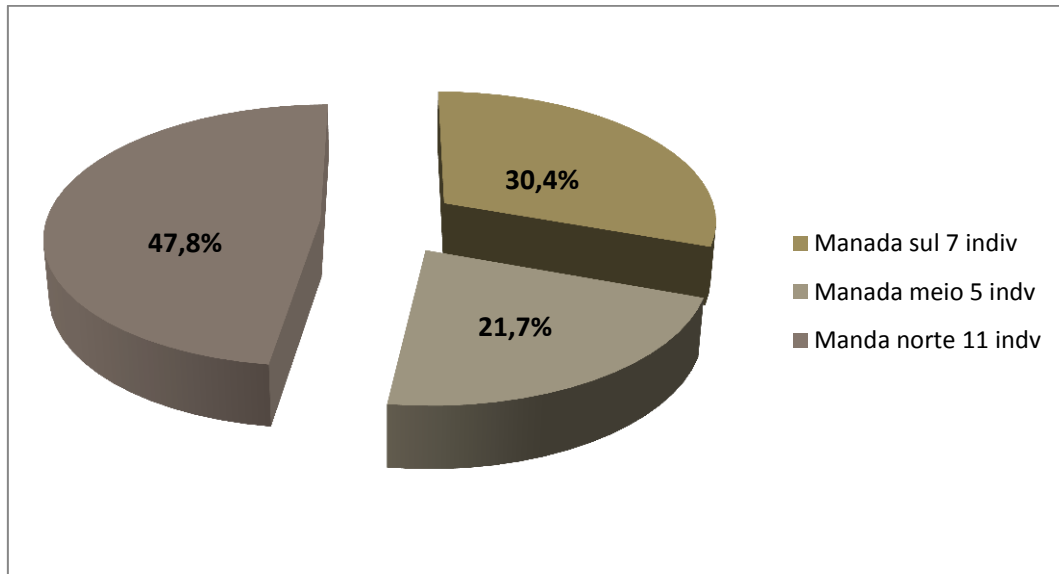


Figura 15: Caracterização da amostra relativamente à presença de fêmeas, por manada.

Em cada manada existia um elefante com um colar equipado com um rádio VHF o que facilitou a detecção dos animais alvo através de telemetria.

2.3 Vacina e adjuvantes

A vacina com pZP foi produzida através de uma modificação dos métodos descritos por Dunbar *et al.*, 1980 (Science and Conservation Centre ZooMontana – vacinas de 2000/2003). De 2003 em diante foi fornecida pelo departamento de estudos de produção animal da Universidade de Pretória.

Para os reforços de 2010 utilizou-se o adjuvante de Freud incompleto, e o volume total da solução vacina-adjuvante foi de aproximadamente 1.5ml.

Nas horas que antecederiam as vacinações a vacina e adjuvante foram misturados numa seringa de 10 ml que era agitada 60 vezes até obter uma solução uniforme e límpida. Todos os dardos (23 no total) foram preparados nesta altura e guardados numa camara refrigerada.

2.4 Dose

A dose de pZP utilizada para a revacinação foi de 400 ug de pZP.

2.5 Método de administração da vacina.

Devido ao tamanho da reserva, dificuldade de aproximação por terra, e restrições de tempo a vacina foi administrada através do disparo de dardos a partir de um helicóptero, Hughes 3000. O alvo dos dardos com a vacina foram os grandes músculos – região lombar (principalmente), e glútea. (figura 16).



Figura 16: Locais seleccionados como alvo para a administração da vacina

2.6 Dardos e armas usados nas vacinações

Para minimizar o impacto e consequente stress nos animais vacinados, recorreu-se a dardos da Dan Inject® (Dan Inject International, Dinamarca) com 2 ml de capacidade, disparados por uma espingarda de ar comprimido da mesma marca. A arma opera com uma pequena botija de Co2 controlada por um sistema silencioso de ajuste de pressão que permite pressões até 16 bar (F Rohr, Dan inject Skukuza, Kruger National Park, pers comm., 2003). Dependendo do comprimento do cano usado é possível disparar dardos a uma distância que varia entre 1 e 40 metros (F Rohr, Dan inject Skukuza, Kruger National Park, pers comm., 2003). Foram utilizados dois modelos de arma, a JM special, e a JM DB (figura 17) com dois canos para permitir um disparo mais rápido dos dardos.

Uma vez que os animais não foram anestesiados, era imperativo que os dardos pudessem ser recuperados. Para isso foram utilizadas agulhas de 60 mm sem âncora, e todos os dardos

tinham uma pena fluorescente que permitia uma fácil visualização após a sua queda. Em 7 dos 23 animais vacinados foram utilizados dardos com um pequeno transmissor rádio incorporado que permitiu determinar a sua localização por telemetria (figura 18).



Figura 17: Espingardas de dardos Dan-inject JM DB e JM (Dan-inject corp.)

Transmitter In Dart



Figura 18: Dardo Dan Inject com transmissor rádio incorporado (Dan-inject corp.).

2.7 Sucesso da administração da vacina

Para documentar a eficácia da vacinação, tentou-se recuperar todos os dardos utilizados. A administração foi considerada eficaz quando todo o conteúdo do dardo tinha sido expulso. Dardos que continham restos de vacina foram considerados como ineficazes e os animais foram revacinados.

2.8 Efeitos locais da vacinação

Foram efectuados registos, após a vacinação de cada animal, com o local de impacto do dardo para se observar e determinar os efeitos secundários passíveis de serem observados a nível cutâneo.

2.9 Efeitos sociais da vacinação

O comportamento de reacção das manadas à vacinação foi registado em todas as operações durante 30 dias para determinar o seu efeito.

2.10 Custos da vacinação

Os custos relacionados com a administração da vacina incluíram; a vacina, adjuvante, dardos, agulhas, botijas de CO₂, custos de aluguer de helicóptero e a contratação de um veterinário especializado.



Figura 19. Elefante anestesiado para revacinação e avaliação do estado reprodutivo na Makalali Game Reserve. (arquivo pessoal 2011)

3. Resultados

Durante a primeira operação todas as fêmeas da manada sul (n=7) foram vacinadas com sucesso à primeira tentativa, tendo a operação durado 25 minutos. Todos os dardos foram recuperados no próprio dia em 2 horas (estes dardos estavam equipados com transmissor rádio) e estavam todos vazios de conteúdo. Nesta manada observou-se em 2 animais (28.5%) o desenvolvimento de granulomas, no local da vacinação, com diâmetro inferior a 5 cm, e que desapareceram nos 7 dias subsequentes sem tratamento. O comportamento da manada foi considerado anormal nos 2 dias seguintes à vacinação por esta não se aproximar das zonas com bebedouros artificiais durante esse período.

A vacinação da manada do meio teve uma eficácia de 80% (4 de 5) na primeira tentativa, na qual um dos animais não foi vacinado à primeira por falha do alvo. Os 4 dardos foram recuperados em 4 horas e estavam todos sem conteúdo. A operação teve uma duração de 21 minutos. Nenhum elefante desenvolveu lesões cutâneas de registo e esta manada não apresentou alterações comportamentais derivadas da operação.

A manada norte foi vacinada com a arma de duplo cano que permitiu uma maior rapidez de trabalho, tendo sido realizado em 19 minutos. Todos os animais, 100% (n=11), foram vacinados na primeira tentativa e, 75% (n=9) dos dardos foram recuperados em 4.5 horas devido ao mau tempo que se fazia sentir. Foram registados 2 granulomas pós vacinais com menos de 5 cm de diâmetro, que regrediram em 2 dias. A manada sofreu alterações comportamentais, tendo desaparecendo durante 4 dias do seu território habitual.

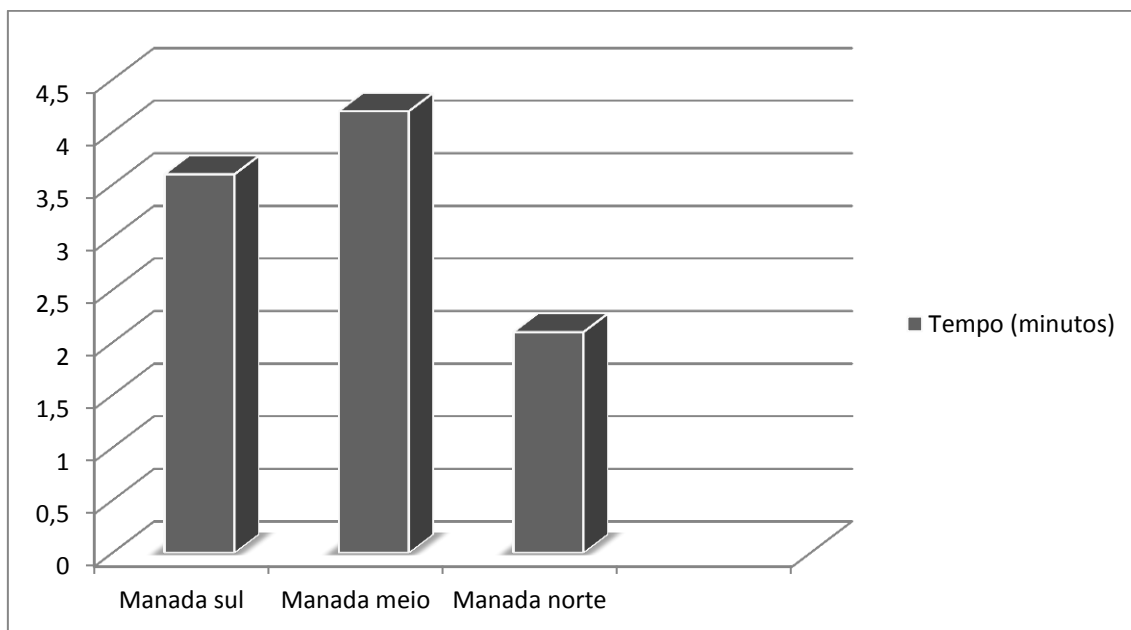


Figura 20: Tempo médio de vacinação por elefante, nas 3 manadas

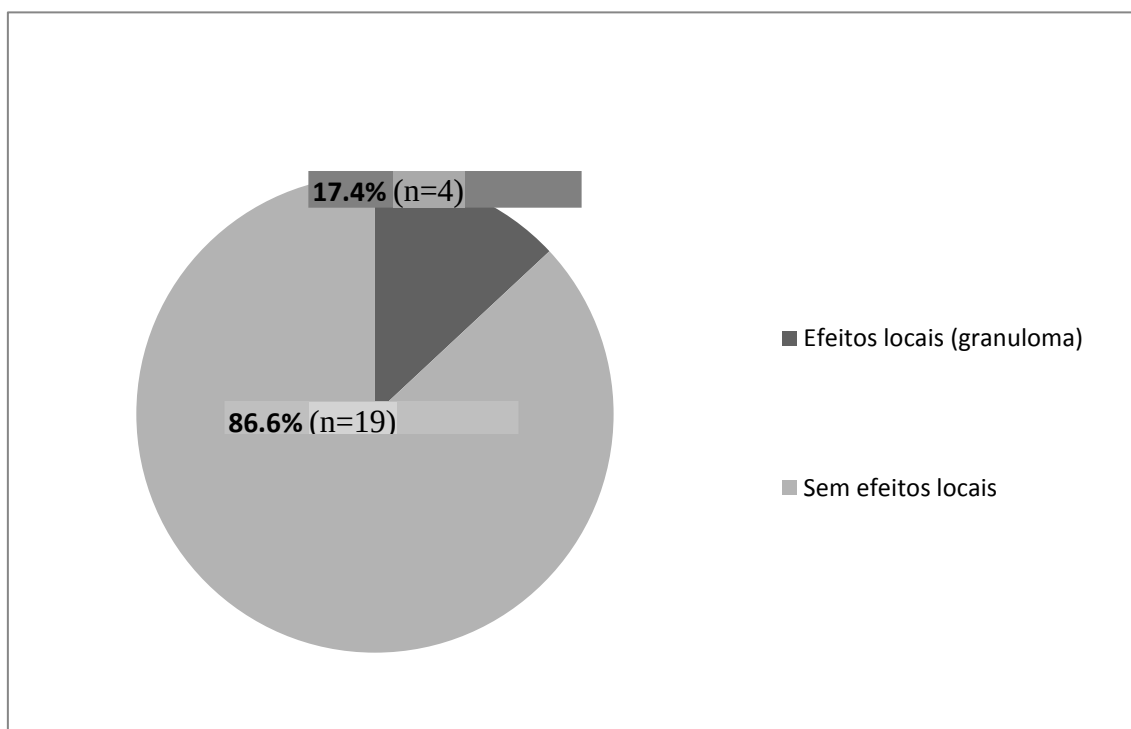


Figura 21: Presença de efeitos secundários locais após a vacinação.

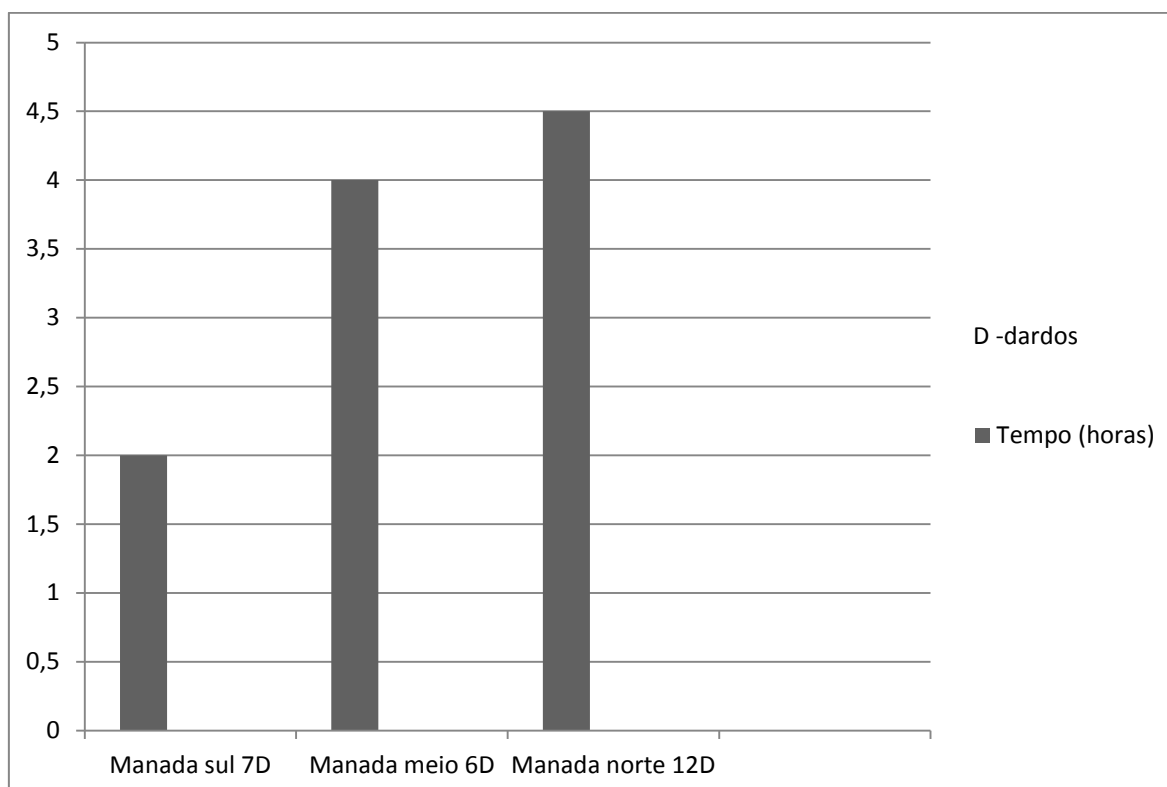


Figura 22: Tempo gasto na recuperação dos dardos nas diferentes manadas.

Quadro 6: Taxa de recuperação dos dardos em 2010.

	Manada sul	Manada meio	Manada norte
Total de dardos disparados	7	6	12
Total de dardos recuperados	7 - 100%	5 - 80%	9 - 75%
Dardos inválidos por:			
Falha do alvo	0%	20%	8.3%
Descarga incompleta do conteúdo	0%	0%	0%

Os custos da operação de vacinação estão resumidos no quadro 7, a vacina e adjuvante foram comprados na universidade de Pretória a 10 dólares americanos por dose (a tabela inclui custos extra devido a dardos que falharam o alvo), o custo aproximado por dardo com agulha, pena fluorescente e Co2 foi de 22 dólares americanos. Para a manda sul foram utilizados dardos com transmissor rádio no valor de 35 dólares (incluindo agulha, pena e gás). A contratação do helicóptero e piloto foi de 420 dólares por hora incluindo combustível. O procedimento de vacinação durou cerca de 64 minutos e, a este tempo é necessário somar a viagem de ida e volta do helicóptero para a sua origem, a qual durou 80 minutos. A equipe veterinária era constituída por 3 pessoas que faziam parte da empresa de serviços veterinários especializada em animais selvagens – Supergamedealers, com sede em Windhoek, Namibia. O custo da sua contratação foi de 510 dólares por dia de trabalho, tendo a equipe passado 3 dias no terreno. Por elefante a operação custou aproximadamente 148 dólares americanos.

Quadro 7 : Resumo dos custos em dólares Americanos da operação de revacinação.

	Vacina	Dardos	Helicóptero	Veterinário
Custo (US dólares)	260	619	1008	1530
Total	3417			



Figura 23. Operação de revacinação com recurso a um helicóptero (arquivo pessoal 2010)

4. Discussão / conclusão

O método inicial seleccionado na GMPGR foi o disparo dos dardos com a vacina a partir de veículos terrestres, para facilitar a recuperação dos dardos e diminuir o *stress* das manadas. Durante as operações de revacinação em 2004, dezassete fêmeas foram vacinadas de um helicóptero. Perante uma melhoria significativa na eficácia do procedimento, desde 2005 todas as vacinações passaram a ser realizadas por este método. A partir desta altura o tempo despendido no campo diminuiu com o aumento de dardos disparados, tal como foi observado neste estudo, em que o tempo de vacinação das 23 fêmeas foi de apenas cerca de 60 minutos em vez de durar dias (Delsink, pers. Obs. 2007). Menos tempo significa menos interacção com os animais, menos efeitos secundários, menos custos e mais eficiência. Antes da utilização do helicóptero e com uma equipa menos experiente, o tempo despendido para vacinar o efectivo era de cerca de 12 horas por elefante (total de 12 dias em 2003) com uma média de 2 dardos disparados por dia (Delsink 2006), ao contrário dos nossos resultados com uma média de 15 dardos disparados por dia.

O facto de existirem animais com colares transmissores também se revela determinante para a rapidez do processo. Até 2007 o tempo de voo e custos associados foi quase o dobro do actual devido ao tempo necessário para encontrar as manadas (Delsink 2007a).

A utilização de dardos com transmissores rádio para serem mais facilmente localizados não foi vantajosa em relação aos dardos comuns. O custo (mais 13 dólares por dardo) não compensa em relação ao tempo despendido na sua procura (inferior em cerca de 1 hora) para este número de elefantes, no entanto para populações maiores esta pode ser uma ferramenta útil para tornar as operações mais rápidas e económicas.

A arma Dan inject JM DB, com duplo cano permitiu uma redução do tempo médio de vacinação por elefante em 1,8 minutos (média com cano simples 3,9 minutos, média com cano duplo 2,1 minutos). Nesta situação pode não ser significativo no entanto, para populações de elefantes de maior dimensão o uso do duplo cano é recomendado.

Neste estudo foram escolhidos preferencialmente os músculos da região lombar como alvo, pois, colocou-se a hipótese de que esta zona seria menos propensa ao desenvolvimento de lesões pós vacinais. Desde o início do projecto a média de formação de granulomas no local de injeção foi de aproximadamente 18% (Delsink pers.com. 2010), sem contar com o ano

2000 em que o adjuvante utilizado provocou lesões em 89% dos vacinados. Nesta operação todos os animais foram vacinados na região lombar e apenas 13% desenvolveu lesões cutâneas. Nas vacinações de 2011 vacinou-se igualmente na região lombar e foram obtidos resultados semelhantes (Tubbesing pers.com.2011) o que pode significar que esta zona muscular é menos sensível à vacinação em comparação zona dos glúteos.

Os efeitos comportamentais associados à vacinação foram pouco pronunciados, comparativamente a programas vacinais anteriores, havendo apenas alterações no padrão de deslocações em duas manadas mas que foram de curta duração.

Nesta operação o custo médio por elefante foi de 148 dólares valor que não difere em muito com os anos anteriores, 2004 – 120\$, 2005 – 132\$, 2007 – 138\$ (Delsink 2007), sendo que o principal factor de variação do custo é a distância a que o helicóptero se encontra da reserva na altura em que é contratado. As outras pequenas flutuações podem ser atribuídas a instabilidade do preço do combustível durante os anos do projecto.

5. Considerações finais

O desafio actual passa por determinar se a imun contracepção com pZP é de facto uma alternativa economicamente viável, biologicamente possível e eticamente aceitável para a gestão de populações de elefantes africanos em liberdade. Se todos os estudos e testes provarem que a pZP cumpre os critérios do contraceptivo ideal para aplicação em animais selvagens, este deve ser considerado um método válido para o controlo populacional de elefantes.

Infelizmente tem sido dada pouca importância à componente moral e aos dilemas sociais associados ao estatuto do elefante como uma espécie altamente inteligente e carismática que serve de pilar para muitos habitats em regiões habitadas por milhões de pessoas extremamente pobres.

Tanto em elefantes como noutras espécies, a eficácia contraceptiva da pZP varia consideravelmente, dependendo do protocolo de imunização e da quantidade de reforços vacinais subsequentes. Mais reforços resultam em títulos de anticorpos mais elevados, mas também requerem a identificação dos animais com colares transmissores e maior *stress* associado às repetidas operações. O desenvolvimento de vacinas de uma só administração é, como tal, imperativo e irá permitir ultrapassar alguns obstáculos, tornando a pZP num método possível de ser aplicado a um grande número de animais.

A incerteza e a relativa falta de dados em relação à segurança e reversibilidade do efeito contraceptivo a longo prazo são das principais causas para a não recomendação de uso massivo de pZP em elefantes. Vários estudos relatam a existência de danos nos ovários (Paterson *et al.*, 1999), reduzida actividade ovárica e atrasos no retorno à actividade ovárica normal após tratamentos com pZP (Muller *et al.*, 1987) em veados e cavalos. Estes resultados são mais alarmantes no que respeita aos elefantes, devido à sua grande longevidade destes animais. Mesmo que a vacinação não prejudique directamente os ovários, existem provas que defendem que longos períodos de não reprodução podem acelerar o processo de degenerescência reprodutiva (Hermes *et al.*, 2004).

É claro que o custo associado à implementação de um programa de contracepção em elefantes selvagens é o principal obstáculo para a sua utilização em grandes populações. Embora a criação de protocolos de imunização que utilizam apenas uma administração venha

simplificar e reduzir grandemente os custos e a logística, é possível que a imun contracepção em elefantes continue apenas a ser possível em pequenas áreas com baixo número de elefantes, mas com taxas de crescimento e densidades populacionais elevadas.

A grande maioria da bibliografia existente sobre imun contracepção sugere que a vacina com pZP é um meio contraceptivo extremamente eficaz em elefantes, pois pode ser administrado à distância, por ser seguro para utilizar em fêmeas gestantes, por não passar através da cadeia alimentar e ser reversível, pelo menos para curtos períodos de tratamento. Contudo, para se implementar este método em larga escala são ainda necessários mais estudos que provem a sua segurança a longo termo na saúde, comportamento e reversibilidade após longos períodos de tratamento.

BIBLIOGRAFIA

- Asa, C.S. 2005. A primer of reproductive processes: potential target tissues or processes for contraceptive intervention. In: C.S. Asa & I.J. Porton (eds) *Wildlife contraception*. The John Hopkins University Press, Baltimore, 30–52.
- Becker, S.E., W.J. Enright & L.S. Katz 1999. Active immunization against gonadotropin-releasing hormone in female white-tailed deer. *Zoo Biology* 18, 385–396.
- Bengis, R. 1993. Care of the African elephant *Loxodonta africana* in captivity. In: A.A. McKenzie (ed.) *The capture and care manual*. Wildlife Decision Support Services cc and The South African Veterinary Foundation, Lynnwood Ridge and Menlo Park, 506–511.
- Bertschinger, H.J., C.S. Asa, P.P. Calle, J.A. Long, K. Bauman, K. Dematte, W. Jochle & T.E. Trigg 2001. Control of reproduction and sex related behaviour in exotic carnivores with the GnRH analogue deslorelin: preliminary observations. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 57, 275–283.
- Bertschinger, H.J., T.E. Trigg, W. Jochle & A. Human 2002. Induction of contraception in some African wild carnivores by down-regulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. *Reproduction, Supplement* 60, 41–52.
- Bertschinger, H.J., J.F. Kirkpatrick, R.A. Fayrer-Hosken, D. Grobler & J.J. van Altena 2004a. Immunocontraception of African elephants using porcine zona pellucida vaccine. In: B. Colenbrander, J. de Gooijer, R. Paling, S. Stout, T. Stout & T. Allen (eds) *Proceedings of an Expert Consultation on the Control of Wild Elephant Populations*, Utrecht University, 45–47.
- Bertschinger, H.J., L.J. Venter & A. Human 2004b. Treatment of aggressive behaviour and contraception of some primate species and red pandas using deslorelin implants. *Advances in Ethology* 38, 24.
- Bertschinger, H.J., A.K. Delsink, J.F. Kirkpatrick, D. Grobler, J.J. van Altena, Human, B. Colenbrander & J. Turkstra 2004c. The use of pZP and GnRH vaccines for contraception and control of behaviour in African elephants. In: B. Colenbrander, J. de Gooijer, R. Paling, S. Stout, T. Stout & T. Allen (eds) *Proceedings of an expert consultation on the control of wild elephant populations*, Utrecht University, 69–72.
- Bertschinger H.J., M. Jago, J.O. Nothling & A. Human 2006. Repeated use of the GnRH analogue deslorelin to down-regulate reproduction in male cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology* 66, 1762–1767.

- Bertschinger, H.J., A. Delsink, J.J. van Altena, D. Grobler, J.F. Kirkpatrick, M. Bates & T. Burke 2007. Effects of porcine zona pellucida immunocontraception on annual calving percentages of six discrete African Elephant populations. 6th International Conference on Fertility Control for Wildlife. York, UK, 3–5 September, 48.
- Bertschinger, H.J., M.A. de Barros Vaz Guimaraes, T.E. Trigg & A. Human 2008. The use of deslorelin implants for the long-term contraception of lionesses and tigers *Wildlife Research*, 35: 525–530.
- Bokhout, B., M. Nabuurs & M. de Jong 2005. Vasectomy of older bulls to manage elephant overpopulation in Africa. *Pachyderm* 39, 97–103.
- Cooper, K.A., J.D. Harder, D.H. Clawson, D.L. Fredrick, G.A. Lodge, H.C. Peachey, T.J. Spellmire & D.P. Winstel 1990. Serum testosterone and musth in captive male African and Asian elephants. *Zoo Biology* 9, 297–306.
- Curtis, P.D., R.L. Pooler, M.E. Richmond, L.A. Miller, G.F. Marrfeld & F.W. Quimby 2001. Comparative effects of GnRH and porcine zona pellucida (pZP) immunocontraceptive vaccines for controlling reproduction in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Reproduction* 60, 131–141.
- Delsink, A.K., J.J. van Altena, J.F. Kirkpatrick, D. Grobler & R. Fayrer-Hosken 2002. Field applications of immunocontraception in African Elephants (*Loxodonta africana*). *Reproduction* 60, 117–124.
- Delsink, A., H.J. Bertschinger, J.F. Kirkpatrick, H. De Nys, D. Grobler & J.J. van Altena 2004a. Contraception of African elephant cows in two conservancies using porcine zona pellucida vaccine, and the control of aggressive behaviour in elephant bulls with GnRH vaccine. In: B. Colenbrander, J. de Gooijer, R. Paling, S. Stout, T. Stout & T. Allen (eds) *Proceedings of an expert consultation on the control of wild elephant populations*, Utrecht University, 69–72
- Delsink, A.K., H.J. Bertschinger, J.F. Kirkpatrick, D. Grobler, J.J. van Altena & R. Slotow 2004b. The preliminary behavioural and population dynamic response of African elephants to immunocontraception. In: J.H.A. de Gooijer & R.W. Paling (eds) *Proceedings of the 15th Symposium on Tropical Animal Health and Reproduction: Management of Elephant Reproduction*, Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, The Netherlands, 19–22.

- Delsink, A.K. 2006. The costs and consequences of immunocontraception implementation in African elephants at Makalali Conservancy, South Africa. M.Sc. thesis, University of Kwa-Zulu Natal, Durban.
- Delsink, A.K., J.J. van Altena, D. Grobler, H. Bertschinger, J.F. Kirkpatrick & R. Slotow 2006. Regulation of a small, discrete African elephant population through immunocontraception in the Makalali Conservancy, Limpopo, South Africa. *South African Journal of Science* 102, 403–405.
- Delsink, A.K., J.J. van Altena, D. Grobler, H. Bertschinger, J.F. Kirkpatrick & R. Slotow 2007a. Implementing immunocontraception in free-ranging African elephants at Makalali Conservancy. *Journal of the South African Veterinary Association* 78(1), 25–30.
- Delsink, A.K., J.F. Kirkpatrick, J.J. van Altena, D. Grobler, H. Bertschinger & R. Slotow 2007b. Lack of social and behavioural consequences of immunocontraception in African elephants. 6th International Conference on Fertility Control for Wildlife. York, UK, 3–5 September, 31.
- De Nys, H.M. 2005. Control of testosterone secretion, musth and aggressive behaviour in African elephant (*Loxodonta africana*) bulls using a GnRH vaccine. MSc thesis, University of Pretoria.
- Dunbar B. S., V. Lee, S. Prasad, D. Schwanhn, E. Schwoebel, S. Skinner & B. Wilkins 1984. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reproduction, Fertility and Development* 6, 331–347.
- Dunbar B.S., C. Lo & V. Stevens 1989. Effect of immunization with purified porcine zona pellucida proteins on ovarian function in baboons. *Fertility and Sterility* 52, 311–318.
- Fayrer-Hosken, R.A., P. Brooks, H.J. Bertschinger, J.F. Kirkpatrick, J.W. Turner & I.K.M. Liu 1997. Management of African elephant populations by immunocontraception. *Wildlife Society Bulletin* 25, 18–21.
- Fayrer-Hosken, R.A., P. Brooks, H.J. Bertschinger, J.F. Kirkpatrick, D. Grobler, N. Lamberski, G. Honneyman & T. Ulrich 1999. Contraceptive potential of the porcine zona pellucida vaccine in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Theriogenology* 52, 835–846.
- Fayrer-Hosken, R. A., D. Grobler, J.J. Van Altena, J.F. Kirkpatrick & H. Bertschinger 2000. Immunocontraception of African elephants. *Nature* 407, 149. Foerner, J.J., R.I.

- Houck & J.H. Olsen 1994. Surgical castration of the elephant (*Elephas maximus* and *Loxodonta africana*). *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 25, 355.
- Frank, K.M., R.O. Lyda & J.F. Kirkpatrick. 2005. Immunocontraception of captive exotic species. IV. Species differences in response to the porcine zona pellucida vaccine and the timing of booster inoculations. *Zoo Biology* 24, 349–358.
 - Ganswindt, A., M. Heistermann, S. Borraran & J.K. Hodges 2002: Assessment of testicular endocrine function in captive African elephants by measurement of urinary and fecal androgens. *Zoo Biology* 21, 27–36.
 - Ganswindt, A., R. Palme, M. Heistermann, S. Borraran & J.K. Hodges 2003. Noninvasive assessment of adrenocortical function in male African elephant (*Loxodonta africana*) and its relation to musth. *General and Comparative Endocrinology* 134, 156–166.
 - Ganswindt, A., H.B. Rasmussen, M. Heistermann & J.K. Hodges 2005a. The sexually active states of free-ranging male African elephants (*Loxodonta africana*): defining musth and non-musth using endocrinology, physical signals, and behaviour. *Hormones and Behaviour* 47(1), 83–91.
 - Ganswindt, A., M. Heistermann & J.K. Hodges. 2005b. Physical, physiological and behavioural correlates of musth in captive African elephants (*Loxodonta africana*). *Physiological and Biochemical Zoology* 78(4), 505–514.
 - Hanks, J. 1972. Reproduction of elephant, *Loxodonta africana*, in the Luangwai Valley, Zambia. *Journal of Reproduction and Fertility* 30, 13–26.
 - Hollister-Smith, J.A. 2005. Reproductive behaviour in male African elephants (*Loxodonta africana*) and the role of musth: A genetic and experimental analysis. Ph.D. Thesis, Duke University, USA.
 - Hollister-Smith, J.A., J.H. Poole & E.A. Archie 2007. Age, musth and paternity success in wild male African elephants, *Loxodonta africana*. *Animal Behaviour* 74, 287–296.
 - Kirkpatrick, J.F., A. Perkins & J.W. Turner 1982. Reversible fertility control in feral horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 2, 114–118.
 - Kirkpatrick, J.F. & J.W. Turner 1991. Reversible fertility control in non-domestic animals. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22, 392–408.
 - Kirkpatrick, J.F. & A. Turner 2002. Reversibility of action and safety during pregnancy of immunizing against porcine zona pellucida in wild mares (*Equus caballus*). *Reproduction* (Suppl. 60), 197–202.

- Kirkpatrick J.F. & A. Turner 2003. Absence of effects from immunocontraception on seasonal birth patterns and foal survival among barrier island horses. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 6, 301–308.
- Kirkpatrick, J.F. & A. Turner 2007. Immunocontraception and increased longevity in equids. *Zoo Biology* 25, 1–8.
- Kirkpatrick, J.F., I.K.M. Liu & J. Turner 1990. Remotely delivered immunocontraception in feral horses. *Wildlife Society Bulletin* 18, 326–330.
- Kirkpatrick, J.F., I.K.M. Liu, J. Turner & M. Bernoco 1991. Antigen recognition in mares previously immunized with porcine zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility* (Suppl. 44), 321–325.
- Kirkpatrick, J.F., I.K.M. Liu, J.W. Turner, R. Naugle & R. Keiper 1992. Long-term effects of porcine zona pellucida immunocontraception on ovarian function of feral horses (*Equus caballus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 94, 437–444.
- Kirkpatrick, J.F., R. Naugle, I.K.M. Liu, M. Bernoco & J.W. Turner 1995a. Effects of seven consecutive years of porcine zona pellucida contraception on ovarian function in feral mares. *Biology of Reproduction Monograph Series 1, Equine Reproduction VI*, 411–418.
- Kirkpatrick, J.F., W. Zimmermann, L. Kolter, I.K.M. Liu & J.W. Turner 1995b. Immunocontraception of captive exotic species. I. Przewalski's horse (*Equus caballus*) and banteng (*Bos javanacus*). *Zoo Biology* 14, 403–413.
- Kirkpatrick, J. F., P.P. Calle, P. Kalk, I.K.M. Liu, M. Bernoco & J.W. Turner 1996. Immunocontraception of captive exotic species. II. Formosan sika deer (*Cervus nippon taiouanus*), Axis deer (*Cervus axis*), Himalayan tahr (*Hemitragus jemlahicus*), Roosevelt elk (*Cervus elaphus roosevelti*), Muntjac deer (*Muntiacus reevesi*), and Sambar deer (*Cervus unicolor*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 27, 482–495.
- Laws, R.M. 1969. Aspects of reproduction in the African elephant, *Loxodonta africana*. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 6, 193–217.
- Laws, R.M., I.S.C. Parker & R.C.B. Johnstone 1975. *Elephants and their habitats*. Clarendon Press, Oxford.
- Lee, V. & B.S. Dunbar 1992. Immunization of guinea pigs results in polycystic ovaries. *Biology of Reproduction* (Suppl. 46), 131 (abstract).
- Lee, P. 1997. Reproduction. In: G. Rogers & S. Watkinson (eds) *The illustrated encyclopedia of elephants*. Salamander Books Ltd., London, 64–77

- Liu, I.K.M., M. Bernoco, M. Feldman 1989. Contraception in mares heteroimmunized with pig zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility* 85, 19–29.
- McShea W.J., S.L. Monfort, S. Hakim, J.F. Kirkpatrick, I.K.M. Liu, J.W. Turner, L. Chassy & L. Munson 1997. Immunocontraceptive efficacy and the impact of contraception on the reproductive behaviors of white-tailed deer. *Journal of Wildlife Management* 61, 560–569.
- Miller, L.A., B.E. Johns & J. Killian 1999. Long-term effects of PZP immunization on reproduction in white-tailed deer. *Vaccine* 18, 568–574.
- Miller, L.A., J.C. Rhyan & M. Drew 2004. Contraception of bison by GnRH vaccine: a possible means of decreasing transmission of brucellosis in bison. *Journal of Wildlife Diseases* 40(4), 725–730.
- Moss, C.J. 1983. Oestrous behaviour and female choice in the African elephant. *Behavior* 86, 167–196.
- Moss, C. J. & Poole, J.H. 1983. Relationships and social structure of African elephants. In: R.A. Hinde, (ed), *Primate Social Relations: an Integrated Approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Moss, C. 1996. Getting to know a population. In: K. Kangwana (ed.) *Studying elephants*. African Wildlife Foundation, Kenya, 58–74.
- Owen-Smith, N. 1988. Megaherbivores. *The influence of very large body size on ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Palm, V.S., A.G. Sacco, F.N. Snyder & M.G. Subramanian 1979. Tissue specificity of porcine zona pellucida antigen(s) tested by radioimmunoassay. *Biology of Reproduction* 21, 709–713.
- Parker, G.E. & F.V. Osborn 2006. Growing chilli as a means of reducing human wildlife conflict in Zimbabwe. *Oryx*, in press.
- Poole, J.H. 1987. Rutting behavior in African elephants: The phenomenon of musth. *Behavior* 102, 283–316.
- Poole, J.H., K. Payne, W.R. Langbauer Jr. & C.J. Moss 1988. The social contexts of some very low frequency calls of African elephants. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 22, 385–392.
- Poole, H.H. & C.J. Moss 1989. Elephant mate searching: group dynamics and vocal and olfactory communication. In: *The Biology of Large African Mammals in Their*

Environment. P.A. Jewell and G.M.O. Maloiy (eds). Clarendon Press, Oxford, UK: pp. 111–125.

- Rasmussen, L.E.L. & B.A. Schulte 1998. Chemical signals in the reproduction of Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants. *Animal Reproduction Science* 53, 19–34.
- Rasmussen, L.E.L. & T.E. Perrin 1999. Physiological correlates of musth: lipid metabolites and chemical composition of exudates. *Physiology and Behavior* 67, 539–549.
- Rasmussen, L.E.L. & S.W. Riddle 2002. Meliferous matures to malodorous in musth. *Nature* 415, 975–976.
- Riddle, H.S., S.W. Riddle, L.E.L. Rasmussen, T.E. Goodwin 2000. First disclosure and preliminary investigation of a liquid released from the ears of African elephants. *Zoo Biology* 19, 475–480.
- Rutberg, A.T., R.E. Naugle, L.A. Thiele & I.K.M. Liu 2004. Effects of immunocontraception on a suburban population of white-tailed deer *Odocoileus virginianus*. *Biological Conservation* 116, 243–250.
- Schulte, B.A., E.W. Freeman, T.E. Goodwin, J. Hollister-Smith & L.E.L. Rasmussen 2007. Honest signalling through chemicals by elephants with applications for care and conservation. *Applied Animal Behavior Science* 102, 344–363.
- Stetter, M., D. Grobler, J.R. Zuba *et al.*, 2005. Laparoscopic reproductive sterilization as a method of population control in free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*). *Proceedings AAZV, AAWV, AZA Nutrition Advisory Group*, 199–200.
- Stetter, M., D. Hendrickson, J. Zuba *et al.* 2006. Laparoscopic vasectomy as a potential population control method in free ranging African elephants (*Loxodonta africana*). *Proceedings International Elephant Conservation and Research Symposium*, 177
- Turner, A. & J.F. Kirkpatrick. 2002. Effects of immunocontraception on population, longevity and body condition in wild mares (*Equus caballus*). *Reproduction* (Suppl. 60), 187–195.
- Turner, J.W., I.K.M., Liu, D.R. Flanagan, K.S. Bynum & A.T. Rutberg 2002. Porcine zona pellucida (pZP) immunocontraception of wild horses (*Equus caballus*) in Nevada: a 10 year study. *Reproduction Supplement* 60, 177–186.

- Turner, J.W., A.T. Rutberg, R.E. Naugle, M.A. Kaur, D.R. Flanagan, H.J. Bertschinger & I.K.M. Liu 2008. Controlled-release components of pZP contraceptive vaccine extend duration of infertility. *Wildlife Research*, 25:555–562.
- Van Rossum, R.J.W. 2006. PZP-immunocontraception in the African elephant (*Loxodonta africana*). Excellence track masters thesis, Utrecht University
- Whyte, I.J. & D.G. Grobler 1998. Elephant contraception in the Kruger National Park. *Pachyderm* 25, 45–52.
- Wittemyer, G., A. Ganswindt & K. Hodges 2007. The impact of ecological variability on the reproductive endocrinology of wild female African elephants. *Hormones and Behavior*. 51, 346–354.