

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DO USO DE ACETATO DE MELENGESTROL
(MGA) VIA ORAL EM FÊMEAS DE VEADO-CATINGUEIRO
(Mazama gouazoubira)

Lincy Liseth Camacho Orjuela
Médica Veterinária e Zootecnista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO USO DE ACETATO DE MELENGESTROL
(MGA) VIA ORAL EM FÊMEAS DE VEADO-CATINGUEIRO
(*Mazama gouazoubira*)**

Lincy Liseth Camacho Orjuela

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Reprodução Animal.

2016

Orjuela, Lincy Liseth Camacho
C172a Avaliação do uso de acetato de melengestrol (MGA) via oral em
fêmeas de veado – catingueiro (*Mazama gouazoubira*) / Lincy Liseth
Camacho Orjuela. – – Jaboticabal, 2016
x, 54 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: José Mauricio Barbanti Duarte
Banca examinadora: Joaquim Mansano Garcia, Eveline dos Santos
Zanetti
Bibliografia

1. Cervidae. 2. EIA. 3. Progestágeno oral. 4. Sincronização estral.
5. Veado cinza I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6639.111.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DO USO DO ACETATO DE MELENGESTROL VIA ORAL EM FÊMEAS DE VEADO-CATINGUEIRO (*Masama gouazoubira*)

AUTORA: LINCY LISETH CAMACHO ORJUELA

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Dra. EVELINE DOS SANTOS ZANETTI
Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal / Promissão/SP

Jaboticabal, 11 de julho de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LINCY LISETH CAMACHO ORJUELA- nascida em Bogotá, Colômbia, em 04 de Janeiro de 1992, filha de Juan Carlos Camacho Barreto e Doris Patricia Orjuela Carvajal. Graduada em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidade Cooperativa de Colômbia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. No ano 2013 integrou o Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, participando dos projetos de pesquisa, e onde iniciou sua pós-graduação no ano de 2014 com o trabalho intitulado “Avaliação do uso de acetato de melengestrol por via oral em fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)”.

“Os sonhos parecem ao começo impossíveis, depois improváveis, logo quando ficamos comprometidos...inevitáveis”

-Mahatma Gandhi

Dedico

Aos meus pais, **Juan** e **Doris**, a minha irmã, **Emily**, Pelo amor, carinho, apoio e incentivos diários nas horas mais difíceis.

&

A minha querida e amada avó, **Ana Elvia**, que deixou uma marca especial e indelével na minha vida.

Ofereço

Aos animais que participam de nossas pesquisas sem escolha, pelo bem da conservação, em especial, Pici, Bis, Brisa, Mariana, Sandra, cevada, pinga, Bill, e Sensato.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Juan e Doris, que sempre incentivaram meus sonhos, independentemente dos 4000 km que nos separam. Obrigada pelo apoio incondicional tanto emocional como financeiro, nada seria possível sem vocês, espero algum dia poder recompensá-los. Amo vocês.

A minha irmã, Emily pelo apoio, confiança, e pelos beliscos que recebeu por culpa das minhas brincadeiras com mamãe, Obrigada !!

A minha amada avó, um exemplo de que a mulher perfeita existe (trabalhadora, lutadora, guerreira, boa mãe e a melhor das avós, tudo isto estando sempre linda e impecável) você foi luz na minha vida, te levarei comigo até o final dos meus dias, Te amo.

Ao Manuel, pelo apoio em todas as etapas de meu mestrado, por me incentivar quando pensei em desistir por golpes que a vida dá, por se tornar o melhor companheiro e amigo que eu pudesse pedir, você é meu porto seguro e minha calma nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte, por me orientar e depositar confiança em mim para fazer parte da grande equipe do Nupecce. Pelo exemplo de dedicação e competência.

Ao João, Pelo apoio e força no laboratório.

Aos funcionários do setor de animais silvestres de Nupecce, Beterraba, Gessica, e Toninho pela ajuda e apoio durante meu projeto.

A Gaby, que além de se tornar minha grande companheira da reprodução se tornou grande amiga, obrigada pelo apoio e incentivo durante meu mestrado, pelas risadas nas horas de desespero, pelos conselhos, pelas grandes conversas profissionais e pelas que arrumavam nossas vidas!

A Lu, pelo apoio, pela amizade, as conversas, e as forças para não desistir de esta longa caminhada que é a vida acadêmica.

A Mar, pelas longas caminhadas, conversações, risadas, pelos planos na hora de almoço, e por se tornar a melhor das amigas, vou sentir saudades infinitas !

A David, Obrigada pela ajuda quando eu precisei.

A Eve, que sempre foi uma “coorientadora”, muito obrigada por me orientar quando as questões me afundaram.

Aos demais companheiros do Nupecce, Pici, Claudia, Duca, Iara, Aline, Jorge, Lorena, Carol, Louise, Marcio, Pedro, Douglas, Nathasha.

A meus amigos “amiwis”, que terminaram sendo família, sempre torcendo por mim, e me fazendo sentir um pouco mais perto de casa.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. Introdução e justificativa	1
2. Revisão da literatura.....	3
2.1 <i>Mazama gouazoubira</i>	3
2.2 Fisiologia reprodutiva de <i>Mazama gouazoubira</i>	5
2.3 Sincronização do ciclo estral.....	6
2.4 Acetato de melengestrol – MGA.....	9
2.5 Monitoramento endócrino não invasivo.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Animais.....	15
4.2 Período de estudo e local.....	18
4.3 Período de adaptação.....	19
4.4 Tratamento hormonal.....	20
4.5 Colheita e conservação das amostras.....	23

4.6	Processamento das amostras.....	24
4.6.1	Fezes.....	24
4.6.2	Urina.....	25
4.7	Dosagem hormonal de progestágenos	25
4.7.1	Validação das dosagens hormonais.....	25
4.7.2	Ensaio imunoenzimático (EIA).....	27
5.	ANALISE DE DADOS.....	28
6.	RESULTADOS.....	29
7.	DISCUSSÃO.....	38
8.	CONCLUSÃO.....	43
9.	REFÊRENCIA	44



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

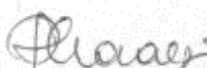


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 020951/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação do uso de acetato de Melengestrol (MGA) via oral em fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) por meio de dosagem hormonal**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de novembro de 2014.

Jaboticabal, 07 de novembro de 2014.


Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DO USO DE ACETATO DE MELENGESTROL POR VIA ORAL EM FÊMEAS DE VEADO-CATINGUEIRO (*MAZAMA GOUAZOUBIRA*)

RESUMO- A região neotropical passa por um período crítico em termos de perda da biodiversidade e as biotécnicas reprodutivas podem auxiliar na conservação de recursos neste processo. Entretanto, a aplicação dessas tecnologias para conservação de ungulados não-domésticos reúne muitas limitações, como o pouco conhecimento de sua fisiologia reprodutiva e a necessidade de manejo intensivo dos animais. O uso de protocolos menos invasivos para sincronização do ciclo estral pode trazer vantagens e torná-los aplicáveis a uma gama maior de situações práticas. Visando estabelecer protocolos hormonais não invasivos para realização desta biotécnicas, este trabalho teve por objetivo avaliar alguns aspectos do metabolismo do acetato de melengestrol (MGA) (Experimento 1), administrado pela via oral em fêmeas de veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*) por meio de dosagens dos progestágenos fecais e urinários, e avaliar o seu efeito na manipulação do ciclo estral (Experimento 2 e 3). Para o experimento 1, após a administração do fármaco em dose única as fezes e urina foram coletadas a cada 4 horas por 72 horas. Os resultados mostraram concentrações hormonais, em média, para o pré-tratamento para as fêmeas FMG1; FMG2; FMG3; FMG4; FMG5 em fezes foram respectivamente, de $606,15 \pm 291,10$; $313,96 \pm 95,25$; $628,94 \pm 382,04$; $295,11 \pm 95,15$; $454,53 \pm 140,88$, e para urina as medias foram $0,31 \pm 0,13$; $0,23 \pm 0,08$; $0,31 \pm 0,18$; $0,59 \pm 0,32$; $0,26 \pm 0,10$. As concentrações médias do pós-tratamento para as fêmeas FMG1; FMG2; FMG3; FMG4; FMG5 em fezes foram respectivamente, de $706,17 \pm 194,35$; $257,13 \pm 69,88$; $373,85 \pm 108,69$; $503,13 \pm 194,46$; $970,16 \pm 322,28$, e para urina $0,38 \pm 0,12$; $0,10 \pm 0,056$; $0,49 \pm 0,14$; $0,89 \pm 0,31$; $0,17 \pm 0,08$, respectivamente. Não foi evidente a ocorrência de picos nos perfis endócrinos após administração de MGA, no entanto foi possível visualizar um pequeno aumento dos níveis em 4 das 5 fêmeas, 16 a 24 horas após ingestão do fármaco. No experimento 2, o medicamento foi oferecido uma vez por dia durante 8 dias e no final do 8º dia foi realizada uma aplicação de cloprostenol sódico. As fêmeas tiveram estro monitorado, sendo possível observar estro comportamental em 3 das 6 fêmeas (50%), Já para o experimento 3, o medicamento foi administrado uma vez por dia durante 7 dias sendo que no final do 2º dia foi feita uma aplicação intramuscular de cloprostenol sódico, o estro foi monitorado duas vezes por dia. Três das 5 fêmeas (60%) apresentaram estro após aplicação do cloprostenol, mostrando a ineficiência do MGA, na dose testada, em inibir o crescimento folicular e ovulação após a luteólise.

Palavras Chave: Cervidae, EIA, progestágeno oral, sincronização estral, veado cinza.

EVALUATION THE USE OF ORAL MELENGESTROL ACETATE (MGA) IN FEMALESBROWN BROCKET DEER (*MAZAMA GOUAZOUBIRA*)

SUMMARY- The neotropical region is experiencing a critical period in terms of loss of biodiversity, and the development of new reproductive biotechnologies might assist to moderate this reality. However, the application of these technologies for non-domestic ungulates conservation presents important limitations, like the lack of knowledge of their reproductive physiology as well as the need for an intensive handling of the animals. The use of less invasive protocols for the oestrous cycle synchronization could be more advantageous and applicable in a wide variety of practical situations. Therefore, the establishment of new non-invasive hormonal protocols to performing this biotechnology is necessary. The aims of this study were, on the one hand, to assess some aspects of Melengestrol Acetate (MGA) metabolism (Experiment 1) administered orally in brocket deer females (*Mazama gouazoubira*) through the analysis of faecal and urinary progestagens. For the experiment 1, after the drug administration in a single dose, faeces and urine were collected every 4 hours for 72 hours. The faecal mean hormonal concentrations in the pre-treatment for the females FMG1; FMG2; FMG3; FMG4; FMG5 were $606,15 \pm 291,10$; $313,96 \pm 95,25$; $628,94 \pm 382,04$; $295,11 \pm 95,15$; $454,53 \pm 140,88$ respectively, and $0,31 \pm 0,13$; $0,23 \pm 0,08$; $0,31 \pm 0,18$; $0,59 \pm 0,32$; $0,26 \pm 0,10$ for urine. With regard to the post-treatment, the faecal mean hormonal concentrations for the females FMG1; FMG2; FMG3; FMG4; FMG5 were $706,17 \pm 194,35$; $257,13 \pm 69,88$; $373,85 \pm 108,69$; $503,13 \pm 194,46$; $970,16 \pm 322,28$ respectively, and $0,38 \pm 0,12$; $0,10 \pm 0,056$; $0,49 \pm 0,14$; $0,89 \pm 0,31$; $0,17 \pm 0,08$ for urine. I was not observed the presence of progestagens peaks in the endocrine profiles after the MGA administration; however, it was possible to visualize a small increase in its levels in 4 of the 5 females from 16 to 24 hours after the drug ingestion. In the experiment 2, the MGA was administered once a day for eight consecutive days, and on the last day, an application of Sodium Cloprostenol was performed. Females were monitored daily and an oestrus behavioural was observed in 3 of the 6 animals (50%). In the experiment 3, the MGA was administered once a day for seven consecutive days, and at the end of the second day, an intramuscular application of Sodium Cloprostenol was performed. Females were monitored twice daily and three of the five females (60%) showed an oestrus behavioural after the cloprostenol application showing the inefficiency of MGA on the initial tested dose to inhibit the follicular growth, anterior ovulation and luteolysis .

Keywords: Cervidae, EIA, oral progestogen, estrus synchronization, Brown Brocket Deer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Exemplar fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* (Foto: J.M.B.Duarte); (B) Distribuição geográfica desta espécie. (Fonte: IUCN 2016).....4
- Figura 2.** Estrutura química da Progesterona em comparação com a estrutura química MGA.....10
- Figura 3.** (A) Gaiola Metabólica utilizada para o experimento 1; (B) Exemplar de fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* na gaiola metabólica.....18
- Figura 4.** A) Visão lateral da gaiola metabólica utilizada no Exp. 1; B) Tubo coletor de urina acoplado na parte inferior da gaiola; C) Grade coletora de fezes.....19
- Figura 5.** Esquema representativo do tratamento hormonal do experimento 1 realizado em 5 fêmeas da espécie *M. gouazoubira*, dias em relação a administração de MGA.....20
- Figura 6.** Esquema representativo do tratamento hormonal do experimento 2, realizado em 6 fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*. Linha verde indica o monitoramento do ciclo estral realizado com machos férteis.....21
- Figura 7.** Esquema representativo do tratamento hormonal do experimento 3, realizado em 5 fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*. Linha verde indica o monitoramento do ciclo estral realizado com machos férteis.....22

- Figura 8.** A) Fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* em estro, permanecendo parada para a monta do macho. C) caixa de contenção para aplicação de fármacos. B) Aplicação intramuscular de análogo sintético da prostaglandina (PGF2 α - Ciosin®).....22
- Figura 9.** Esquema representativo do tratamento hormonal no experimento 1 e coletas de amostras em cinco fêmeas de *Mazama gouazoubira*, linha verde indica período de colheitas de fezes e urina 1 vez por dia, linha azul indica período de colheitas de fezes e urina de 4 em 4 horas, totalizando 96 horas.....23
- Figura 10.** A) Amostras de fezes secas sendo trituradas com martelo de borracha. B) 0,5g de amostra com 5ml de metanol ao 80%. C) Extratos fecais armazenados em tubos individuais identificados. D) Procedimento de dosagem por imunoenensaio.....24
- Figura 11.** Resultado de teste de paralelismo da dosagem de MGA com a disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada do pool.....26
- Figura 12.** Resultado de teste de paralelismo da dosagem de progestágenos urinários em *Mazama gouazoubira*, com a disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada do pool. A diluição escolhida foi 1:4 por se encontrar na parte mais estável da curva, próxima a 50% de ligação entre hormônio amostral e anticorpo no ensaio.....26
- Figura 13.** Resultado de teste de paralelismo da dosagem de progestágenos fecais em *Mazama gouazoubira*, com a disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada do pool. A diluição escolhida foi 1:128 por se encontrar na parte mais estável da curva, próxima a 50% de ligação entre hormônio amostral e anticorpo no ensaio.....27

- Figura 14.** Perfil dos metabólitos de progestágenos fecais e urinários em cinco fêmeas adultas de *M. gouazoubira*, antes da administração de MGA, setas pretas indicam as aplicações de cloprostenol sódico (PGF2 α) no dia -24 e -13 em relação ao dia 0 (administração de MGA). As concentrações fecais são expressas em ng /g de fezes, enquanto as concentrações urinárias são expressas em nanograma por miligrama de creatinina (ng/mg creatinina).....30
- Figura 15.** Perfis endócrinos das concentrações de progestágenos fecais de cinco fêmeas de *Mazama gouazoubira* 24 horas antes, durante e 72 horas, após da administração de MGA por via oral. Seta indica o momento da administração do acetato de melengestrol (0,00).....34
- Figura 16.** Perfis endócrinos das concentrações de progestágenos urinárias de cinco fêmeas de *Mazama gouazoubira* 24 horas antes, durante e 72 horas após da administração de MGA por via oral. Seta indica o momento da administração do acetato de melengestrol (0,00).....35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Identificação das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* utilizadas no experimento.....15
- Tabela 2.** Identificação das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* utilizadas no experimento16
- Tabela 3.** Identificação das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* utilizadas no experimento 3.....17
- Tabela 4.** Concentrações hormonais máximas pré-tratamento e pós-tratamento das cinco fêmeas usadas no experimento 1.....33
- Tabela 5.** Médias fecais hormonais dos dias tratamento é pós tratamento (1 dia antes e 3 dias após administração de MGA).....34
- Tabela 6.** Médias hormonais de urina dos dias tratamento é pós tratamento (1 dia antes e 3 dias após administração de MGA).....35
- Tabela 7.** Dados referentes ao momento de apresentação do estro comportamental o intervalo entre o fim do tratamento e o início do estro e duração do estro em seis fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*.....36
- Tabela 8.** Dados referentes ao momento de apresentação do estro comportamental o intervalo entre a aplicação de PGF₂ α e o início do estro e duração do estro em cinco fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*.....37

LISTA DE ABREVIATURAS

CIDR®	Controlled internal drug release
eCG	Gonadotrofina corionica equina
ECP	Cipionato de estradiol
EIA	ensaio imunoenzimatico
FGA	Acetato de fluorogestrona
GnRH	Hormonio liberador de gonadrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
LC	LEAST CONCERN= não sofre ameaça imediata
LH	Hormonio luteinizante
M. gouazoubira	<i>Mazama gouazoubira</i>
MGA	Acetato de melengestrol
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
PGF2α	Prostaglandina
Rpm	Rotações por minuto

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), pertencente à ordem Artiodactyla, família cervidae, é um animal de tamanho pequeno a médio, alcançando um peso em torno de 18 a 20 kg, de coloração variável, desde cinza escuro até marrom avermelhado (DUARTE, 1996). Pode ocupar uma variedade de habitats, desde o cerrado fechado até áreas usadas para agricultura. A distribuição da espécie vai desde a cordilheira dos Andes até o Oceano Atlântico e do sul do Uruguai até o norte do estado de Mato Grosso, ao sul da região amazônica (BLACK-DECIMA et al., 2010).

A espécie está classificada pela IUCN (2014) como "LC" ('least concern'- não sofre ameaçada imediata a sobrevivência) em relação à ameaça de extinção. No Brasil, a classificação de risco do *M. gouazoubira* varia entre regiões, sendo avaliada como vulnerável no Rio Grande do Sul, e ameaçada no Rio de Janeiro (TIOPOLO e TOMAS, 2006). As maiores ameaças da espécie são a caça ilegal em áreas protegidas, a perda de habitat (IUCN, 2014), a degradação da qualidade ambiental, doenças disseminadas por animais domésticos e isolamento genético (DUARTE et al., 2012).

A região neotropical passa por um período crítico em termos de perda de biodiversidade e a redução marcante das populações está incluída neste processo, causando perda da heterozigozidade, aumento da endogamia e, conseqüentemente, mudanças ambientais que tornam as espécies mais susceptíveis aos riscos de extinção (DUARTE, 2005).

As pesquisas realizadas nesta espécie são de grande importância pois favorecem, no futuro, sua aplicação em outras espécies, inclusive as ameaçadas, dando a opção de estabelecer um plano de manejo, prevenindo o decréscimo populacional e a perda da diversidade genética (DUARTE e GARCIA, 1997).

As biotecnologias da reprodução nos animais domésticos se encontram muito evoluídas e poderiam ser extrapoladas para a fauna selvagem (WILDT,1992), entretanto, enquanto não houver solidificação destes conhecimentos, uma opção é a utilização de espécies relacionadas como modelo fisiológico, que pode acelerar o desenvolvimento dos procedimentos para espécies ameaçadas (BAINBRIDGE e JABBOUR, 1998). Os conhecimentos sobre a manipulação do ciclo estral e da ovulação são de grande relevância para o sucesso da reprodução assistida (ASHER et al., 1992).

A sincronização do ciclo estral pode ser obtida basicamente pela administração de progestágenos, pela aplicação de prostaglandinas e seus análogos sintéticos ou pela combinação de ambos (HOSACKET et al., 1999; MORROW et al., 2000). O acetato de melengestrol (MGA) é um esteróide progestacional sintético de administração oral (SÁ FILHO et al. 2007) empregado principalmente para induzir e sincronizar o estro em vários ruminantes (BURKE e KEISLER, 1988).

A aplicação dessas tecnologias para conservação de ungulados não domésticos reúne muitas limitações, tanto pela falta de conhecimento das características reprodutivas, quanto por sua capacidade de gerar “stress”, que interfere na eficiência reprodutiva (COMIZZOLI et al., 2000; MORROW et al., 2009). Sendo assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a excreção fecal e renal do MGA administrado por via oral em fêmeas de veado catingueiro (*M.gouazoubira*) por meio de dosagens hormonais em fezes e urina, bem como testar seu uso para sincronização do ciclo estral nesta espécie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Mazama gouazoubira*

Com oito espécies atualmente reconhecidas, das 17 descritas na América Latina (IUCN, 2016), o Brasil é um dos países com maior diversidade em cervídeos (DUARTE, 2012), sendo eles: *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-pantanal), *Odocoileus virginianus* (veado-galheiro), *Ozotoceros bezoarticus* (veado-campeiro), *Mazama americana* (veado-mateiro), *Mazama nana* (veado-bororó), *Mazama bororo* (veado bororó-do sul), *Mazama nemorivaga* (veado-roxo), *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro). Pertencem a ordem Artiodactyla, Subordem Ruminantia, infra-ordem Pecora, superfamília Cervoidea, família Cervidae, subfamília Odocoileinae e tribo Odocoileini (DUARTE, 1996; REIS et al., 2010).

A espécie *Mazama gouazoubira*, também conhecido como veado-catingueiro é um cervídeo pequeno, com altura média de 50 cm e comprimento de 910 -1.034 centímetros, alcança um peso em torno de 18 kg, raramente excedendo os 20 kg (REDFORD e EISENBERG, 1992; DUARTE, 2012) (Figura 1A). A coloração da pelagem pode ser variável entre indivíduos, devido a variações ecológicas e regionais, indo desde marrom avermelhado nas formas de savana a cinza escuro nas florestas. A região ventral é de cor branca, similar a parte inferior da cauda, possui orelhas grandes e arredondadas com pêlos brancos, assim como tem uma pinta clara acima dos olhos, que pode estar presente na maioria dos indivíduos (DUARTE, 1996; PINDER e LEEUWERBERG, 1997; TIEPOLO e TOMAS, 2006; BLACK-DECIMA et al., 2010). A distribuição da espécie vai desde a cordilheira dos andes, ao sul do Uruguai até o norte do estado de Mato Grosso, ao sul da região amazônica (BLACK-DECIMA et al., 2010) (Figura 1B).

O veado-catingueiro pode-se encontrar em distintos ambientes que variam desde florestas densas até savanas abertas com pequenos locais de mata (capoeiras, bordas de mata e matas em regeneração inicial) (PINDER e LEEUWERBERG, 1997) e ainda é possível localiza-los em canaviais e plantios comerciais de eucalipto e pinheiro (RODRIGUES et al., 2014). Sua dieta é composta por alimentos ricos em proteína e de rápida liberação energética, sendo o consumo de brotos, folhas tenras,

flores e frutos a melhor opção. Estes fatores sugerem que esta é uma espécie com uma alta plasticidade para se adaptara vários ambientes, se beneficiando da remoção de floresta pela ocupação humana, permitindo seu avanço sobre áreas indisponíveis (PINDER e LEEUWENBERG, 1997; DUARTE, 2012).

Mazama gouazoubira é classificado pela IUCN em relação ao grau de ameaça como pouco preocupante, no entanto, esta classificação muda entre estados, sendo vulnerável (VU) no Rio Grande do Sul, e “em perigo” (EN) no Rio de Janeiro (MARQUES et al., 2002; TIOPOLLO e TOMAS, 2006). As maiores ameaças da espécie são a caça ilegal em áreas protegidas e a perda de habitat (IUCN, 2016), degradação da qualidade ambiental, doenças disseminadas por animais domésticos e isolamento genético (BEISIEGEL B et al., 2012)



Figura 1. (A) Exemplar fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* (Foto: J.M.B.Duarte); (B) Distribuição geográfica desta espécie. (Fonte: IUCN 2016).

2.2 Fisiologia reprodutiva de *Mazama gouazoubira*

Os cervídeos que habitam regiões de clima temperado são poliéstricos estacionais. Em contrapartida, a sazonalidade das espécies neotropicais não é bem definida (DUARTE e GARCIA, 1997). Com relação ao veado-catingueiro, poucas são as pesquisas científicas realizadas em vida livre (PINDER e LEEUWENBERG, 1997). De maneira geral, há poucos estudos sobre a reprodução em fêmeas de cervídeos neotropicais, sendo, na maioria dos casos, realizadas em cativeiro (PEREIRA et al., 2010).

A reprodução de *M.gouazoubira* é afetada pela disponibilidade alimentar e nutricional ao longo do ano, e a ausência de um período crítico de recursos alimentares possibilita a reprodução em todos os meses do ano, tanto nas savanas quanto nas florestas pluviais (PINDER e LEEUWENBERG, 1997)

As fêmeas de cervídeos alcançam a maturidade sexual em torno dos 18 meses, sendo esta idade sujeita a disponibilidade alimentar (PUTMAN, 1988). As informações sobre o ciclo reprodutivo da espécie são escassas, porém, em 1992, Muller e Duarte descreveram ciclos estrais de 21 dias em média por meio de citologia vaginal esfoliativa. Com base em estudos comportamentais Duarte e Garcia, (1995) descreveram a duração do ciclo estral entre 21 e 24 dias, em contrapartida Santos et al. (2001) observou ciclos de 18 a 30 dias (média $24 \pm 3,054$) com duração de estro entre 12 e 51,45 horas.

Pereira et al. (2006) unindo estudos comportamentais e dosagem hormonal, realizaram o monitoramento dos ciclos ovarianos e da gestação, indicando que a espécie tem ciclo estral com duração entre 21 a 37 ($26,9 \pm 1,7$) dias, divididos em um período de 23 a 26 ($24,6 \pm 1,4$) dias de fase luteínica (correspondente ao final da ovulação até a regressão do corpo lúteo- LOCATELLI e MERMILLOD, 2005) e 1,5 a 2 ($1,7 \pm 0,1$) dias de fase folicular (correspondente ao final do recrutamento e ovulação – LOCATELLI e MERMILLOD, 2005). O período de gestação variou entre 208 a 215 dias, com presença de um estro pós-parto (PEREIRA et al., 2006).

Assim como em outras espécies de cervídeos, o veado-catingueiro é uma espécie unípara (PINDER e LEEUWERBERG, 1997; TOMAS et al., 2010), apesar da ocorrência de gêmeos ter sido descrita por Sandleir (1987) e Whitehead (1993). Os filhotes nascem com pintas brancas ao longo do corpo no dorso e nas laterais (DUARTE e MERINO, 1997)

2.3 Sincronização do ciclo estral

A sincronização de estro consiste na manipulação do ciclo estral, que pode ser obtida basicamente de forma natural ou por manipulação farmacológica pela administração de progestágenos, prostaglandinas ou seus análogos sintéticos ou pela combinação de ambos (HOSACK et al., 1999; MORROW et al., 2000; AX et al., 2003; MORAES et al., 2008).

Os hormônios usados nos protocolos vão desencadear uma série de modificações no eixo endócrino do controle do ciclo estral, podendo encurtar ou prolongar a fase lútea do ciclo ou alterar o padrão anual de reprodução, no caso de animais que possuem sazonalidade (OLIVEIRA et al., 2013). No caso das prostaglandinas, sua aplicabilidade é dependente da existência de um corpo lúteo funcional, e fica condicionado a um minucioso controle do dia do estro ou de duas aplicações sequenciais. Já os progestágenos e a progesterona associados tradicionalmente com as gonadotrofinas são os produtos de eleição para os períodos de anestro (MORAES et al., 2008).

A progesterona natural e seus análogos sintéticos, são os principais hormônios usados na sincronização do estro em uma ampla variedade de espécies. Os progestágenos são substâncias de meia-vida curta e eliminação rápida. O tratamento com progestágenos permite controlar o momento de aparecimento do estro, por meio de um mecanismo de bloqueio, impedindo o desenvolvimento folicular a estágios pré-ovulatórios e, subsequentemente, a ovulação. Isto acontece graças à ação inibitória sobre a secreção pulsátil do GnRH e, ao final do tratamento, é seguido pelo desbloqueio da resposta hipofisária e da pulsatilidade da secreção de GnRH e LH, que retornam ao normal, estimulando o crescimento folicular final, a manifestação do estro e posteriormente a ovulação.

Os tratamentos são realizados pelo uso de dispositivos intravaginais Controlled internal drug release (CIDR®) e implantes auriculares subcutâneos (“CRESTAR®”) que contem progesterona ou seus análogos sintéticos (norgestomet; acetato de medroxiprogesterona – MAP; acetato de fluorogesterona-FGA; Acetato de Melengestrol MGA), injetados por via intramuscular ou introduzidos em forma de esponja vaginal. Os progestágenos também podem ser administrados pela via oral (AX et al., 2003; MORAES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

Tradicionalmente, os progestágenos são aplicados por longos períodos, se assemelhando à duração de um corpo lúteo cíclico. Estes protocolos podem ser eficientes na sincronização do estro, com variações nas taxas de prenhez (OLIVEIRA et al., 2013). Os longos períodos de suplementação com progestágenos podem induzir de maneira indesejada concentrações baixas de progesterona no final do tratamento, contribuindo para baixas taxas de fertilidade (MORAES et al., 2008). Isto pode ocorrer devido à o prolongamento da vida do folículo antral pela exposição da fonte de progesterona, ou pela formação de um corpo lúteo anormal, consequência de um rápido desenvolvimento folicular e a ovulação prematura de folículos sem células da granulosa o suficientemente maduras para realizar uma luteinização em resposta da oleada de LH (STUBBINGS et al., 1986; BAIRD, 1992).

MORROW et al. (1995) estudaram a duração do tratamento, incidência do estro, sincronização do estro, ovulação e fertilidade depois do uso de um dispositivo intravaginal de progesterona em *Dama dama*. Os dispositivos foram utilizados por um período longo de 17 a 20 dias, acompanhados com prostaglandina 48 horas depois da inserção, tendo como resultado altos percentuais de animais em estro (94% a 100%), mas com baixa taxa de fertilidade (44% a 60%).

Outros trabalhos já foram relatados em *Cervus elaphus* (ASHER et al., 1992; ARGO et al., 1994; ASHER et al., 1995; ASHER et al., 2000; SOLER et al., 2007), *Dama dama* (MORROW et al., 1994) e *Cervus nippon hortulorum* (CHEN et al., 2015). Da mesma forma, o uso do dispositivo intravaginal “CIDR”, para realizar manipulação do ciclo estral encontra-se bem documentado em espécies neotropicais, como *Mazama americana* (CURSINO, 2014), *Blastocerus dichotomus* (J.M.B.DUARTE,

Comum. pessoal), e finalmente para *M. gouazoubira* (ZANETTI et al., 2010; ZANETTI e DUARTE, 2012; ZANETTI et al., 2014; ROLA, 2013; PERONI, 2013)

Outros métodos de sincronização com o uso de progestágenos tem sido utilizados. Duarte e Garcia (1995) utilizaram, com sucesso em *M. gouazoubira*, esponjas de fabricação caseira, contendo 50 mg de acetato de medroxiprogesterona, durante 14 dias, sendo trocadas no sétimo dia, com apresentação de estro 2 a 3 dias após da retirada da esponja.

O uso de implantes subcutâneos de progestágeno (“CRESTAR®”) tem sido amplamente relatado em distintas espécies de cervídeos: *Axis axis* (UMAPATHY et al., 2007), *Cervus nippon* (WILLARD et al., 1996), *Odocoileus virginianus* (WILLARD et al., 2002), *Cervus elaphus* (ASHER et al., 1993).

Como apresentado, todos estes métodos necessitam de contenção física ou química para aplicação de injeções ou implantação de dispositivos, o que afeta diretamente a fisiologia endócrina destes animais, bem como gera um risco de acidentes. Além disso, os dispositivos intravaginais podem levar a processos inflamatórios leves até vaginite, acumulação de fluidos como secreções purulentas e aumento da flora bacteriana, assim como pode ocorrer uma taxa de perda dos dispositivos. Em resumo todos estes fatores reduzem a eficiência da manipulação do ciclo estral (AINSWORTH e SHRESTHA, 1983; SUAREZ et al., 2006; MARTINS et al., 2009; MARTINS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013)

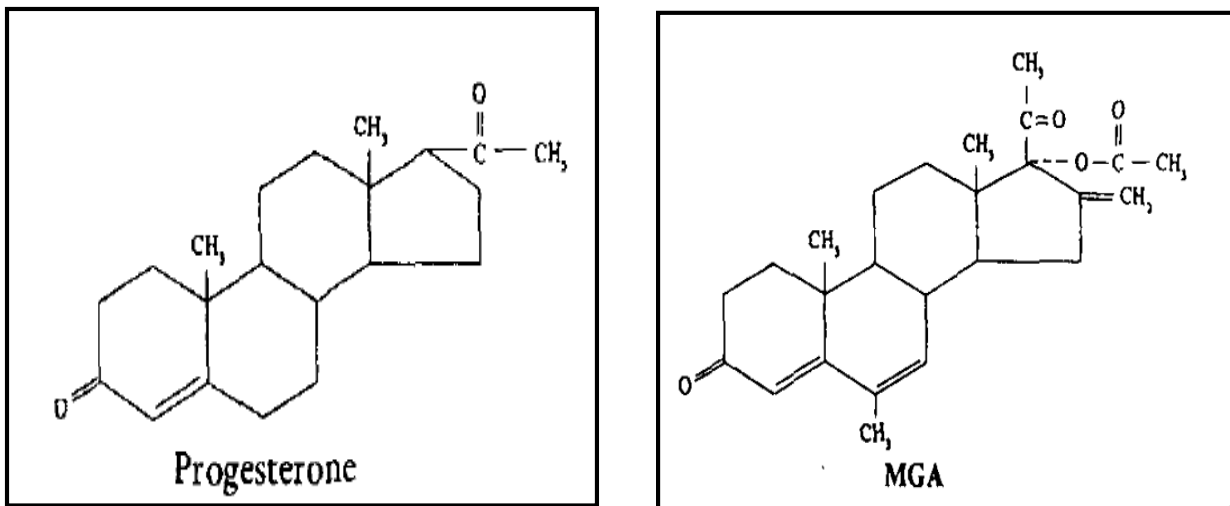
Pela resposta explosiva dos cervídeos aos estímulos estressantes, o uso de uma medicação oral poderia facilitar sobremaneira o manejo reprodutivo e a aplicação de técnicas de reprodução assistida em populações cativas. Entretanto, não há relatos do uso do MGA oral em cervídeos, apesar desse uso ser comum em pequenos ruminantes domésticos.

2.4 Acetato de melengestrol – MGA

Atualmente encontra-se no mercado progestágenos naturais e sintéticos, os naturais são derivados unicamente de organismos vivos (humanos e animais) sendo neste caso progesterona, por outro lado os progestágenos sintéticos podem ser extraídos ou preparados por meio dos esteroides vegetais através de múltiplas reações químicas (STANCZYK, 2003)

Os progestágenos se dividem de acordo a sua estrutura química, de acordo a presença (Pregnanos) ou ausência (Norpregnanos) do grupo químico metila no carbono 10. Os pregnanos estão divididos em grupo acetato e sem acetato e os acetatos incluem, o acetato de medroxiprogesterona (MPA), o acetato de melengestrol (MGA), o acetato de clormadinona, e o acetato de ciproterona (STANCZYK, 2003).

O MGA é um potente esteróide progestacional sintético de administração oral (6-methyl- 17-alpha-acetoxy-16-methylene-pregn-4,6-diene-3,20-dione) elaborado em 1962, caracterizado como um análogo do acetato de medroxiprogesterona (MPA), MGA é 300 a 900 vezes mais potente por via oral em comparação com MPA em bovinos e 150 vezes em ovinos (ZIMBELMAN e SMITH, 1963; PATTERSON et al., 1989; SÁ FILHO et al., 2007) (Figura 2). MGA é relativamente bem absorvido e não facilmente degradado pela flora rumenal (ZIMBELMAN e SMITH, 1966), sendo empregado principalmente para induzir o estro e o acasalamento fértil em ovelhas e vacas em anestro estacional (BURKE e KEISLER, 1988). O MGA é absorvido rapidamente no trato gastrointestinal e completamente metabolizado no fígado, a principal via de eliminação de este fármaco é renal (FEMIA e GOYETTE, 2005).



Pregn-4-ene-3,20-dione

6-methyl-17-alpha-acetoxy-16-methylene-pregn-4, 6-diene-3, 20-dione

Figura 2. Estrutura química da Progesterona em comparação com a estrutura química do MGA.

O MGA é utilizado conjuntamente com outros agentes, como implantes de estradiol, cipionato de estradiol (ECP), hormônio luteinizante (LH), gonadotrofina coriônica humana (hCG), gonadotrofina coriônica equina (eCG) ou ocitocina (PATTERSON et al., 1989). As associações hormonais utilizadas na sincronização de estro com progestágenos tem o objetivo de induzir luteólise, sincronizar as ondas foliculares e também, de alguma maneira, promover um grau de sincronização nas ovulações (MORAES et al., 2008).

Com a finalidade de realizar sincronização estral em borregas, Quispe (1995), avaliou uma dose ótima, de um tratamento curto a base de MGA (0.22 mg/animal/dia e 0.11 mg/animal/dia durante nove dias) em combinação com 0.5 mg de cipionato de estradiol (ECP®) no começo do tratamento para provocar a regressão do corpo lúteo. Durante os seis primeiros dias pós-tratamento a apresentação de estros foi maior nos grupos que receberam 0.22mg (90%) e 0.11 mg (67%) de MGA do que nos tratamentos combinados com cipionato de estradiol; MGA 0.22mg+ECP (74%), MGA 0.11mg + ECP (65%). As fêmeas foram inseminadas com sêmen fresco 12 horas após do início do estro. As porcentagens de concepção ao primeiro serviço foram: MGA 0.22mg+ECP (22%); MGA 0.11mg + ECP (15%); MGA 0.22mg (53%); MGA 0.11 mg (65%).

Safranskiet al., (1992) determinaram a eficiência de MGA (0.125 mg em 0.5 kg em farinha de trigo 2 vezes dia durante nove dias) em combinação com PG-600® (400 UI de eCG e 200 UI de hCG em 5 mL de solução salina) em ovelhas. Houve cópula em 55,2% dos animais que receberam somente MGA e 69,8% nos que receberam MGA + PG600.

Zimbelman e Smith, (1966) trataram novilhas holandesas durante a estação reprodutiva com MGA durante 15 a 18 dias, começando no dia 15 do ciclo estral, empregando doses orais diárias entre 0,25 mg até 8 mg. Como resultado, todas as doses, induziram a inibição do estro e ovulação, as doses menores suprimiram a incidência do estro, no entanto a inibição da ovulação não foi uniforme. As taxas de concepção foram visivelmente variáveis entre as doses sendo 25%, 88% e 42% para todos os tratamentos na primeira inseminação, a porcentagem de concepção na segunda inseminação foi de 82%.

Um grande número de trabalhos cita o uso de MGA em protocolos de sincronização em bovinos (PATTERSON et al., 1989; COLEMAN et al., 1990; KOJIMA et al., 2000; WOOD et al., 2001; IMWALLE et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002; JOHNSON e DAY, 2004); e em ovelhas (QUISPE et al., 1995; JABAR et al., 1994; POWELL et al., 1996; MORRICAL et al., 1997; KEEFE e WICHTEL, 2000), contudo o MGA ainda não foi testado para sincronização do estro indução de estro em cervídeos. Entretanto, a maioria dos trabalhos citam seu uso como um eficaz anticoncepcional (BELL e PETERLE, 1975; ROUGHTON, 1979; PLOKTA e SEAL, 1989; RAPHAEL et al., 2003) em 1975 Bell e Peterle usaram implantes subdermicos de MGA na extremidade direita anterior de fêmeas de vida livre de *Odocoileus virginianus* com diferentes idades, MGA foi usado em concentrações de 0, 50, 100, e 150 mg, após a inserção do implante os animais foram deixados em liberdade e acompanhados durante dois 2 anos, as concentrações de 100 e 150 mg mostraram melhores resultados diminuindo significativamente a taxa de reprodução, concluindo MGA é efetivo como anticoncepcional se for implantado antes da concepção.

Da mesma forma Plotka e Seal (1989) reportaram seu uso, por meio de implantes subdérmicos no pescoço com uma concentração de 800mg em fêmeas de *Odocoileus*

virginianus borealis que se encontravam em anestro, avaliando a eficácia de MGA como anticoncepcional por um período de 2 anos. Além disso, em um grupo composto por 5 fêmeas gestantes, o implante foi inserido na metade da gestação, avaliando, desta forma, seus efeitos na gestação, parto, aleitamento. Finalmente, MGA mostrou resultados aceitáveis como anticoncepcional, não havendo gestação em nenhuma das fêmeas. Os resultados em fêmeas gestantes revelaram que o MGA não interrompe a prenhez, no entanto atrasa ou impede o parto normal, sendo necessária a aplicação de estrógeno para a indução do parto.

2.5 Monitoramento endócrino não invasivo

A reprodução e a atividade adrenal estão profundamente ligadas a flutuação hormonal e o conhecimento destes processos auxilia o sucesso no manejo de populações de animais selvagens *in situ* ou *ex situ*. A obtenção dos parâmetros fisiológicos e flutuações hormonais em um indivíduo podem ser obtidas por meio da quantificação de hormônios circulantes no sangue, e por quantificação de hormônios e metabólitos hormonais excretados na urina, fezes, saliva, suor e pêlos, sendo estes últimos métodos indiretos (BAMBERG et al., 1991; MICHELETTE et al., 2014).

As repetidas capturas para obtenção de amostras são pouco práticas para o monitoramento do estado reprodutivo das espécies selvagens, podendo ser altamente estressante e impraticável pela necessidade de contenção física ou anestesia, podendo este último alterar a secreção hormonal. Evidentemente o monitoramento da ciclicidade ovariana e prenhez precisam de repetidos períodos de coleta. Assim, os métodos não invasivos provam sua importância e facilidade no manejo de espécies ameaçadas em cativeiro ou vida livre, tendo pouca influência de stress (MONFORT et al., 1993; MICHELETTE et al., 2014)

O monitoramento endócrino não invasivo é prático para a caracterização da excreção de esteroides ovarianos (MORROW et al., 1998). A quantificação dos principais hormônios reprodutivos em fêmeas (Progesterona/Estrógeno) fornecem dados que podem esclarecer a duração do ciclo estral, níveis basais concentrações máximas, ausência ou existência de sazonalidade reprodutiva, e até constatar prenhez. Fontes não- invasivas como saliva, pêlo, urina, fezes permitem a obtenção

destas informações. Urina e fezes evidenciam grande número de vantagens, entre elas praticidade das colheitas, fácil manipulação, conservação e transporte de amostras. Diferentemente de sangue, que apresenta uma concentração instantânea dos hormônios, fezes e urina oferecem um pool de concentração hormonal, que pode refletir a média da flutuação hormonal de 12 a 48 horas, aproximadamente, sem interferência de fatores imediatos como o ritmo diário ou alguma situação que gere um estresse agudo. Isso se deve ao fato de que esteróides são metabolizados pelo fígado e excretados pela urina e bÍlis, atingindo as fezes. Durante o trânsito intestinal os metabolitos de esteróides podem ser reabsorvidos dentro da circulação entero-hepática (LASLEY e KIKPATRICK, 1991; KORNDÖRFER, 1996; SCHAWARZENBERGER et al., 1996; SCHAWARZENBERGER, 2007^a; SCHAWARZENBERGER, 2007^b; MICHELETTE et al., 2014).

Exemplificando a aplicabilidade do monitoramento hormonal não invasivo, vários estudos de fisiologia vêm sendo realizados com sucesso em muitas espécies selvagens. Entre os animais que já foram objetos de estudo estão primatas como *Pan troglodytes* (EMERY e WHITTEN, 2003) e *Macaca fascicularis* (ENGELHARDT et al., 2007), em marsupiais como *Dasyurus geoffroii* (STEAD- RICHARDSON et al., 2001) e *Macropus eugenii* (MCKENZIE e DEANE, 2005), em baleias como *Eubalaena glacialis* (ROLLAND et al., 2005; HUNT et al., 2006), bem como em cervídeos neotropicais a exemplo de *M. gouazoubira* (SOUZA, 2003; PEREIRA, 2006; ZANETTI et al., 2014; PERONI, 2013; MARTINS, 2015), *M. americana* (CURSINO, 2014), *B. dichotomus* (POLEGATO et al., 2008) e *O. bezoarticus* (PEREIRA et al, 2005; CHRISTOFOLETTI et al, 2010).

De forma geral, o monitoramento hormonal por estas fontes, além de não ser invasivo, permite a realização de estudos onde são necessários longos períodos de colheitas para acompanhamento endócrino. Devido a isso, a utilização destes métodos de monitoração são apropriadas para cervídeos, uma vez que são animais altamente susceptíveis ao estresse (CHRISTOFOLETTI, 2010).

3. OBJETIVOS

- Avaliar a excreção fecal e renal do MGA administrado por via oral em veado-catingueiro por meio de dosagem hormonal de progestágenos fecais e urinários.
- Avaliar a possibilidade do uso do MGA administrado oralmente como fonte exógena de um análogo de progesterona em veado-catingueiro para manipulação do ciclo estral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram desenvolvidos 3 (três) experimentos. O experimento 1 teve como base o monitoramento endócrino não invasivo (dosagem hormonal), enquanto o experimento 2 e 3 se basearam no monitoramento comportamental. Os experimentos descritos anteriormente não levaram em consideração as estações do ano, pois *M. gouazoubira* não apresenta sazonalidade reprodutiva (PEREIRA et al., 2006)

4.1 Animais

Experimento 1

Para a realização deste estudo foram utilizadas cinco fêmeas adultas entre 5 (cinco) e 9 (nove) anos de idade, com diferentes status reprodutivos (nulíparas a multíparas) da espécie *M. gouazoubira* (Veado-catingueiro). Todos os animais pertencem ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), do departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal.

Tabela 1. Identificação das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* utilizadas no experimento 1.

ANIMAL	IDADE	PESO (KG)	HISTÓRICO REPRODUTIVO
FMG1	6 (15/08/2009)	16,95	MULTÍPARA
FMG2	5 (07/04/2011)	13,60	NULÍPARA
FMG3	6 (04/2010)	17,95	MULTÍPARA
FMG4	9 (27/12/2006)	17,20	MULTÍPARA
FMG5	9 (25/11/2006)	23,15	NULÍPARA

Experimento 2

Para a realização do experimento 2 foram utilizadas 6 (seis) fêmeas da espécie *M. gouazoubira*. Todas as fêmeas eram adultas entre os 2 (dois) e 9 (nove) anos de idade, com diferentes estados reprodutivos (nulíparas a multíparas). Também foram utilizados 2 (dois) machos férteis da mesma espécie, com idade entre 3 a 6 anos. Todos os animais pertencem ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), do departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal.

Tabela 2. Identificação das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* utilizadas no experimento 2.

ANIMAL	IDADE	PESO (Kg)	HISTÓRICO REPRODUTIVO
FMG1	6 (15/08/2009)	16,95	MULTÍPARA
FMG2	5 (07/04/2011)	13,60	NULÍPARA
FMG3	6 (04/2010)	17,95	MULTÍPARA
FMG5	9 (25/11/2006)	23,15	NULÍPARA
FMG6	2 (28/05/14)	12,95	NULÍPARA
FMG7	3 (02/07/2013)	14,50	NULÍPARA

Experimento 3

Para a realização do experimento 3 foram utilizadas 5 fêmeas da espécie *M. gouazoubira*. Todas as fêmeas eram adultas entre 2 e 9 (nove) anos de idade, com diferentes estados reprodutivos (nulíparas a multíparas). Também foram utilizados 2 (dois) machos férteis da mesma espécie, com idade entre 3 a 6 anos. Todos os animais pertencem ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), do departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal.

Tabela 3. Identificação das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* utilizadas no experimento 3.

ANIMAL	IDADE	PESO (Kg)	HISTÓRICO REPRODUTIVO
FMG1	6 (15/08/2009)	16,95	MULTÍPARA
FMG3	6 (04/2010)	17,95	MULTÍPARA
FMG5	9 (25/11/2006)	23,15	NULÍPARA
FMG6	2 (28/05/14)	12,95	NULÍPARA
FMG7	3 (02/07/2013)	14,50	NULÍ PARA

4.2 Período e local de estudo

Experimento 1

Durante o período experimental de fevereiro a agosto de 2015, os animais foram mantidos (por 35 dias) em gaiola metabólica de 2,0x1,0m (Figuras 3 e 4) para colheitas das amostras, de urina e fezes. Os animais receberam uma dieta composta por alimentos concentrados para equinos (Corcel[®]) fornecida diariamente pela manhã, e alimento volumoso: soja perene (*Neonotomia wighti*), rami (*Bohemia livia*) ou ramos de amoreira (*Morus alba*), de acordo com sua disponibilidade no campo, numa quantidade média 1kg/animal/dia, no final da tarde (sempre molhados, com finalidade de mantê-los por mais tempo aceitáveis pelos animais). Água foi fornecida *ad libitum*.

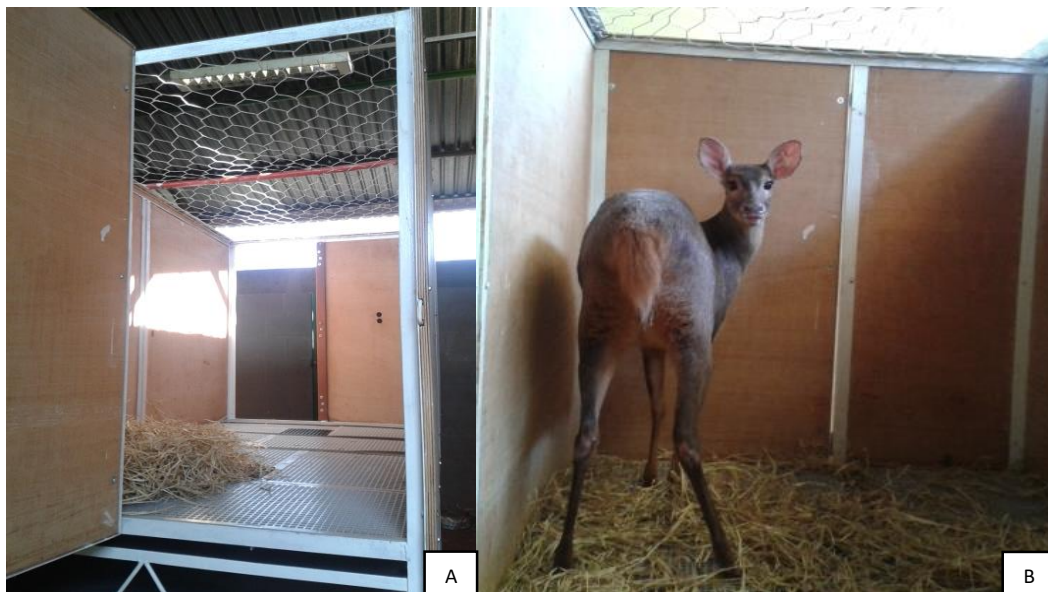


Figura 3. (A) Gaiola Metabólica utilizada para o experimento 1; (B) Exemplar de fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* na gaiola metabólica.

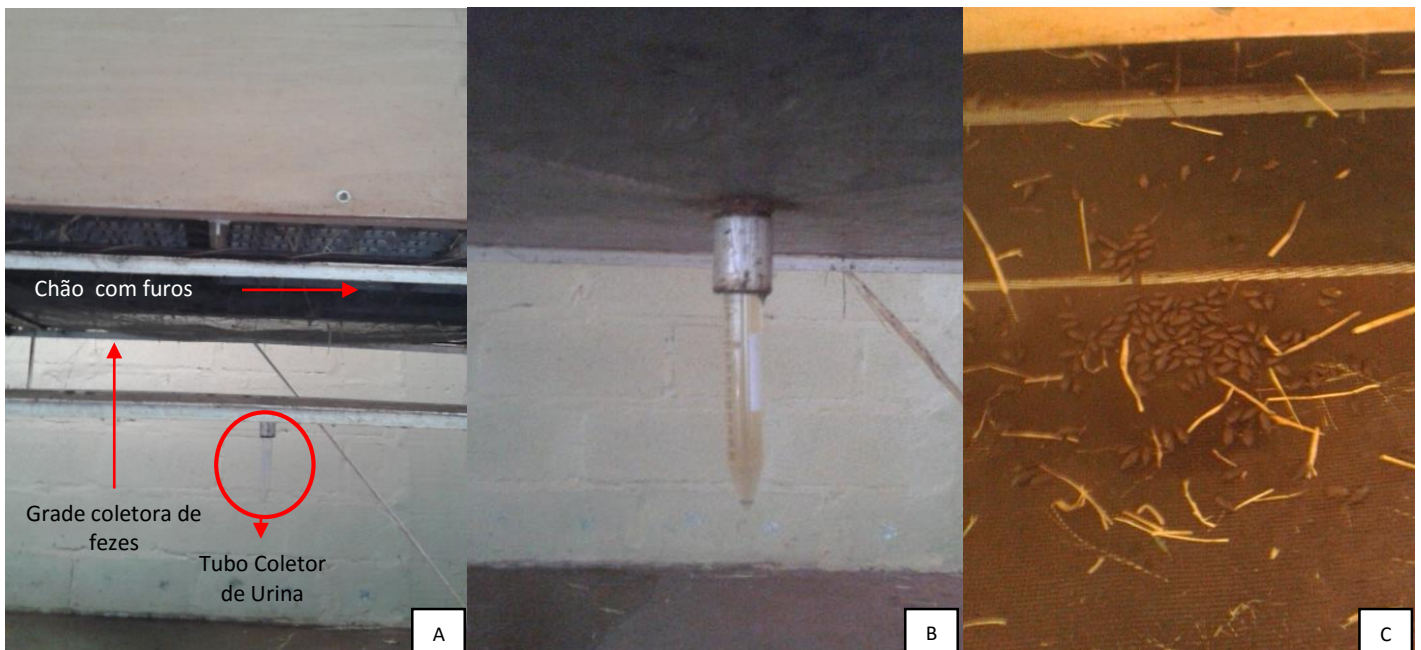


Figura 4. A) Visão lateral da gaiola metabólica utilizada no Exp. 1; B) Tubo coletor de urina acoplado na parte inferior da gaiola; C) Grade coletora de fezes.

Experimentos 2 e 3

No mês de maio de 2016 (experimento 2) e julho de 2016 (experimento 3), os animais foram mantidos em baias individuais (3,0m x 2,0m), mantendo contato auditivo e olfativo, e foram expostos a variação natural de luminosidade. Receberam dieta composta por alimentos concentrados utilizados para eqüinos (Corcel®), fornecida diariamente pela manhã e alimento volumoso: soja perene (*Neonotomia wightii*), rami (*Bohemia livia*) ou ramos de amoreira (*Morus alba*), que foram fornecidos de acordo com a sua disponibilidade no campo, numa quantidade média de 1Kg/animal/dia, no final da tarde (sempre molhados, com finalidade de mantê-los por mais tempo aceitáveis pelos animais). Água foi oferecida *ad libitum*.

4.3 Período de adaptação

Experimento 1

Para o manejo dos animais na gaiola metabólica, foi realizado um período de adaptação de 8 dias antes do início do experimento para que se acostumassem com o manejo nessa estrutura.

4.4 Tratamento Hormonal

Experimento 1

Após o período de adaptação, os animais receberam duas doses intramusculares (por meio de uma caixa de contenção) de um análogo da prostaglandina, cloprostenol sódico (PGF2 α 265 μ gCiosin® - Shering Plough Coopers®- Brasil) com intervalo de 11 dias (dia 0 ao dia 11) afim de causar regressão lútea, sincronizando os animais que estivessem ciclando. Posteriormente, no dia 0 (em relação a administração de MGA), os animais receberam uma única dose de 0,25 mg (dose indicada para ovinos, segundo a recomendação do fabricante) de acetato de Melengestrol (MGA® Premix - Pfizer - Brasil) por meio de uma fatia de banana, que é um dos alimentos mais palatáveis para estes animais. A escolha desta fase do ciclo (meio da fase luteínica) deve-se ao fato de ser a fase com menores flutuações da progesterona endógena, possibilitando a visualização do pico e a queda dos metabólitos da progesterona exógena (Figura 5)

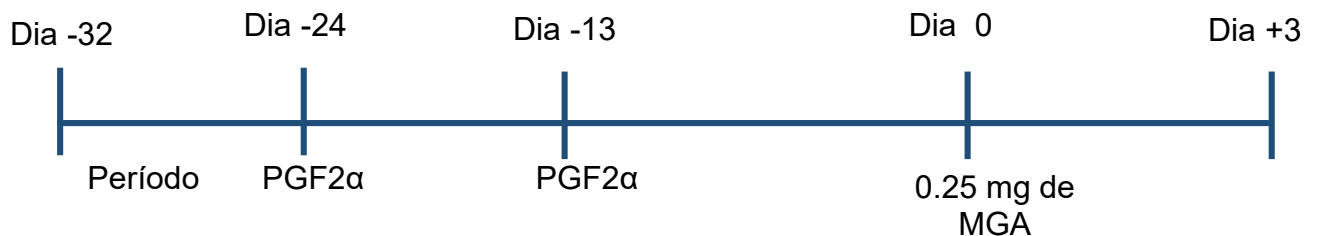


Figura 5. Esquema representativo do tratamento hormonal do experimento 1 realizado em 5 fêmeas da espécie *M. gouazoubira*, dias em relação a administração de MGA.

Experimento 2

Os animais receberam uma dose diária de Acetato de melengestrol (MGA® Premix - Pfizer - Brasil), 0,25mg/animal/dia durante 8 (oito) dias consecutivos por meio de uma fatia de banana, que é um dos alimentos mais palatáveis para estes animais. No final da tarde do dia 8 (oito) foi realizada uma aplicação intramuscular de PGF2 α (265 μ g de cloprostenol sódico- Ciosin® - Shering Plough Coopers®- Brasil) afim de

causar luteólise, caso houvesse presença de um corpo lúteo (Figura 6). O estro das fêmeas foi monitorado duas vezes por dia utilizando um dos dois machos, sendo o casal alocado em uma mesma baia. A fêmea foi considerada em estro quando permitia a monta, permanecendo em estação (PEREIRA et al., 2006; ZANETTI et al., 2014) (Figura 8). O monitoramento do estro dos animais foi iniciado no dia anterior a primeira administração do MGA e terminou cinco dias após o fim do tratamento com MGA.

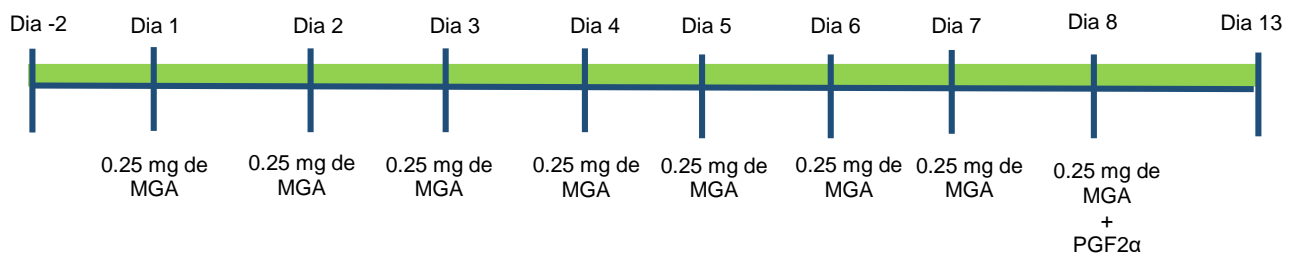


Figura 6. Esquema representativo do tratamento hormonal do experimento 2, realizado em 6 fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*. Linha verde indica o monitoramento do ciclo estral realizado com machos férteis.

Experimento 3

Os animais receberam uma dose diária de Acetato de melengestrol (MGA® Premix - Pfizer - Brasil), 0,25 mg/animal/dia durante 7 (sete) dias consecutivos por meio de uma fatia de banana, que é um dos alimentos mais palatáveis para estes animais. No final da tarde do dia 2 (dois) foi realizada uma aplicação intramuscular de PGF2α (265µg de cloprostenol sódico- Ciosin® - Shering Plough Coopers®- Brasil) a fim de causar luteólise, caso houvesse presença de um corpo lúteo, assim seria possível visualizar a eficácia do MGA para inibição do estro e ovulação (Figura 7). O estro das fêmeas foi monitorado duas vezes por dia utilizando um dos dois machos, sendo o casal alocado em uma mesma baia. A fêmea foi considerada em estro quando permitia a monta, permanecendo em estação (PEREIRA et al., 2006; ZANETTI et al., 2014) (Figura 8). O monitoramento do estro dos animais foi iniciado no dia primeiro dia da administração do MGA e terminou após o fim do tratamento com MGA.

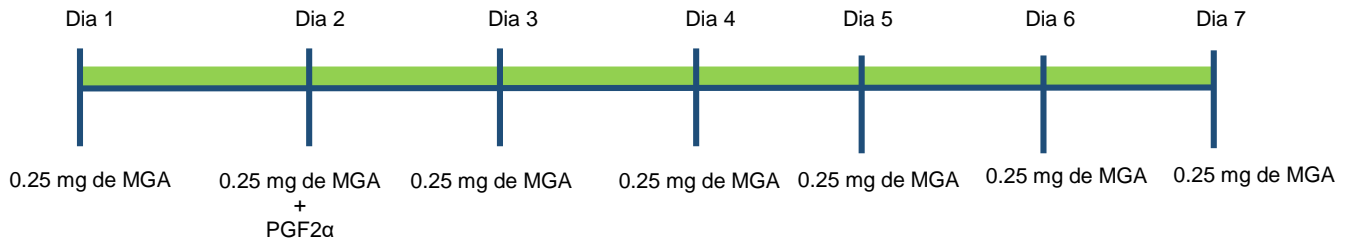


Figura 7. Esquema representativo do tratamento hormonal do experimento 3, realizado em 5 fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*. Linha verde indica o monitoramento do ciclo estral realizado com machos férteis.



Figura 8. A) Fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* em estro, permanecendo parada para a monta do macho. C) caixa de contenção para aplicação de fármacos. B) Aplicação intramuscular de análogo sintético da prostaglandina (PGF2 α - Ciosin®)

4.5 Colheita e conservação de amostras Experimento 1.

Foram colhidas amostras de fezes e urina, uma vez por dia, durante todo o período de adaptação e entre os dias -24 e -2 do período experimental, no sentido de acompanhar as flutuações fisiológicas dos progestágenos durante este período. Entre os dias -1 e +3 (um dia antes e três dias após a administração do MGA) foram realizadas colheitas de fezes e urina a cada 4 (quatro) horas, se estivessem presentes (Figura 9). Para isso, a gaiola metabólica foi limpa logo após cada coleta, permitindo a "pureza" da amostra subsequente.

As fezes foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos, devidamente identificadas, com o número do animal, data e hora, enquanto a urina foi armazenada em tubos de ensaio de plástico, todos devidamente identificados com o número do animal, dia e hora da coleta. Tanto fezes quanto urina foram armazenadas em freezer a -20°C até seu processamento.

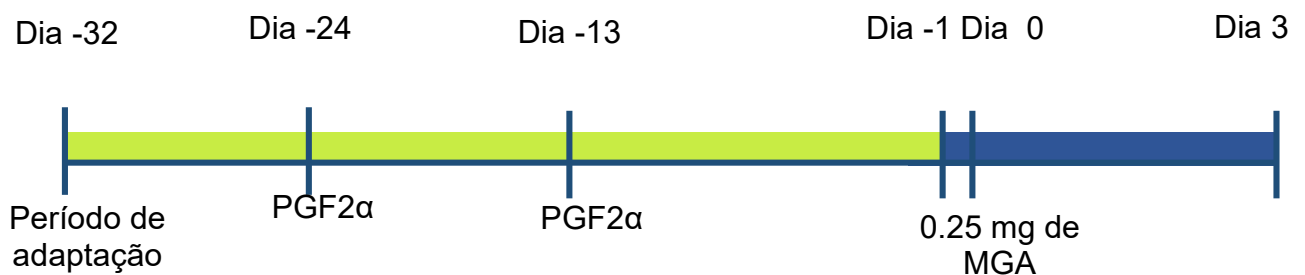


Figura 9. Esquema representativo do tratamento hormonal no experimento 1 e coletas de amostras em cinco fêmeas de *Mazama gouazoubira*, linha verde indica período de coletas de fezes e urina 1 vez por dia, linha azul indica período de coletas de fezes e urina de 4 em 4 horas, totalizando 96 horas.

4.6 Processamento das amostras

4.6.1 Fezes.

As amostras de fezes foram secas em estufa (Mod. 320-SE[®] - Fanem[®] Ltda - São Paulo - Brasil) a 56°C por aproximadamente 72 horas (YAMAUCHI et al., 1997; HAMASAKI et al., 2001) e em seguida pulverizadas manualmente, com um martelo de borracha. Este processamento diminui a influência do teor de água da amostra nas dosagens hormonais e favorece a homogeneização durante o processo de extração (BROWN e WILDT, 1997). Os metabólitos de esteróides foram extraídos como descrito por Graham et al., (2001) no qual 5mL de metanol (80%) foi misturado em 0,5g de amostra processada, e posteriormente agitadas em vórtex por 30 segundos e deixadas durante 12 horas em um agitador horizontal e novamente passadas no vórtex por 30 segundos. Em seguida, esta solução foi centrifugada a 1500rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para análises posteriores (Figura 10).

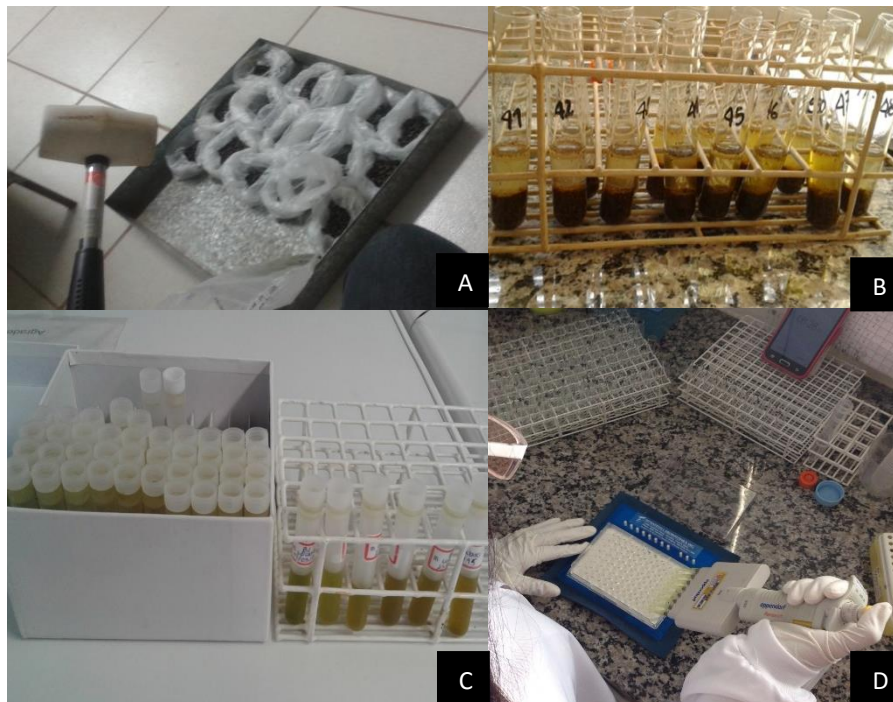


Figura 10. A) Amostras de fezes secas sendo trituradas com martelo de borracha. B) 0,5g de amostra com 5ml de metanol ao 80%. C) Extratos fecais armazenados em tubos individuais identificados. D) Procedimento de dosagem por imunoenensaio.

4.6.2 Urina.

Após descongelamento as amostras de urina foram centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos para a sedimentação e retirada de possíveis partículas (MONFORT et al.,1991). As concentrações de creatinina foram avaliadas em todas as amostras utilizando kit comercial LabTest® (Sistema Diagnóstico Ltda.) segundo recomendação do fabricante. O resultado foi obtido em mg/dL de urina e dividido por 100 para se obter a unidade em mg/ml. As concentrações hormonais apresentadas em ng/ml foram divididas pelo valor da creatinina (mg/ml) e expressas como unidade de massa (ng) por creatinina (mg) excretada.

4.7 Dosagem hormonal de progestágenos.

4.7.1 Validação das dosagens hormonais

O teste de validação proposto por Brown et al., (2004) foi utilizado para averiguar a eficácia das dosagens dos hormônios e seus metabólitos na urina e fezes de veado-catingueiro:

- Teste de Paralelismo

Determina se as ligações entre o hormônio da amostra e o da curva-padrão com o anticorpo utilizado para o ensaio são similares. Inicialmente foram feitos 'pools' de amostras urinárias e fecais, que foram diluídas seriadamente. A curva-padrão e a curva formada pela amostra diluída foram comparadas e este teste foi validado através da observação de uma disposição paralela entre elas. Por meio deste teste foi possível determinar a diluição adequada para as amostras urinárias e fecais, que foi determinada pela diluição que apresentou aproximadamente 50% de ligação entre hormônio amostral e anticorpo no ensaio (a parte mais sensível da curva-padrão) da mesma forma, foi realizado um teste de paralelismo de MGA, usando 0,25mg de acetato de melengestrol, que foi posteriormente diluído seriadamente, com o objetivo de corroborar a ligação do MGA com o ensaio (Figura 11, 12 e 13).

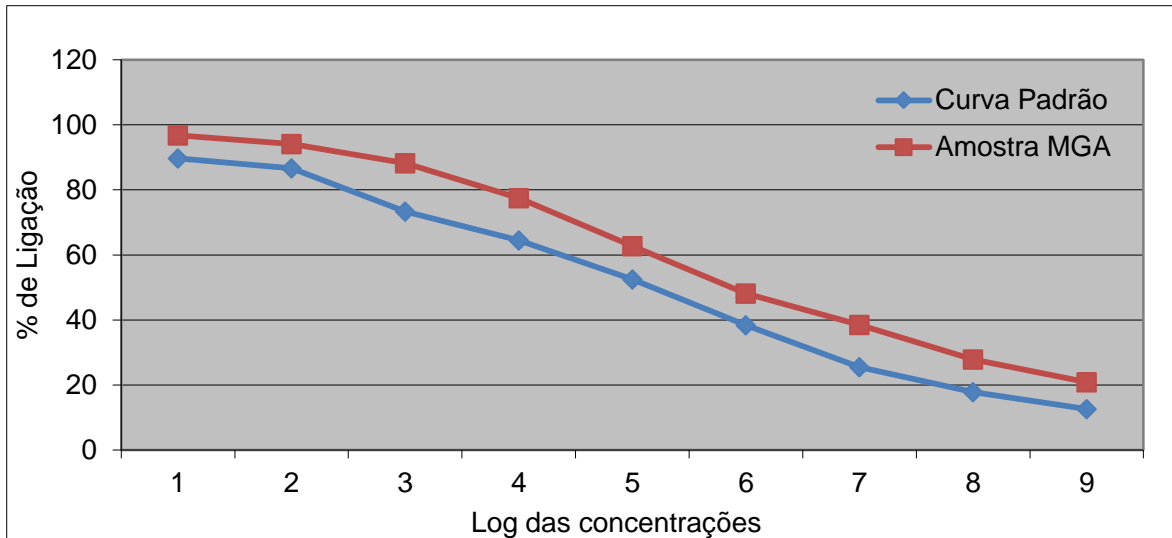


Figura 11. Resultado de teste de paralelismo da dosagem de MGA com a disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada do pool.

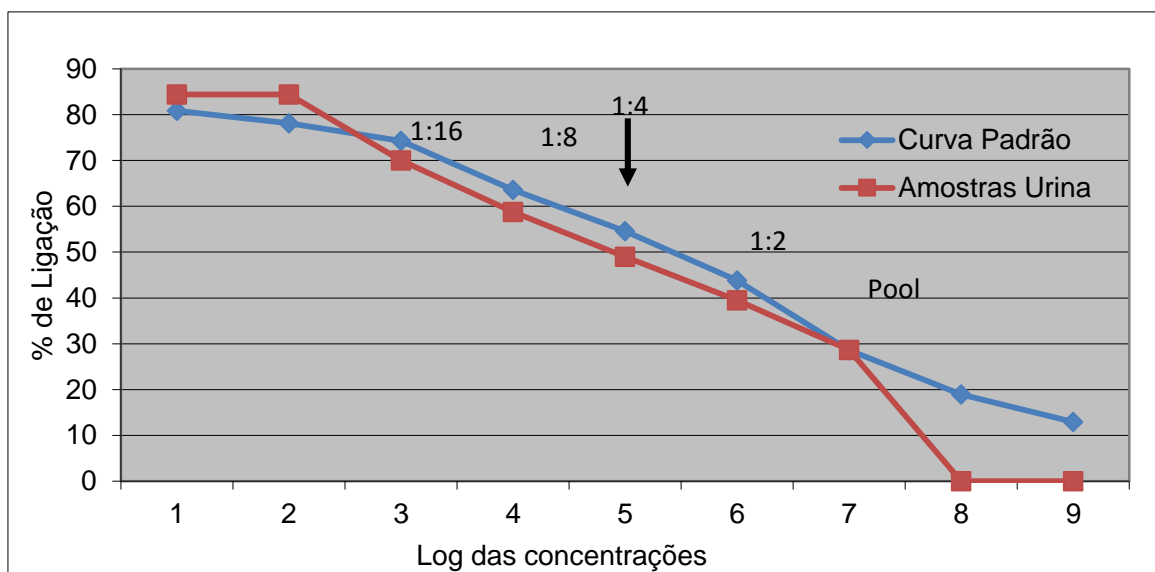


Figura 12. Resultado de teste de paralelismo da dosagem de progestágenos urinários em *Mazama gouazoubira*, com a disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada do pool. A diluição escolhida foi 1:4 por se encontrar na parte mais estável da curva, próxima a 50% de ligação entre hormônio amostral e anticorpo no ensaio.

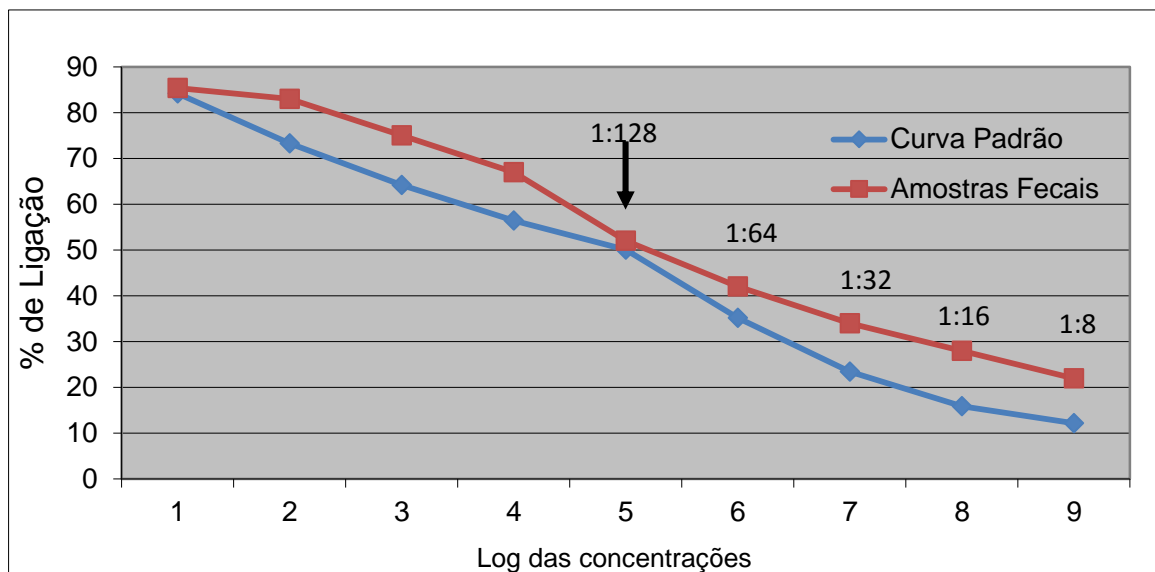


Figura 13. Resultado de teste de paralelismo da dosagem de progestágenos fecais em *Mazama gouazoubira*, com a disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada do pool. A diluição escolhida foi 1:128 por se encontrar na parte mais estável da curva, próxima a 50% de ligação entre hormônio amostral e anticorpo no ensaio.

4.7.2 Ensaio Imunoenzimático (EIA)

As dosagens foram realizadas, por meio de ensaio imunoenzimático, nos Laboratórios do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da FCAV/UNESP Jaboticabal, utilizando anticorpo específico para progestágenos (CL425), oriundos da California University – Davis – CA - USA (Dra. C. Munro). Este anticorpo apresenta as seguintes reatividades para Progestágenos (4-pregnen-3,20-diona (progesterona) 100,0%; 4-pregnen-3 α -ol-20-ona 188,0%; 4-pregnen-3 β -ol-20-ona 172,0%; 4-pregnen-11 α -ol-3,20-diona 147,0%; 5 α -pregnan-3 β -ol-20-ona 94,0%; 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona 64,0%; 5 α -pregnan-3,20-diona 55,0%; 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona 12,5%; 5 β -pregnan-3,20-diona 8,0%; 4-pregnen-11 β -ol-3,20-diona 2,7%; 5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona 2,5%; 5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol (pregnenediol) <0,1%; outros metabólitos <0,1%). Este anticorpo foi escolhido por apresentar alta reatividade

cruzada com os metabólitos excretados de *M. gouazoubira* (POLEGATO, 2004). Todas as amostras de urina e os extratos fecais foram diluídos em tampão de diluição e dosados em duplicata. As concentrações hormonais urinárias foram expressas em nanograma por miligrama de creatinina excretada (ng/mg creatinina), enquanto as concentrações hormonais fecais foram expressas em nanograma por grama de fezes secas (ng/g fezes).

4.9 Análise de dados

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão. A partir das amostras criou-se um gráfico com o perfil de flutuação hormonal de progestágenos para cada animal pré-tratamento (desde o período de adaptação até 2 dias antes da administração de MGA) e seguidamente tratamento em conjunto com pós-tratamento (desde 1 dia antes, durante e três dias após a administração de MGA) Todos os animais foram analisados individualmente de forma descritiva.

5. RESULTADOS

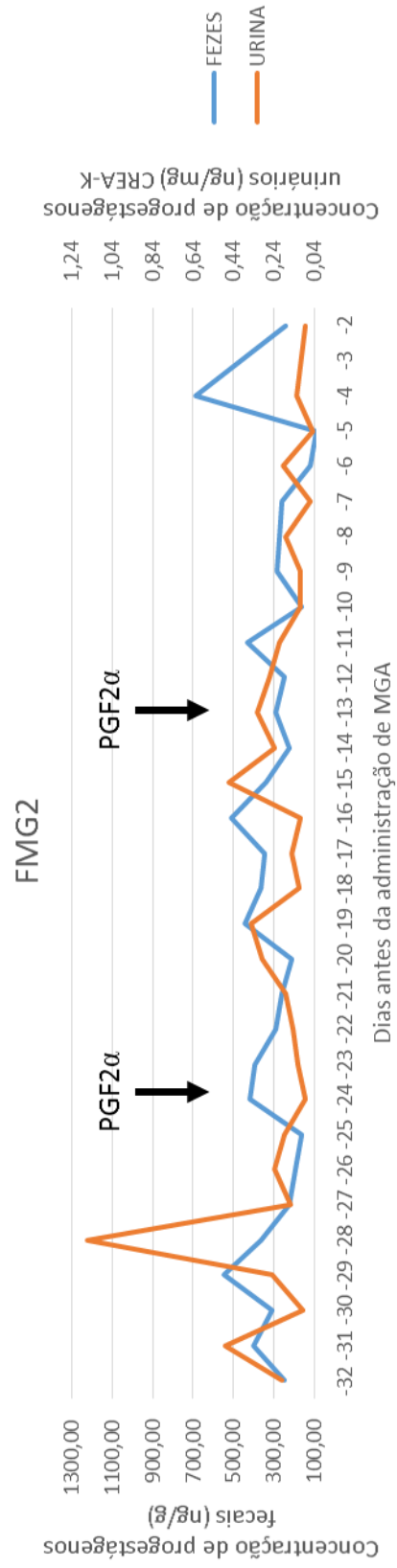
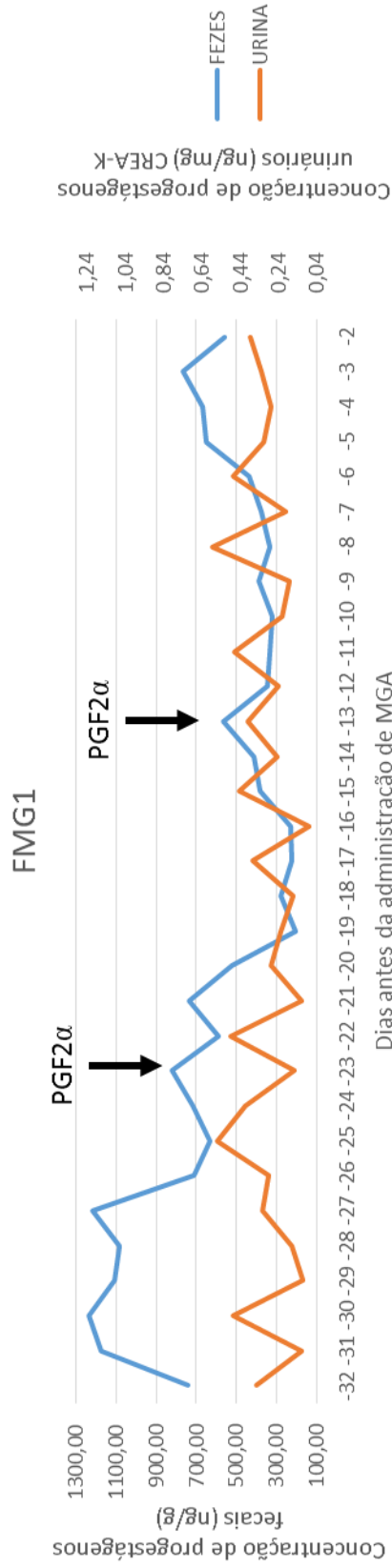
Experimento 1

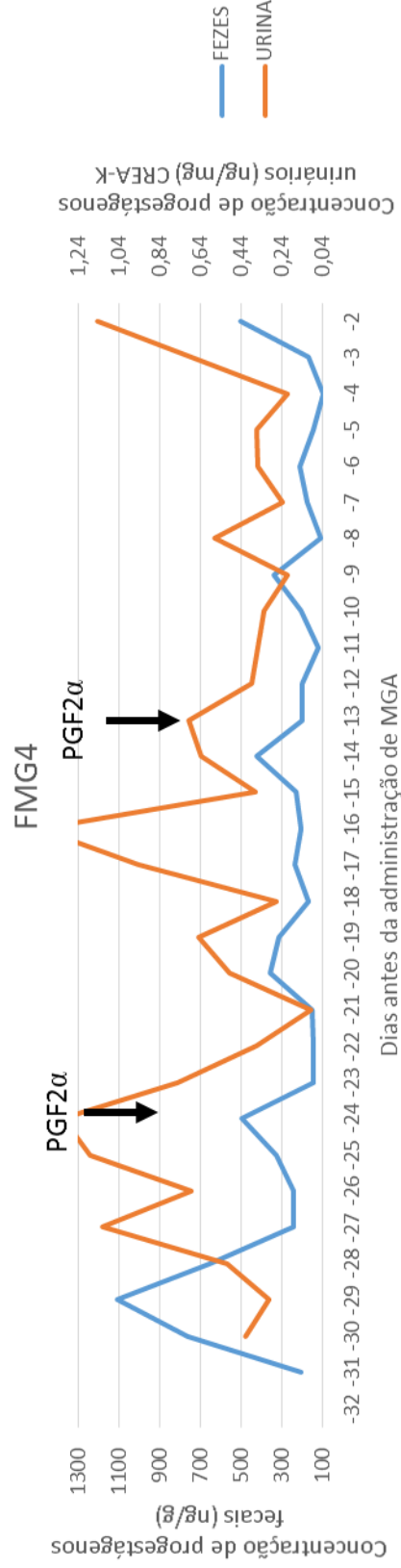
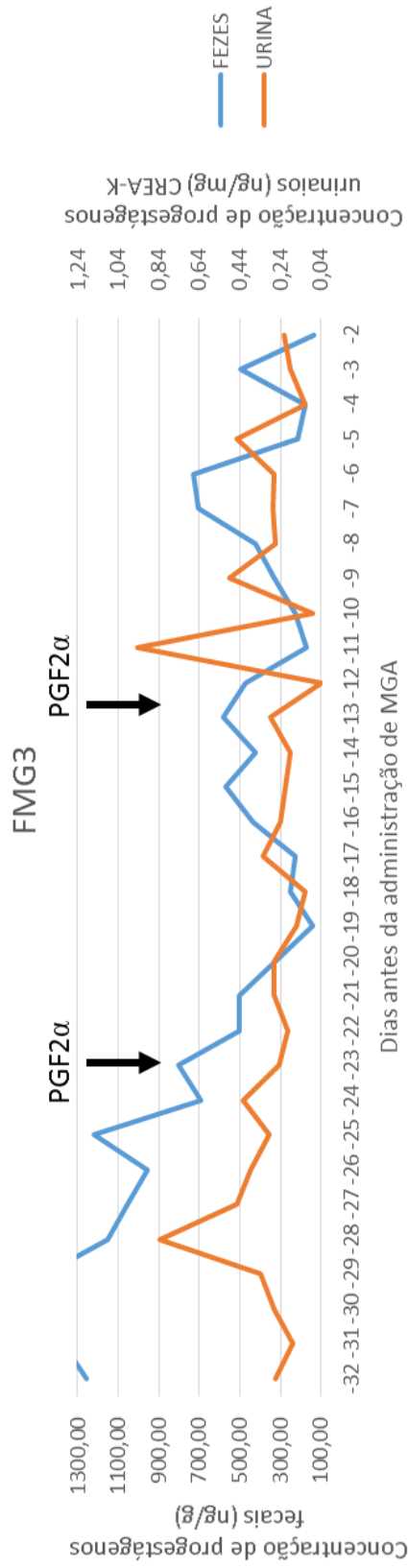
Dosagem Hormonal – Pré-Tratamento

O monitoramento das concentrações de progestágenos fecais e urinários foi realizado diariamente no pré-tratamento afim de acompanhar as flutuações hormonais durante o ciclo (estro, fase luteal, e interluteal). Os perfis hormonais tanto de fezes quanto de urina das fêmeas FMG1, FMG2, FMG3, FMG4, FMG5, estão representados na figura 14.

De maneira geral, as flutuações hormonais fecais apresentadas pelas fêmeas FMG1, FMG3, FMG4, e FMG5 mostraram concentrações máximas que alcançaram respectivamente 1233,97; 1487,63; 1111,41; 1032,69 ng de progesterona/g de fezes e concentrações medias de $606,15 \pm 291,10$; $628,94 \pm 382,04$; $295,11 \pm 95,15$ e $454,53 \pm 140,88$. A fêmea FMG2, por sua vez, apresentou concentrações hormonais que em nenhum momento, se aproximaram aos 1000ng de progesterona/g, as concentrações fecais máximas para FMG2 foram de 687,40ng de progesterona/g de fezes e concentração média de $313,96 \pm 95,25$.

Da mesma forma, as flutuações hormonais urinárias apresentadas pelas fêmeas FMG1, FMG3, FMG4, e FMG5 mostraram concentrações máximas superiores as da fêmea FMG2. As concentrações máximas foram respectivamente 1,30; 0,48; 0,95; 1,43; 1,40 ng/mg de creatinina, e as concentrações médias de $0,31 \pm 0,13$; $0,23 \pm 0,08$; $0,31 \pm 0,18$; $0,59 \pm 0,32$ e $0,26 \pm 0,10$.





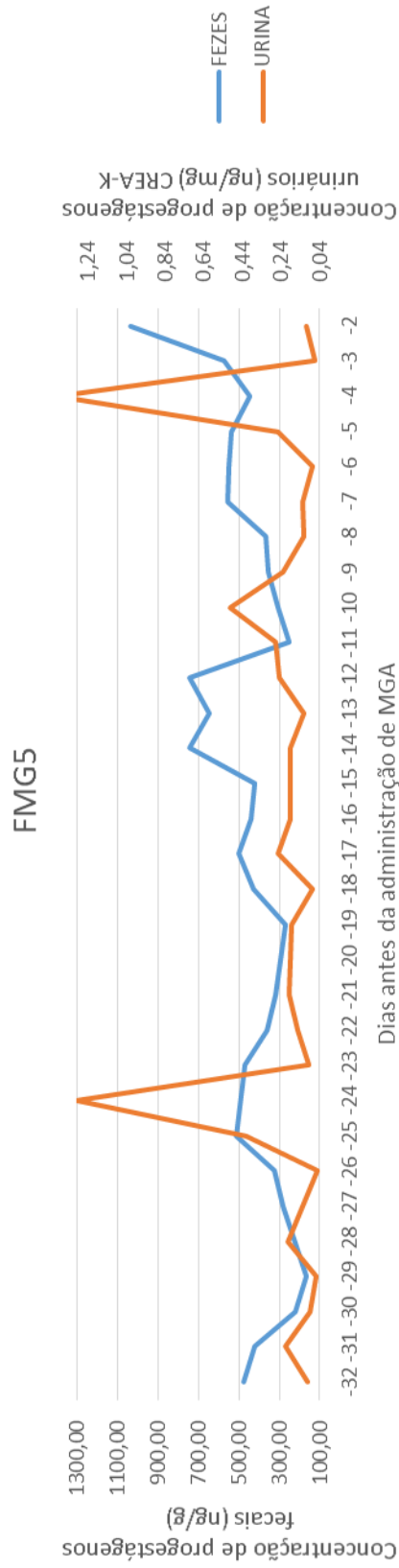


Figura 14. Perfil dos metabólitos de progesterógenos fecais e urinários em cinco fêmeas adultas de *M. gouazoubira*, antes da administração de MGA, setas pretas indicam as aplicações de cloprostenol sódico (PGF2 α) no dia -24 e -13 em relação ao dia 0 (administração de MGA). As concentrações fecais são expressas em ng /g de fezes, enquanto as concentrações urinárias são expressas em nanograma por miligrama de creatinina (ng/mg creatinina)

Tratamento e Pós-tratamento

No tratamento e no pós-tratamento as coletas foram feitas em um período total de 96 horas (1 dia antes e 3 dias após administração do MGA), com coletas de quatro em quatro horas, com o intuito de observar de uma forma mais clara as oscilações do medicamento. As concentrações hormonais se apresentaram variáveis entre os animais FMG1, FMG2, FMG3, FMG4 e FMG5, com concentrações máximas fecais que alcançaram até os 1000 ng/g (Tabela 3) e concentrações médias totais de $706,17 \pm 194,35$; $257,13 \pm 69,88$; $373,85 \pm 108,69$; $503,12 \pm 194,46$ e $970,16 \pm 322,28$ respectivamente, da mesma forma as concentrações médias por dia foi variável entre os animais (Tabela 4).

Para urina as concentrações hormonais máximas foram entre os 1,30 e 1,95 ng/mg (Tabela 4) e concentrações médias totais de $0,38 \pm 0,12$; $0,10 \pm 0,056$; $0,49 \pm 0,14$; $0,89 \pm 0,31$; $0,17 \pm 0,08$ respectivamente para os animais FMG1, FMG2, FMG3, FMG4 e FMG5. As médias por dia para urina diferiram entre os animais (Tabela 5).

Foi possível visualizar nas fezes a ocorrência de um pico sugestivo de MGA, o intervalo entre a administração de MGA por via oral e a ocorrência deste aparente pico em 4 das 5 fêmeas foi de 16 a 24 horas, diferentemente de urina onde não foi possível inferir sobre a presença de algum possível pico (Figura 15 e 16).

Tabela 4. Concentrações hormonais máximas pré-tratamento e pós-tratamento das cinco fêmeas usadas no experimento 1.

	PRÉ TRATAMENTO		PÓS TRATAMENTO	
	P4 Fecal	P4 Urinária	P4 Fecal	P4 Urinária
FMG1	1233,97 ng/g	1,30 ng/mg	1281,91 ng/g	1,30 ng/mg
FMG2	687,40 ng/g	0,48 ng/mg	466,85 ng/g	0,27 ng/mg
FMG3	1487,63 ng/g	0,95 ng/mg	740,06 ng/g	1,64 ng/mg
FMG4	1111,41 ng/g	1,43 ng/mg	755,30 ng/g	1,95 ng/mg
FMG5	1032,69 ng/g	1,40 ng/mg	1332,14 ng/g	0,59 ng/mg
MÉDIA	$459,74 \pm 156,88$	$0,34 \pm 0,14$	$562,09 \pm 282,48$	$0,41 \pm 0,31$

Tabela 5. Médias fecais hormonais dos dias tratamento é pós tratamento (1 dia antes e 3 dias após administração de MGA)

TRATAMENTO E PÓS TRATAMENTO					
	Dia -1	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia3
FMG1	616,53±131,43	726,39±332,21	781,49±218,30	753,48±329,21	434,18±0,01
FMG2	265,10±31,28	254,38±75,70	196,91±21,91	238,89±46,26	466,85±0,01
FMG3	103,38±98,72	285,06±152,28	252,86±192,93	395,26±240,38	510,05±0,01
FMG4	443,58±133,98	491,04±219,21	483,10±143,20	597,94±309,28	578,74±0,01
FMG5	698,92±253,69	537,86±421,04	844,75±668,85	1244,72±218,20	781,36±0,01

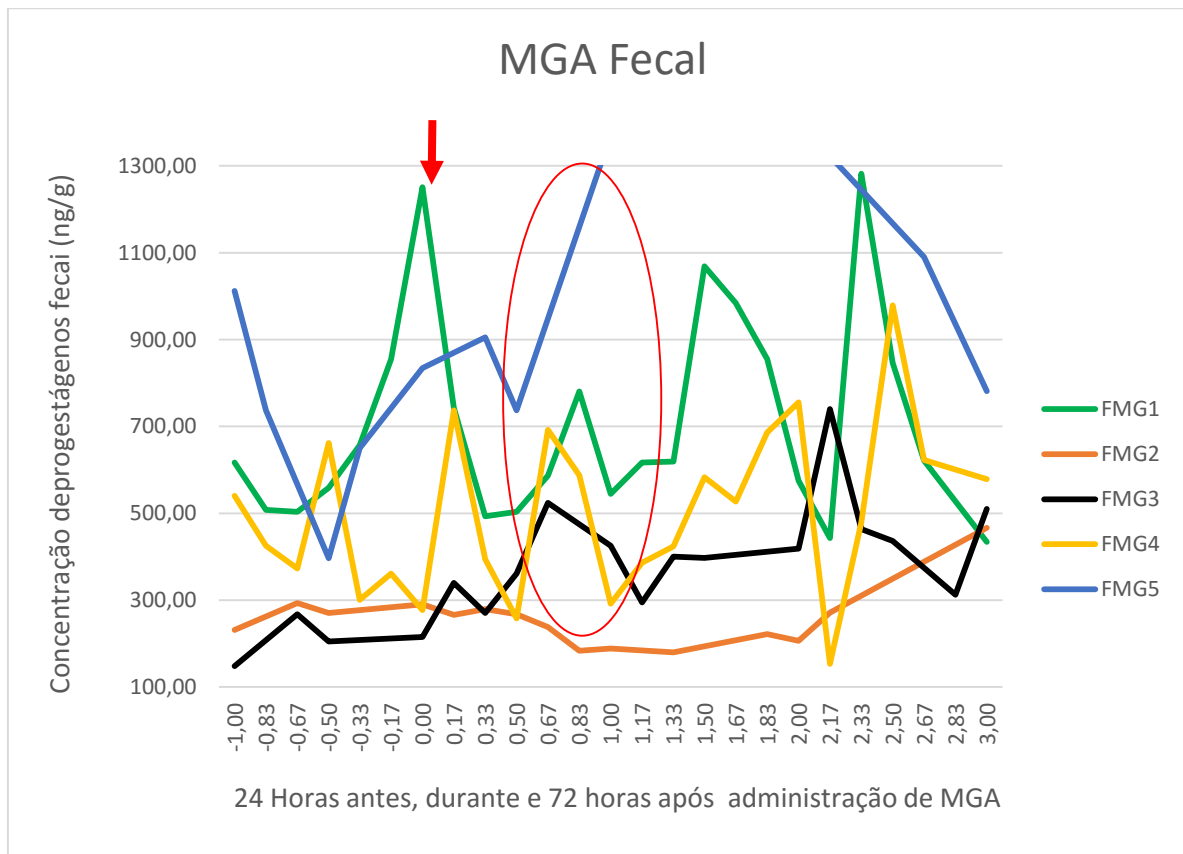


Figura 15. Perfis endócrinos das concentrações de progesterona fecal de cinco fêmeas de *Mazama gouazoubira* 24 horas antes, durante e 72 horas, após da administração de MGA por via oral. Seta indica o momento da administração do acetato de melengestrol (0,00).

Tabela 6. Médias hormonais de urina dos dias tratamento é pós tratamento (1 dia antes e 3 dias após administração de MGA)

TRATAMENTO E PÓS TRATAMENTO					
	Dia -1	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia3
FMG1	0,47±0,11	0,55±0,21	0,28±0,09	0,28±0,09	0,10±0,01
FMG2	0,04±0,03	0,10±0,15	0,04±0,04	0,02±0,02	0,13±0,01
FMG3	0,13±0,11	0,21±0,16	0,46±0,20	0,39±0,22	0,66±0,01
FMG4	1,14±0,56	1,00±0,14	0,75±0,18	0,68±0,35	0,67±0,01
FMG5	0,12±0,07	0,23±0,05	0,24±0,15	0,13±0,08	0,04±0,01

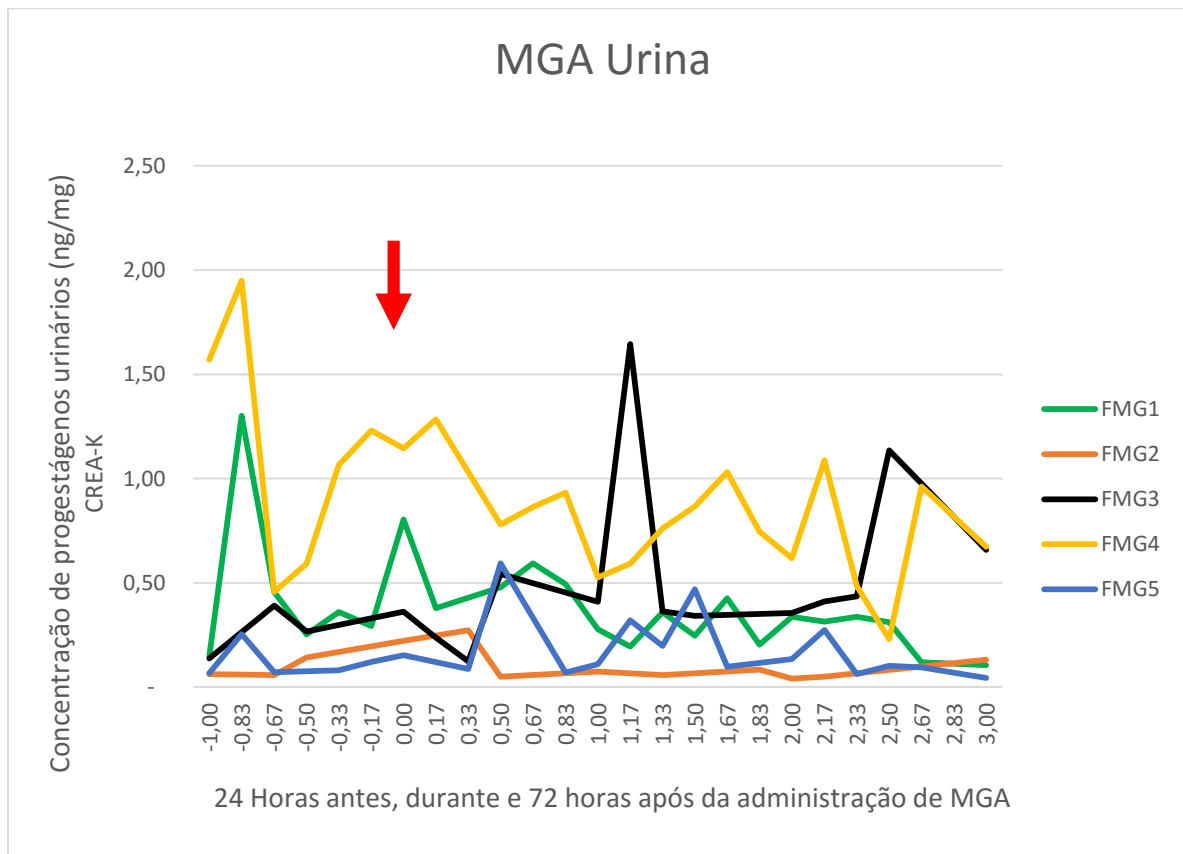


Figura 16. Perfis endócrinos das concentrações de progesterógenos urinárias de cinco fêmeas de *Mazama gouazoubira* 24 horas antes, durante e 72 horas após da administração de MGA por via oral. Seta indica o momento da administração do acetato de melengestrol (0,00).

Experimento 2

O monitoramento do ciclo estral (com dois machos férteis) foi realizado diariamente durante o tratamento, e no pós tratamento afim de detectar o estro comportamental. As fêmeas FMG3 e FMG7 apresentaram estro comportamental pré-tratamento, a fêmea FMG6 apresentou estro durante o tratamento, enquanto a fêmea FMG2 não apresentou estro comportamental em nenhum período. No entanto, as fêmeas FMG1, FMG5, FMG7 apresentaram estro pós-tratamento. Os resultados referentes ao estro estão apresentados na tabela 7. A variação de tempo entre o fim do tratamento e o início do estro foi entre 36-108 horas.

Tabela 7. Dados referentes ao momento de apresentação do estro comportamental o intervalo entre o fim do tratamento e o início do estro e duração do estro em seis fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*.

Animal	Momento de apresentação do estro	Intervalo entre o fim do trat. e início do estro (h)	Duração do estro (h)
FMG1	Pós –tratamento (5 dias após do tto)	108 h	24h
FMG2	-	-	
FMG3	Pré – tratamento (1 antes do começo do tto)	-	
FMG5	Pós – tratamento)	48 h	36h
FMG6	Durante tratamento (1 dia após do começo do tto)	-	
FMG7	Pré – tratamento (2 antes do começo do tto)/ Pós–tratamento	36 h	48h

Experimento 3

As fêmeas FMG1 e FMG6 não apresentaram estro comportamental em nenhum período do tratamento, no entanto, as fêmeas FMG3, FMG5, FMG7 sim. Os resultados referentes ao estro estão apresentados na tabela 8. A variação de tempo entre a aplicação de PGF2 α e o início do estro foi entre 48-90 horas.

Tabela 8. Dados referentes ao momento de apresentação do estro comportamental em relação entre a aplicação de PGF2 α e o início do estro e duração do estro em cinco fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*.

Animal	Momento de apresentação do estro	Duração do estro (h)
FMG1	-	-
FMG3	90 h	36 h
FMG5	48 h	48 h
FMG6	-	-
FMG7	66 h	24h

6. DISCUSSÃO

Poucos são os estudos realizados para testar a sensibilidade do MGA ao ensaio imunoenzimático (HAGELEIT et al., 2001; LANGE et al., 2003), e não há relatos de estudos do uso de acetato de melengestrol em cervídeos neotropicais. Em outras espécies de cervídeos, seu uso está restrito até o momento como ferramenta contraceptiva, e já foi testado em espécies como *Odocoileus virginianus* (PLOTKA e SEAL, 1989; ROUGHTON, 1979) *Cervus duvauceli*, *Cervus axis*, *Cervus unicolor* *Cervus nippon taiwanus* (RAPHAEL et al., 2003). Portanto, até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que busca utilizar o MGA visando a sincronização de estro de forma não invasiva em cervídeos.

Em comparação com outros trabalhos executados com fezes usando o mesmo método de extração, foram obtidos valores muito próximos aos encontrados nos perfis fecais. Num estudo feito nesta mesma espécie (*M. gouazoubira*), Zanetti et al., (2010) analisou hormônios fecais em fêmeas sincronizadas com CIDR®, conseguindo níveis durante o tratamento em estro de 571,76 ng/g e 465,98 ng/g, na fase interluteal de 403,81 ng/g e 465,63 ng/g, enquanto a fase luteal níveis de 865,54 ng/g e 1073,35 ng/g, apesar destes níveis serem compatíveis com este trabalho, Ferreira (2010) desenvolveu uma validação fisiológica em *M. gouazoubira*, através do desafio hormonal do ensaio imunoenzimático (EIA) para quantificar progestágenos, estrógenos e gonadotrofinas urinárias e fecais usando implante intravaginal de progesterona (CIDR®). Os 2 animais analisados neste trabalho, apresentaram, concentrações fecais médias pré-tratamento de 1024,40±724,36 ng/g e 2288,10±617 ng/g níveis maiores aos apresentados neste trabalho, assim mesmo as médias para progestágenos urinários no pré-tratamento mostraram grandes diferenças, sendo que nas duas fêmeas foram encontradas concentrações médias de 8,13±5,75 ng/mg CREA-K e 12,94±9,15 ng/mg CREA-K, respectivamente. Da mesma forma os níveis durante o tratamento com CIDR® foram superiores aos 6010,15±1551,81 ng/g para progestágenos fecais, e 593,38±224,28 ng/mg CREA-K para progestágenos urinários. Também em veado-catingueiro Peroni (2013), obteve níveis maiores que 2000ng/g,

com o uso do CIDR[®] para sincronizar fêmeas de veado catingueiro. Isso demonstra que a liberação de progesterona pelo CIDR[®] é muito alta e superior aos níveis máximos encontrados aqui com o tratamento de MGA oral na dose de 0,25 mg/animal ($970,16 \pm 322,28$ ng/g de fezes e $0,89 \pm 0,31$ ng/mg de creatinina).

Analisando os perfis hormonais de fezes no período de tratamento e pós-tratamento podemos notar que houve um leve aumento dos níveis hormonais 16 a 24 horas após administração do MGA formando um pico sugestivo que coincide entre os animais FMG1; FMG3; FMG4; FMG5. Essa informação é condizente com o tempo de metabolização e excreção de hormônios esteroides, que ocorre de 12 a 24 horas nas fezes de ruminantes (SCHWARZENBERGER et al., 1996; MORROW e MONFORT, 1998).

Já os perfis hormonais de urina não evidenciaram aumento que fosse concomitante entre os animais após administração do MGA. Esses dados corroboram com os obtidos por Lange et al. (2003) em bovinos, que afirmam que a urina não é uma fonte adequada para avaliar a administração de MGA. Em seu experimento, eles avaliaram a detecção de diferentes doses de MGA em amostras de fezes e urina por meio de EIA. Eles encontraram que a detecção nas fezes é dose-dependente (foi encontrado 0,25, 2,0, 4,4, ou 15,4 ng por g fezes para doses de 0, 0,5, 1,5, e 5 mg/dia, respectivamente). Quanto a urina, as concentrações de MGA ou seus metabólitos permaneceram abaixo do limite de detecção para que seja possível realizar o EIA (0,02–0,06 ng/mL – detecção obtida por cromatografia), e não foram confiáveis, uma vez que os valores encontrados não diferiram entre animais tratados e não tratados. Estudos em novilhas demonstraram que o MGA é eliminado via fezes e urina numa proporção de 6:1, sendo a bile a rota primária de excreção, e ainda que há 10 a 17% da dose aplicada passando pelo trato intestinal inabsorvida, enquanto apenas 9% foi encontrado na urina (KRZEMINSKI et al., 1981).

O teste de paralelismo com o MGA indica sua sensibilidade de ligação ao anticorpo. Porém, os progestágenos administrados por via oral estão sujeitos a metabolismo pelas bactérias no intestino e enzimas, já que passam por metabolismo hepático. A medida em que isto acontece, a estrutura química da progestina é

modificada (STANCZYK, 2003). Portanto, existe a possibilidade de que a detecção que possivelmente foi encontrada nas fezes seja referente apenas a parte inabsorvida do MGA, e que os demais metabólitos não tenham se ligado aos anticorpos.

Com relação a fêmea FMG2, é notável a diferença dos seus resultados em comparação com as demais. Os baixos níveis de progesterona apresentados por ela devem estar relacionados possivelmente a que o animal encontrasse em um período de anestro ou possui problemas patológicos no aparelho reprodutivo como incapacidade de desenvolvimento folicular no ovário, insuficiência gonadotrópica e hipoplasia (JAINUDEEN e HAFEZ, 2002). Além disso, este animal pode apresentar um modo diferente de metabolização ou degradação de hormônios no sistema digestório, apresentando metabólitos não identificáveis pelo anticorpo usado neste estudo (SOUZA, 2003).

Com relação ao experimento 2, três das seis fêmeas (50%), apresentaram estro comportamental de 36 a 108 horas após a suspensão do MGA juntamente com a aplicação do cloprostenol sódico, enquanto no experimento 3 três, das cinco fêmeas, 3 (60%) exibiram estro comportamental de 48 a 90 horas após administração do PGF₂ α . O período de detecção do estro corrobora com os demais estudos realizados para esta espécie, sendo que Zanetti (2010), reportou estros de 36 até 118 horas e Peroni (2013) reportou estros entre 50 a 98 horas após a retirada da fonte de progesterona (CIDR[®] mantido por 8 dias) em conjunto com a aplicação de cloprostenol sódico. Entretanto, a porcentagem de sincronização foi baixa, e muito inferior ao relatado pelos trabalhos citados acima, onde foi obtido 100% de sucesso na apresentação de estro dos animais (ZANETTI et al., 2010; PERONI 2013). Isso sugere que o MGA na dose fornecida não foi eficiente, e que provavelmente as fêmeas demonstraram estro em resposta a aplicação do cloprostenol sódico. Esse fármaco é um análogo da prostaglandina (PGF₂ α), que tem por função desencadear a luteólise, resultando em ovulação e aumento da secreção de estradiol, que por sua vez, leva ao comportamento estral. O corpo lúteo pode ser refratário ao efeito luteolítico da PGF₂ α no início de seu desenvolvimento (1 a 5 dias) e a partir do 6 dias de sua formação se torna sensível (ASHER et al., 1995). Porém, a fase luteal, é predominante no ciclo estral com duração de 24.6 \pm 1.4 dias em comparação com a fase inter-luteal que tem

duração de apenas 1.7 ± 0.1 dias em *M. gouazoubira* (PEREIRA et al., 2006), havendo grandes chances de que a aplicação de $PGF2\alpha$ ao acaso ocorra na presença de um corpo lúteo sensível.

Jackson et al., (2006), determinou a eficácia do tratamento com MGA, na indução e sincronização do estro em cabras em anestro. Foi usado um grupo controle e um grupo tratamento que ingeria 0,25 mg de MGA/animal/dia durante 10 dias, e em seguida as fêmeas foram expostas a dois machos férteis para detecção do estro e acasalamento. O MGA foi eficaz na redução do tempo até a primeira monta, resultando em maior número de cabras sincronizadas no estro. O estudo de Powell et al., (1996), apoia estes resultados, onde provou que MGA é um método eficaz e prático para a indução e sincronização de estros férteis, usando uma dose 0.25 mg/animal/dia em 1.659 ovelhas fora de estação reprodutiva. Entretanto, comparou diferentes intervalos de administração (8 dias vs 11 dias vs 14 dias) concluindo que não existia diferença entre os intervalos de administração, sendo assim, 8 dias de tratamento seria a melhor indicação, evitando manejos excessivos e aumento do valor do tratamento.

Tanto o experimento 1 quanto o 2 e 3 demonstraram falha no uso do MGA oral para aumento dos níveis de progestágenos e inibição de estro nas fêmeas de *M. gouazoubira*, e isto provavelmente deve-se ao uso de uma dose insuficiente de MGA para esta espécie. Apesar de vários os estudos relatarem a eficiência de 0,25 mg de MGA/animal/dia em pequenos ruminantes domésticos, que são o modelo fisiológico mais próximo aos cervídeos, parece haver grande variação entre espécies com relação a dose recomendada. Para bovinos, a maioria dos trabalhos cita 0,5 mg como sendo a ideal (IMWALLE et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002; KESLER et al., 1996), relatando que o MGA previne a ovulação e inibe a onda pré-ovulatória de LH (IMWALLE et al., 2002). Para eles, a dose diária mínima para que o MGA seja eficaz e haja inibição da ovulação é de 0.42 mg (PATTERSON et al., 1989). Já para equinos, foram testadas doses de 100 a 150 mg/dia. A ovulação foi detectada em 87,5% das fêmeas tratadas com 150mg e em 62,5% das tratadas com 100 mg, e 20% das não tratadas (possivelmente por efeito da $PGF2\alpha$ - LÓPEZ-BAYGHEN et al., 2008), indicando que doses mais altas culminaram em maior sucesso. Já para cervídeos, as

doses utilizadas foram entre 0.6 a 1 mg/dia por animal (ROUGHTON et al., 1979; RAPHAEL et al., 2003), o que significa uma dose até quatro vezes maior do que a utilizada em nosso trabalho. Embora o foco desses trabalhos com cervídeos fossem a contracepção, o MGA foi eficiente em evitar a ovulação e, portanto, é possível que doses semelhantes a essas sejam eficazes na manipulação do ciclo estral.

Como já foi mencionado anteriormente, os resultados deste estudo tanto na parte endócrina como na parte comportamental não demonstraram eficácia do MGA oral como agente sincronizador do ciclo estral em *M. gouazoubira*. Além do uso de doses ineficientes, outros fatores podem interferir nos resultados como, por exemplo, a diferença de metabolização do MGA por cada um dos animais devido a suas características individuais (idade, peso, condição corporal), fatores como dieta, quantidade de alimento digerido, espaço entre ingestões, e características funcionais do trato digestório (TAYLOR, 1971; STEVENS e HUME, 1995; PEREIRA e POLEGATO, 2010). Além destes aspectos, o MGA tem metabólitos espécie – específicos, conforme relatado por Cooper e Kellie (1965), três tipos de metabólitos de MGA (17a-acetoxi-2a-hidroxi-6-metil-16-methylenepregna-4,6-dieno-3,20-diona) foram identificados exclusivamente na urina de coelhos por meio de cromatografia. Supondo que metabólitos espécie-específicos de MGA estivessem presentes na urina de cervídeos, os baixos níveis hormonais pós-tratamento exibidos na urina podem ter ocorrido devido ao fato de que o anticorpo usado neste trabalho (CL425) não teria uma reação cruzada com esse tipo de metabólito.

De maneira geral, a variação na eficácia dos tratamentos hormonais nos diferentes estudos em cervídeos é esperada devido a diferenças marcantes entre as espécies, de acordo com o tipo de progestágeno utilizado, e ainda devido à falta de pesquisas que avaliam os efeitos dos progestágenos nas espécies de cervídeos (ASHER et al., 2000)

7. CONCLUSÃO

Este estudo agrega conhecimento sobre a dosagem hormonal não invasiva do MGA na espécie *M. gouazoubira* e poderá ser utilizado como uma ferramenta para o desenvolvimento de futuros protocolos de sincronização. Não foi possível realizar uma detecção confiável do MGA nas fezes e urina por ensaio imunoenzimático na dose testada e anticorpo utilizado, não sendo possível avaliar o efeito do MGA para manipulação do ciclo. Portanto, é importante a realização de outros estudos sobre aspectos básicos da farmacocinética do MGA e, principalmente, de doses que sejam responsivas o suficiente para obter maiores níveis hormonais, e assim possibilitar a manipulação do ciclo estral.

8. REFERÊNCIAS

AINSWORTH, L.; SHRESTHA, J.N.B. Effect of type of intravaginal progestagen treatment on estrous response and reproductive performance of ewes. **Theriogenology**, v.19, Issue 6, p.869-875, 1983.

ARGO, C. M.; JABBOUR, H. N.; GODDARD, R.; WEBB, R.; LOUDON, A. S. I. Superovulation in red deer (*Cervus elaphus*) and Père David's deer (*Elaphurus davidianus*), and fertilization rates following artificial insemination with Père David's deer semen. **Journal Reproduction Fertility**, v.100, p. 629-636, 1994.

ASHER, G. W.; FISHER M. W.; JABBOUR H. N.; SMITH J. F.; MULLEY R. C.; MORROW C. J.; VELDHUIZEN F. A.; LANGRIDGE M. Relationship Between the Onset of Oestrus, The preovulatory surge in luteinizing hormone and ovulation following oestrus synchronization and superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*). **Journal Reproduction Fertility**, 96 p.261-273, 1992.

ASHER, G. W.; FISHER, M. W.; FENNESSY, P. F.; MACKINTOSH, C. G.; JABBOUR, H. N.; MORROW, C. J. Oestrus synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). **Animal Reproduction Science**, v.33, p. 241-265, 1993.

ASHER, G. W.; JABBOUR H. N.; THOMPSON, J. G.; TERVIT, H. R.; MORROW, C. J. Superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*): Incidence of ovulation and changes in plasma hormone concentrations during the pre-ovulatory period in relation to ova recovery and fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 137-154, 1995.

ASHER, G. W.; O'NEILL, K. T.; SCOTT, B. G.; MOCKETT, B. G. PEARSE, A. J. Genetic influences on reproduction of female red deer (*Cervus elaphus*) (2) Seasonal and genetics effects on the superovulatory response of exogenous FSH. **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 61-70, 2000.

AX, R.L; DALLY, M.R.; B.A, DIDION.; LENZ, R.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M.E. Inseminação artificial. In: HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. (7 Ed). **Reprodução e Inseminação artificial em Animais**. McGraw-Hill. p. 387-400, 2003.

BAINBRIDGE, D. R; JABBOUR H. N. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Vet. Rec.** v.143 p.159-168, 1998.

BAIRD T. D. Lutetrophic control of the corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v.28, p. 95-102, 1992.

BAMBERG, E.; MOSTL, E.; PLATZ, M.; KING, G. J. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v. 22, p. 73-77, 1991.

BEISEGIEL, B.M.; DUARTE, J.M.B.; MEDICI, E.P.; KEUROGHLIAN, A. & DESBIEZ, A.L.J. 2012. . **Biodiversidade brasileira, número temático, avaliação do estado de conservação dos ungulados**: Biodiversidade Brasileira Ano II Nº 3, 1-2, 2012.

BELL, R. L. and PETERLE, T.J. Hormone Implants Control Reproduction in White-Tailed Deer. **Wildlife Society Bulletin**, Vol. 3, No. 4, p. 152-156, 1975.

BLACK-DECIMA, P.; ROSSI, R. V.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J. M. B.; GONZÁLES, S.; JULIÁ J. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In. DUARTE e GONZÁLEZ. **Neotropical Cervidology**. FUNEP, p.255-270, 2010.

BROWN, J. L. and WILDT D. E. Assessing reproductive status in wild felids by noninvasive faecal steroid monitoring. **The Zoological Society of London**, v. 35 p.173-191, 1997.

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic Species**, 2nd ed. Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Handbook, p. 1-93, 2004.

BURKE, V. AND KEISLER, D. H. Induction of estrus and conception rates in anestrus ewes treated with melengestrol acetate (MGA) and zeranol. **Journal Animal Science**. v.88(Suppl. 1): 435-436,1988.

CHRISTOFOLETTI, D. M. **Perfil de Progesteronas Fecais Durante a Gestação de Veado- Campeiro (*Ozotocerus Bezoarticus*) No Pantanal**. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária: Reprodução Animal) 2010- 57p. Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

COLEMAN, D. A.; BARTOL, F. F AND RIDDELL, M. G. Effects of 21-day treatment with melengestrol acetate (MGA) with or without subsequent prostaglandin F2 alpha on synchronization of estrus and fertility in beef cattle. **Journal Animal Science**, v. 68 P.3300-3305,1990.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reproduction Nutrition Development**, v. 40, p. 493-503, 2000.

COOPER, J. M. and KELLIE, A. E. The Metabolism of Melengestrol Acetate, **Steroids**, v.6, p. 255, 1965.

CURSINO, M.S. A.; SALVIANO, B.M; ABRIL, V.V.;ZANETTI, S,E and DUARTE, J.M.B. The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology**, 14:40,2014.

DUARTE, J. M. B. Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em animais silvestres: o exemplo dos cervídeos. **Agrociência**, 9(1-2): 541-544, 2005.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: FUNEP, p.14, 1996.

DUARTE, J. M. B.; BEISIEGEL, B. M.; MEDICI, E. P.; KEUROGHLIAN, A.; LÉONARD, A.; DESBIEZ, J. **Biodiversidade brasileira, número temático, avaliação do estado de conservação dos ungulados: Biodiversidade Brasileira Ano II Nº 3, 1-2, 2012.**

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Tecnologia da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção. In: DUARTE, J.M.B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: blastocerus, ozotoceros e mazama**. Jaboticabal: FUNEP, 1997, p. 228-238.

DUARTE, J.M.B.; GARCIA, J.M. Reprodução assistida em Cervídeos Brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 1-2, p. 111-121, 1995.

DUARTE, J.M.B.; MERINO, M.L. Taxonomia e Evolução. In: DUARTE, J.M.B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: blastocerus, ozotoceros e mazama**.Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 2-21.

EMERY, M. A.; WHITTEN, P. L.: Size of sexual swellings reflects ovarian function in chimpanzees (*Pan troglodytes*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.54 p.340–351, 2003

ENGELHARDT, A.;HODGES, J. K.; HEISTERMANN, M. Post-conception mating in wild long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*): characterization, endocrine correlates and functional significance. **Hormones and Behavior**, v.51, issue 1, p.3-10, 2007.

FEMIA, R.A.;GOYETTE, R.E. The Science of melengestrol acetate delivery. **Biodrugs**, V. 19 (3), P. 179-187, 2005.

FERREIRA,G.R.**Validação da dosagem de progestágenos, estrógenos e gonadotrofinas urinárias como método não-invasivo para o acompanhamento endócrino em veado-catingueiro (mazama gouazoubira)**. 29f-2010.(Trabalho de graduação em medicina veterinária) - Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal,2010.

GRAHAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A Versatile Enzyme Immunoassay for the Determination of Progestogens in Feces and Serum. **Zoo Biology**, v. 20, p.227–236, 2001.

HAGELEIT, M.; DAXENBERGER, A.; MEYER, H.H.D. A sensitive enzyme immunoassay (EIA) for the determination of melengestrol acetate (MGA) in adipose and muscle tissues. **Food Additives & Contaminants**, v.18, n°4, 285-291, 2001.

HAMASAKI, S.; YAMAUCHI, K.; OHKI, T.; MURAKAMI, M.; TAKAHARA, Y.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Comparison of various reproductive status in sika deer (*Cervus nippon*) using fecal steroid analysis. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 63, p. 195–188, 2001.

HOSACK, D. A.; MILLER, K. V.; WARE, L. H.; MASHBURN, K. L.; MORROW, C. L.; WILLIAMSON, L. R.; MARCHINTON, R. L.; MONFORT, S. L. Stag exposure advances the LH surge and behavioral estrus in Eld's deer hinds after CIDR device synchronization of estrus. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 1333-1342, 1999.

HUNT, K. E., ROLLAND, R. M., KRAUS, S. D. & WASSER, S. K. Analysis of fecal glucocorticoids in the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). **General and Comparative Endocrinology**, v.148, p.260–272, 2006.

IMWALL, D. B.; FERNANDEZ, D. L AND SCHILLO, K. K. Melengestrol acetate blocks the preovulatory surge of luteinizing hormone, the expression of behavioral estrus, and ovulation in beef heifers. **Journal Animal Science**, v.80, p.1280-1284, 2002.

IUCN 2014.I UCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2 <http://www.iucnredlist.org> Downloaded on 18 March 2014.

JABBAR, G.; UMBERGER, S. H.; LEWIS, G. S. Melengestrol acetate and norgestomet for the induction of synchronized estrus in seasonally anovular ewes. **Journal Animal Science**, v.72, p.3049-3054, 1994.

JACKSON, D.J.; FLETCHER, C.M.; KEISLER, D.H.; WHITLEY, N.C. Effect of melengestrol acetate (MGA) treatment or temporary kid removal on reproductive efficiency in meat goats. **Small Ruminant Research**, 66 p.253–257, 2006.

JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Incapacidade reprodutiva. In: HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. (7 Ed). **Reprodução e Inseminação artificial em Animais**. McGraw-Hill. p. 269-286, 2003.

JOHNSON, S.K.; DAY, M.L. Methods to reduce or eliminate detection of estrus in a melengestrol acetate-PGF2a protocol for synchronization of estrus in beef heifers. **Journal Animal Science**.v.82, p. 3071-3076, 2004.

KEEFE, G. P.; WICHTEL J. J. Evaluation of melengestrol acetate and equine chorionic gonadotropin for out-of-season breeding in sheep on Prince Edward Island. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 41, p. 211-214, 2000.

KESLER, D. J., D. B. FAULKNER, R. B. SHIRLEY, T. S. DYSON, F. A. IRELAND, AND R. S. OTT. Effect of interval from melengestrol acetate to prostaglandin F2 alpha on timed and synchronized pregnancy rates of beef heifers and cows. **Journal Animal Science**, 74, p.2885-2890. 1996.

KOJIMA, F. N.; SALFEN, B. E.; BADER, J. F.; RICKE, W. A.; LUCY, M. C.; SMITH, M. F AND PATTERSON, D. J. Development of an estrus synchronization protocol for beef cattle with short-term feeding of melengestrol acetate: 7-11 synch. **Journal Animal Science**, v. 78 p.2186-2191, 2000.

KORNDÖRFER, C.M. Hormônios sexuais nas fezes: opção para estudos reprodutivos e etiológicos de animais silvestres. **Anais da etiologia**, v.14, p. 151-158, 1996.

KRZEMINSKI, L.F.; COX, B.L.; GOSLINE R.E. Fate of radioactive melengestrol acetate in the bovine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29,p. 387–391. 1981,

LANGE, I.G.; DAXENBERGER, A.;HAGELEIT, M.; PFAFFL, M.W. & MEYER HEINRICH H. D. Non-invasive Screening for Treatment of Heifers with the Anabolic Steroid Melengestrol Acetate (MGA) by Feces Analysis. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.24(3),p. 265-272, 2003.

LASLEY, L.B; KIRKPATRICK, F.J. Monitoring Ovarian Function in Captive and Free-Ranging Wildlife by Means of Urinary and Fecal Steroids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**,v.22, n°1, p. 23-31, 1991.

LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. Caractéristiques et maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. **INRA Productions Animales**, v.18, n.1, p.3-25, 2005.

LÓPEZ-BAYGHEN, C.; ZOZAYA, H-; OCAMPO, L.; . BRUMBAUGH and SUMANO, H. Melengestrol acetate as a tool for inducing early ovulation in transitional mares. **Acta Veterinaria Hungarica** 56 (1), p. 125–131 2008

MARQUES, A.A.B; FONTANA, C. S; VÉLEZ, E; BENCKE, G.A; SCHNEIDER, M.; REIS, R.E. **Lista de referência da fauna ameaçada de extinção no Rio grande do sul: Decreto no 41.672**, Porto alegre,2002.

MARTINEZ,M. F.; KASTELIC,J. P.; ADAMS, G. P. AND MAPLETOFT, R. J .The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. **J. Anim. Sci**, v.80, p. 1746-1751, 2002.

MARTINS, G.; FIGUEIRA, L.; PENNA, B.; BRANÃO, F.; VARGES, R.A.; VASCONCELOS, C.; LILENBAUM, W. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. **Small Ruminant Research** v.81 p.182–184, 2009.

MARTINS, G.S. **Avaliação da existência de isolamento reprodutivo entre duas espécies de veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*) por meio de machos híbridos.**) Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária: Reprodução Animal) 2015- 57p. Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

MARTINS, L.T.; NETO, P.C.S.; NETO, S.G; RAUBER, L.P.; BERTOLINIL, M.; DINIZ, V, A.; MEZZALIRA, A. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. **Ciência Rural**, v.40, n°2, 2010.

MCKENZIE, S. & DEANE, E. M. Faecal corticosteroid levels as an indicator of well-being in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. **Comparative Biochemistry and Physiology – A Molecular and Integrative Physiology**, v.140, p. 81–87, 2005.

MICHELETTI, T.; BROWN, L.J.; WALTER, S.L. Monitoramento hormonal não invasivo. In: CUBAS, S.Z.;SILVA, R.J.C.; CATÃO-DIAS, L.J. **Tratado de Animais Selvagens- Medicina Veterinária**. Roca, p. 2216-2227, 2014.

MONFORT, M. S.; STEVEN L.D.V.M.;MARTINET, C AND WILDT, D. E., Urinary steroid metabolite profiles in female pre david's deer (*Elaphurus davidianus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** v.22 (1) p. 78 – 85, 1991.

MONFORT, S. L.;SCHWARTZ, C. C AND WASSER, S. K.Source Monitoring Reproduction in Captive Moose Using Urinary and Fecal Steroid Metabolites. **The Journal of Wildlife Management**, v. 57, n°2, p. 400-407, 1993.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D.; FREITAS, F. V. J.; JUNIOR, L. S. E. Controle do estro e da ovulação em ruminantes . In: GONÇALVES, P. D. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (II Ed). **Biotecnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Roca , p. 83-104, 2008.

MORRICAL, D. G.; YOUNGS, C, R.; AND MCCLAIN, A, The Influence of MGA and PG600 on the Out of Season Reproductive Performance of Ewes. **Sheep Research Report**, Paper 2.1997.

MORROW, C. J.; ASHER, G. W.; BERG, D. K.; TERVIT, H. R.; PUGH, P. A.; MCMILLAN, W. H.; BEAUMONT, S.; HALL, D. R. H.; BELL, A. C. S. Embryo-transfer in fallow deer (*Dama dama*) – superovulation, embryo recovery and laparoscopic transfer of fresh and cryopreserved embryos. **Theriogenology**, v. 42, n° 4, p. 579-590, 1994.

MORROW, C. J.; ASHER, G.W.; MACMILLAN, K. L. Oestrous synchronization in farmed fallow deer (*Dama dama*): effects of season, treatment duration and the male on the efficacy of the intravaginal CIDR device. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 159-174, 1995.

MORROW, C. J.; PENFOLD, L. M.; WOLFE, B. A. Artificial insemination in deer and non-domestic bovids. **Theriogenology**, v. 71, p. 149-165, 2009.

MORROW, C. J.;WOLFE, B. A.;ROTH, T. L.;WILDT, D. E.;BUSH, M.;BLUMER, E. S.;ATKINSON, M. W. and MONFORT, S. L. Comparing ovulation synchronization protocols for artificial insemination in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). **Animal Reproduction Science**,v.59, p.71-86. 2000

MORROW, C.J.; MONFORT, S.L. Ovarian activity in the scimitar-horned Oryx *Oryx dammah* determined by faecal steroid analysis. **Animal Reproduction Science**, v.53 p.191–207, 1998.

MULLER, E.; DUARTE, J. M. D. Utilização da citologia vaginal esfoliativa para monitoração de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). In: **Congresso da sociedade de zoológicos do brasil**, 16. Americana, SP, 1992.

OLIVEIRA, M. E. F.; BARTLEWSKI, M. P.; FELICIANO, R. A. M. Controle Do Ciclo Estral. In: OLIVEIRA, M.E.F; TEXEIRA, P.P.M; VICENTE, R.W.R. **Biotecnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**, Medvet, P 71-77, 2013

PATTERSON, D. J.; KIRACOFÉ, G. H.; STEVENSON, J. S. and CORAH, L. R. Control of the bovine estrous cycle with melengestrol acetate (MGA): A review **J. Anim. Sci**, v. 67, p. 1895-1906, 1989.

PEREIRA, R. J. G., DUARTE, J. M. B. ; J. A. NEGRAO. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). **Theriogenology**, v.63, p.2113–2125, 2005.

PEREIRA, R.J.G.; POLEGATO, B.F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J.A.; DUARTE, J.M.B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, v.65, p.387-399, 2006.

PEREIRA, R.J.G.; ZANETTI, E. S.; POLEGATO, B.F. Female reproduction. In: DUARTE, J.M.B; GONZALES, S. **Neotropical Cervidology**: FUNEP, p.51-63., 2010.

PERONI, E.F.C. **Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)**. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária: Reprodução Animal) 2013- 56p. Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

PINDER, L& LEEUWENBERG, F. Veado–Catingueiro. In:DUARTE, J. M. B. (Ed). **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal:FUNEP, P 60-66, 1997.

PLOTKA E. D. and. SEAL U. S, Fertility Control in Female White-tailed Deer. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 25, n. 4, 1989.

POLEGATO, B.F. **Validação de método endócrino não-invasivo para o monitoramento da fisiologia reprodutiva e da atividade dos glicocorticoides em cervídeos neotropicais**. 2004. 43f. Trabalho de Graduação (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

- POLEGATO, B. F. **Monitoramento do Ciclo Estral e da Gestação em Cervos-do-Pantanal *Blastocerus dichotomus*) mantidos em cativeiro**.2008- 74p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.
- POWELL, M. R.; KAPS, M.; LAMBERSON, W. R and KEISLER, D. H. Use of melengestrol acetate-based treatments to induce and synchronize estrus in seasonally anestrous ewes. **Journal Animal Science**, v.74, p. 2292-2302,1996
- PUTMAN, R. **The natural history of deer**. New York: Cornell University Press, 1988.
- QUISPE, Q. T.; QUINTERO, Z. L.; HERNANDEZ, O. A.; MENDEZ, V. J. sincronizacion de estros en ovejas mediante un tratamiento corto con acetate de melengestrol (MGA) combinado con cipionato de estradiol (ECP). **Vet. Mex.** v.26 (1), 1995.
- RAPHAEL, B. L., KALK, P., THOMAS, P., CALLE, P. P., DOHERTY, J. G. AND COOK, R. A. Use of melengestrol acetate in feed for contraception in herds of captive ungulates. **Zoo Biol**, 22, p. 455–463, 2003
- REDFORD, K. e EISENBERG, J.F. **Mammals of neotropics, The southern cone. Argentina, Uruguay, Paraguay**. University Of Chicago Press, 1992.
- REIS, N.R; PERACCHI, A.L.; FREGONEZI, M.N.; ROSSANEIS, B.K. **Mamíferos do Brasil- Guia De Identificação**. 1 edição, Techical Book Editora, Rio de Janeiro, 2010.
- RODRIGUES, T.F.; CERVEIRA, J.F.; DUARTE, J.M.B. Uso de áreas agrícolas por *Mazama gouazoubira* (Mammalia, Cervidae) no estado de São paulo. **Iheringia, Sér. Zool.** vol.104 no.4 Porto Alegre Oct./Dec. 2014
- ROLA, L.D. **Estimulação ovariana, recuperação e maturação de oócitos de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)**. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária: Reprodução Animal) 2013- 57p. Faculdade de ciências agrarias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.
- ROLLAND, R. M., HUNT, K. E., KRAUS, S. D. & WASSER, S. K. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. **General and Comparative Endocrinology**, v.142, p. 308–317, 2005.
- ROUGHTON, ROBERT D. Effects of oral melengestrol acetate on reproduction in captive white-tailed deer. **The Journal of Wildlife Management**. p. 428-436,1979.
- SÁ FILHO, O. G. S. F.; VALARELLI, R. L.;PERES, R. F. G.; HOE, F. G. H.; MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J. L. M. Avaliação do uso do acetato de melengestrol (MGA® Premix) em vacas de corte. **A Hora Veterinária** – Ano 27, nº 158, jlh/ago/2007

SADLEIR, R.M.F.S. Reproduction of female cervids. In: WEMMER, C. (Ed.). **Biology and management of the cervidae**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, p.123-144, 1987.

SAFRANSKI, T. J.; LAMBERSON, W. R AND KEISLER, D. H. Use of melengestrol acetate and gonadotropins to induce fertile estrus in seasonally anestrus ewes. **Journal Animal Science**. v.70, p. 2935-2941, 1992.

SANTOS, G.L.; CERAVOLO, L.; SOUZA, S.; DUARTE, J.M.B. Sazonalidade reprodutiva e duração do ciclo estral e do cio de fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) sob condições de cativeiro. In: **Congreso Internacional Manejo del Fauna Silvestre en Amazonía Y Latinoamericana, Cartagena**. Proceedings. P.232, 2001.

SCHWARZEMBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, v.41, p. 52-74, 2007^a.

SCHWARZEMBERGER, F. Non-invasive endocrine monitoring using fecal steroid analysis: opportunities and challenges. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.87-88, 2007^b.

SCHWARZEMBERGER, F.; MÖSTLY, E.; PALME, R.; BAMBERG, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild, and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, v.46, n.1-4, p. 515-526, 1996.

SOLER, J. P.; MUCCI, N.; KAISER, G.G.; ALLER, J.; HUNTER, J. W.; DIXON, T. E.; ALBERIO, R. H. Multiple ovulation and embryo transfer with fresh, frozen and vitrified red deer (*Cervus elaphus*) embryos in Argentina. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 322-327, 2007.

SOUZA, S. **Avaliação do perfil de progestágenos fecais durante o ciclo estral de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) em cativeiro**. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária: Reprodução Animal) 2010- 47p. Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

STANCZYK, FRANK Z. All progestins are not created equal. **Steroids**, v.68, p. 879-890, 2003

STEAD-RICHARDSON, E. J., BRADSHAW, S. D., BRADSHAW, F. J. & GAIKHORST, G. Monitoring the oestrous cycle of the chuditch (*Dasyurus geoffroii*) (Marsupialia: Dasyuridae): non-invasive analysis of faecal oestradiol-17b. **Australian Journal of Zoology**, v,49(2), p.183 – 193, 2001.

STEVENS, C. E. & I. D. HUME. Digesta transit and retention. In: STEVENS, C. E. & HUME I. D. (Eds.). **Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System**, 2nd edn. p.118–151, 1995.

STUBBINGS, R. B.; BOSU, W. T. R.; BAKER, C. A. V.; KING, G. J. Serum progesterone concentration associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. **Canadian Journal of Veterinary**, v. 50, p. 369 – 373, 1986.

SUAREZ, G. A. P.; ZUNINO, B. H.; CAROL C, R.; UNGERFELD. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. **Small Ruminant Research** v.63, p,39–43, 2006.

TAYLOR, W. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. **Vitamins and hormones**. v.29, p,201-285,1971.

TIEPOLO, L. M.; TOMAS, W. M. Ordem Artiodactyla. In: DOS REIS, N.; PERACCHI, A. L.; PEDRO W. A.; DE LIMA, I. P. (Org.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: SEMA. P.287-287,2006.

TOMAS, W.M.; TIEPOLO, L.M.; DUARTE, J.M.B. Ordem Artiodactyla. In: REIS, N.R., PERACCHI, A.L., FREGONEZI, M.N., ROSSANEIS, B.K. **Mamíferos Do Brasil: Guia De Identificação**, 2010. 503p.

UMAPATHY, G.; SONTAKKE D. S.; REDDY A.; SHIVAJI, S. seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). **Theriogenology**, v 67. P. 1371–1378. 2007.

WHITEHEAD, G.K. **The Whitehead Encyclopedia of Deer**. London: Swan Hill Press, 1993.

WILDT, D.E. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. **Animal Reproduction Science**,v.28 p.247-257, 1992.

WILLARD, S. T.; NEUENDORFF, D. A.; LEWIS, A. W.; RANDEL, R. D. A comparison of transvaginal artificial insemination procedures for use in commercially farmed deer. **Small Ruminant research**, v. 44, n. 2, p. 135-140, 2002.

WILLARD, S.T.; HUGHES, JR D.M.; BRINGARTS, M.; SASSER, R.G; WHITE, D.R.; JAQUES, J.T.; GODFREY, R.W.; WELSH, T.H.; RANDEL, R.D. Artificial insemination, hybridization and pregnancy detection in sika deer (*Cervus nippon*): **Theriogenology**,v.46, p. 779-789, 1996.

WOOD, S. L.; LUCY, M. C.; SMITH, M. F and PATTERSON, D. J. Improved synchrony of estrus and ovulation with the addition of GnRH to melengestrol acetate-prostaglandin F2alpha synchronization treatment in beef heifers. **Journal Animal Science**, v.79, p.2210-2216, 2001.

XM CHEN, WEI HJ, YANG YF, XUE HL, ZHAO WG, ZHAO M. Serum hormone concentrations and ovarian follicular wave emergence in Jilin sika deer (*Cervus nippon hortulorum*) after synchronization of estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, V.153, p.44-49, 2015.

YAMAUCHI, K.; HAMASAKI, S.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Assessment of reproductive status of Sika Deer by fecal steroid analysis. **Journal of Reproduction and Development** , v. 43, p. 221-226, 1997.

ZANETTI, E.S.; POLEGATO, F.B; DUARTE, J.M.B.Comparison of two methods of synchronization of estus in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*), **Reproductive Biology Endocrinology**, v 117, p. 266-274, 2010.

ZANETTI, E.S; MUNERATO, M.S; DUARTE, J.M.B. Comparing two different superovulation protocols on ovarian activity and fecal glucocorticoid levels in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*), **Reproductive Biology Endocrinology**,12: 24, 2014.

ZANETTI, E.S. e DUARTE, J.M.B.Comparison of two methods of synchronization of estus in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Zoo Biology**, v.31, n.6, p.642-655, 2012.

ZIMBELMAN, R.G; SMITH, L.W. Control of ovulation in cattle with melengestrol acetate. **Journal of Reproduction and Fertility**,v.11, p. 185-191, 1966.