

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

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO POUCO INVASIVO NA
SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO EM FÊMEAS DE VEADO-
CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)

Bianca Ferrari
Médica Veterinária

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

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO POUCO INVASIVO NA
SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO EM FÊMEAS DE
VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)**

Bianca Ferrari

Orientadora: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

Co-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 obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias, Área: Reprodução Animal

F375a Ferrari, Bianca
Avaliação de protocolo pouco invasivo na sincronização do estro em fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) / Bianca Ferrari. -- Jaboticabal, 2022
77 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Lindsay Unno Gimenes
Coorientador: José Maurício Barbanti Duarte

1. Metabólitos de progesterona fecal. 2. Ensaio imunoenzimático. 3. Acetato de melengestrol. 4. Progesterona de longa ação. 5. Cervídeos neotropicais. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO POUCO INVASIVO NA SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO EM FÊMEAS DE VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)

AUTORA: BIANCA FERRARI

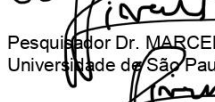
ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

COORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

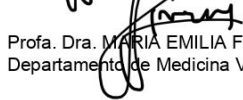
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:



Prof. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal



Pesquisador Dr. MARCEL HENRIQUE BLANK (Participação Virtual)
Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) / São Paulo/SP



Prof. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 07 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BIANCA FERRARI – Nascida em 2 de junho de 1996, na cidade de Jardinópolis, São Paulo, Brasil. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade de Franca (UNIFRAN) em fevereiro de 2014; foi estagiária contratada no Bosque e Zoológico Fábio Barreto de Ribeirão Preto, São Paulo, pelo Centro de Integração Empresa-Escola (CIEE) nos anos de 2015 e 2016; foi fundadora do Grupo de Estudos de Animais Selvagens no ano de 2016 na Universidade de Franca, e presidente nos dois primeiros anos; foi bolsista PIBIC-CNPq com projeto intitulado “Avaliação da qualidade de células espermáticas obtidas de testículos criopreservados de gatos domésticos” no ano de 2016; foi bolsista FAPESP com projeto intitulado “Efeito da adição da vitamina E ao meio diluidor na criopreservação de células espermáticas epididimais de gatos domésticos” no ano de 2017; concluiu curso superior em Medicina Veterinária em fevereiro de 2019. Em agosto de 2019 iniciou o curso de pós graduação em reprodução animal no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, com o tema apresentado nesta dissertação.

“A vida é apenas um sonho, em breve acordaremos e que alegria... quanto mais nossos sofrimentos forem grandes, tanto mais nossa glória será infinita”.

Santa Terezinha do Menino Jesus

Dedico

Aos meus pais Paulo e Cleusa e aos meus irmãos Ana e Bruno, por todo incentivo, confiança e apoio nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre foi meu alicerce em todos os momentos da minha vida. Durante toda minha vida acadêmica sempre mostrou os caminhos que eu deveria percorrer, e grata pelo NUPECCE ter feito parte disso!

À minha família, em especial, meus pais, Paulo e Cleusa, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos, pelas orações e mensagens de apoio!

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, por ter confiado a minha participação e contribuição neste Núcleo enorme, por todo apoio, incentivo e pelas críticas, que com toda certeza me fizeram crescer muito.

À Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, que sempre esteve disponível para sanar minhas inúmeras dúvidas e nunca hesitou em me ajudar.

Ao Lucas, pelas conversas de apoio e força durante todo meu período de mestrado, e também por ter me ajudado ativamente no meu projeto, me acompanhando em várias idas à noite ao NUPECCE para fazer coletas!

Ao David, pelos vários puxões de orelha e por ter uma participação essencial no meu mestrado, pela imensa ajuda nas dosagens hormonais. Obrigada pela paciência e companheirismo!

Ao técnico do laboratório João Airton Bôer por toda a ajuda no laboratório e preparo dos reagentes.

A todos os integrantes e colegas do NUPECCE por todas as conversas de descontração, os inúmeros cafés a tarde, em especial à Maria Helena, Valdir e Yuki pela ajuda no manejo dos animais, à Gabrielle, Bel, Marina, Cláudia por todas as conversas de descontração e trabalho em equipe.

A todos os animais do NUPECCE, em especial, Amora, Vênus, Pinga, Sunshine e Bill que mesmo não escolherem, “dão” suas vidas para que as pesquisas em prol da conservação continuem.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS..... | ii |
| RESUMO..... | iii |
| ABSTRACT..... | iv |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | v |
| LISTA DE TABELAS..... | vi |
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 O <i>Mazama gouazoubira</i> | 3 |
| 2.2 Fisiologia e comportamento reprodutivo..... | 5 |
| 2.3 Sincronização do estro..... | 9 |
| 2.4 Acetato de melengestrol..... | 13 |
| 2.5 Progesterona de longa ação..... | 16 |
| 2.6 Monitoramento endócrino não invasivo..... | 20 |
| 3. MATERIAL E MÉTODO..... | 22 |
| 3.1 Animais e local de estudo..... | 22 |
| 3.2 Delineamento experimental..... | 23 |
| 3.3 Tratamentos..... | 23 |
| 3.4 Detecção do estro e dados comportamentais..... | 27 |
| 3.5 Avaliação da sincronização do estro..... | 27 |
| 3.6 Colheita de fezes e extração de esteroides fecais..... | 28 |
| 3.7 Validação hormonal e ensaio imunoenzimático (EIA)..... | 28 |
| 3.8 Análises estatísticas..... | 29 |
| 4. RESULTADOS..... | 30 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 34 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 38 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 38 |

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação de protocolo pouco invasivo na sincronização do estro em fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)**”, protocolo nº 012090/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 10 de outubro de 2019.

| | |
|---------------------|---------------------------|
| Vigência do Projeto | 03/02/2020 a 05/07/2021 |
| Espécie / Linhagem | <i>Mazama gouazoubira</i> |
| Nº de animais | 5 |
| Peso / Idade | 17 kg / 3 a 9 anos |
| Sexo | Fêmea e macho |
| Origem | NUPECCE |

Jaboticabal, 10 de outubro de 2019.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO POUCO INVASIVO NA SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO EM FÊMEAS DE VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)

RESUMO - Este estudo objetivou avaliar protocolos pouco invasivos na sincronização do estro em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*). Quatro fêmeas foram submetidas a um delineamento experimental em quadrado latino, em quatro tratamentos diferentes. Todas as fêmeas receberam 0,25mg de benzoato de estradiol no primeiro dia do tratamento, além de uma fonte diferente de progesterona. O tratamento DIP recebeu um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DIP) por oito dias; o tratamento MGA1x recebeu uma dose oral (de manhã) de 1mg de acetato de melengestrol por oito dias; o tratamento MGA 2x recebeu duas doses orais (manhã e tarde) de 0,5mg de MGA por oito dias; o tratamento P4LA recebeu uma dose única de 75mg de progesterona injetável de longa ação (P4LA) IM. Todas as fêmeas receberam uma dose de 265µg de prostaglandina (PGF2α) IM oito dias após o início dos tratamentos. A eficácia dos tratamentos foi avaliada por meio da manifestação do estro após o tratamento e a concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM). O intervalo entre a aplicação de PGF2α e início do estro no tratamento P4LA foi significativamente mais longo ($180 \pm 38,9$ horas) comparado ao tratamento DIP ($63 \pm 6,6$ horas), tratamento MGA1x ($53 \pm 14,4$ horas) e tratamento MGA2x ($41 \pm 10,1$ horas) ($P < 0,05$). De acordo com a linha basal individual de FPM e da concentração de FPM ao longo dos dias após o estro comportamental, a formação do corpo lúteo é sugestiva em todas as fêmeas que responderam aos tratamentos (93,75%). A baixa sincronia e longo tempo de início ao estro sugerem que a dose de P4LA (75mg) é muito alta e não efetiva para *M. gouazoubira*. Os tratamentos DIP, MGA 1x e MGA 2x, foram efetivos na sincronização do estro na espécie.

Palavras-chave: Metabólitos de progesterona fecal; Ensaio imunoenzimático; Acetato de melengestrol; Progesterona de longa ação; Cervídeos neotropicais.

EVALUATION OF A MINIMALLY INVASIVE PROTOCOL IN THE SYNCHRONIZATION OF ESTRUS IN BROWN BROCKET DEER (*Mazama gouazoubira*)

ABSTRACT – This study aimed to evaluate low-invasive protocols for estrus synchronization in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). Four females were submitted to a Latin square design in four different treatments. All females received 0.25mg of estradiol benzoate on first day of treatment; also, at D-8, each female received a different source of progesterone. DIP treatment received an intravaginal progesterone releasing device for 8 days; MGA1x treatment received one oral dose (in the morning) of 1mg melengestrol acetate for eight days; MGA2x treatment received two oral doses (morning and afternoon) of 0.5mg of MGA for eight days; P4LA treatment received a unique i.m. administration of 75mg of long-acting progesterone. All females received one i.m. administration of 265µg of prostaglandin (PGF2α) eight days after the beginning of treatments. Treatment efficacy was evaluated by the manifestation of estrus after treatment and fecal progesterone metabolites (FPM) concentration. Interval between administration of PGF2α and onset of estrus in P4LA treatment was significantly longer (180 ± 38.9 hours) compared to DIP treatment (63 ± 6.6 hours), MGA1x treatment (53 ± 14.4 hours) and MGA2x treatment (41 ± 10.1 hours) ($P < 0.05$). According to individual baseline FPM and FPM concentration over the days after estrus, the corpus luteum formation is suggested in all females that responded to the treatments (93.75%). Low synchrony and longer time to onset of estrus suggest that the P4LA dose (75mg) is too high and not effective for *M. gouazoubira*. DIP, MGA 1x (despite the lower synchrony) and MGA 2x were effective in estrus synchronization.

Keywords: Fecal progesterone metabolites; Enzyme immunoassay; Melengestrol acetate; Long-acting progesterone; Neotropical deer.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------------|--|
| AMPc | Monofostato de adenosina |
| BE | Benzoato de estradiol |
| CE | Cipionato de estradiol |
| CL | Corpo lúteo |
| DIP | Dispositivo intravaginal liberador de progesterona |
| E2 | Estrógeno |
| eCG | Gonadotrofina coriônica equina |
| EIA | Ensaio Imunoenzimático |
| FPM | Metabólitos de progesterona fecal |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofinas |
| hCG | Gonadotrofina coriônica humana |
| IA | Inseminação artificial |
| IATF | Inseminação artificial em tempo fixo |
| LH | Hormônio luteinizante |
| IM | Intramuscular |
| MGA | Acetato de melengestrol |
| MPA | Acetato de medroxiprogesterona |
| <i>M. gouazoubira</i> | <i>Mazama goauzoubira</i> |
| P4 | Progesterona |
| P4LA | Progesterona injetável de longa ação |
| PGF2α | Prostaglandina |
| SC | Subcutânea |
| TE | Transferência de embrião |
| VE | Valerato de estradiol |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação e histórico reprodutivo dos indivíduos da espécie *Mazama gouazoubira* utilizados neste estudo.....**23**

Tabela 2. Representação em quadrado latino dos quatro tratamentos distribuídos aleatoriamente em quatro períodos diferentes.....**23**

Tabela 3. O intervalo entre a aplicação de PGF2A e início do estro, sincronia e duração do estro de quatro fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* no tratamento DIP (dispositivo intravaginal por oito dias), tratamento MGA 1x (1mg de MGA oferecida no período da manhã por oito dias), tratamento MGA 2x (0,5mg de MGA oferecida de manhã e 0,5mg a tarde por oito dias) e tratamento P4LA (75mg de P4LA no primeiro dia do tratamento).....**32**

Tabela 4. Média \pm erro padrão dos períodos experimentais (I, II, III e IV) e das fêmeas (A, B, C e D) nas variáveis intervalo PGF2 α - estro (horas) e duração do estro (horas).....**33**

Tabela 5. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) de quatro fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* no D0 e D9 do tratamento DIP (dispositivo intravaginal durante oito dias), tratamento MGA1x (1mg de MGA oferecida no período da manhã durante oito dias), tratamento MGA2x (0,5mg de MGA oferecida de manhã e 0,5mg a tarde durante oito dias) e tratamento P4LA (75mg de P4LA no primeiro dia do tratamento).....**37**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar fêmea da espécie *Mazama gouazoubira*.....4
- Figura 2.** Distribuição geográfica do *Mazama gouazoubira*.....5
- Figura 3.** Diagrama esquemático do modelo experimental dos quatros tratamentos realizados na espécie *Mazama gouazoubira*. Tratamento 1: dispositivo intravaginal de progesterona (DIP) do D-8 ao D0; Tratamento 2: 1mg de acetato de melengestrol (MGA) no período da manhã do D-8 ao D0; Tratamento 3: 0,5mg de MGA no período da manhã e tarde do D-8 ao D0; Tratamento: administração de 75mg de P4LA no período da manhã no D-8. Administração de Benzoato de estradiol (BE) no D-8 e cloprostenol sódico (PGF2 α) no D0. D-38 ao D0: detecção do estro natural antes de começar cada tratamento; D-8 ao D0: detecção do estro duas vezes ao dia; D1 ao D6: detecção do estro seis vezes ao dia; D7 ao D12: detecção do estro duas vezes ao dia.....24
- Figura 4.** Caixa de contenção onde os fármacos foram administrados via intramuscular na espécie *Mazama gouazoubira*.....25
- Figura 5.** (A): Contenção física manual de fêmea de *Mazama gouazoubira* para inserção do dispositivo intravaginal de progesterona com o auxílio de um aplicador; (B) Dispositivo intravaginal de progesterona no canal vaginal.....26
- Figura 6.** Mistura de banana amassada com acetato de melengestrol (MGA) com alta aceitabilidade pelas fêmeas.....26

Figura 7. (A) e (B) Hiperemia vulvar e secreção vaginal mucoide de fêmea de *Mazama gouazoubira* em período de estro.....27

Figura 8. Resultado do teste de paralelismo da dosagem de progesterona com a disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada do pool das amostras fecais.....29

Figura 9. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) (ng/g fezes) de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira* (Fêmeas: A, B, C e D) durante o tratamento DIP (dispositivo intravaginal liberador de progesterona) por oito dias. A seta preta representa a administração de cloprostenol sódico (PGF₂α) e a barra preta indica os períodos de estro comportamental.....31

Figura 10. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) (ng/g fezes) de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira* (Fêmeas: A, B, C e D) durante o tratamento MGA1x (1mg de MGA no período da manhã) por oito dias. A seta preta representa a administração de cloprostenol sódico (PGF₂α) e a barra preta indica os períodos de estro comportamental.....32

Figura 11. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) (ng/g fezes) de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira* (Fêmeas: A, B, C e D) durante o tratamento MGA2x (0,5mg de MGA no período da manhã e 0,5mg no período da tarde) por oito dias. A seta preta representa a administração de cloprostenol sódico (PGF₂α) e a barra preta indica os períodos de estro comportamental. (*) indica suspeita de estro comportamental.....34

Figura 12. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) (ng/g fezes) de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira* (Fêmeas: A, B, C e D) durante

o tratamento P4LA (administração de 75mg de P4LA no período da manhã no primeiro dia do tratamento). A seta vermelha representa a administração da P4LA. A seta preta representa a administração de cloprostenol sódico (PGF2 α) e a barra preta indica os períodos de estro comportamental.....**35**

Figura 13. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira*: A, B, C e D, a partir de um dia após o último dia de estro comportamental (D0) até dez dias após o estro (D9), após o tratamento DIP, tratamento MGA1x, tratamento MGA2x e tratamento P4LA, respectivamente. Linha tracejada: concentração basal dos metabólitos de progesterona fecal. Concentração acima deste limite sugere formação de corpo lúteo.....**37**

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A diminuição progressiva da população de cervídeos neotropicais pode comprometer a variabilidade genética, aumentar a endogamia e, conseqüentemente, acelerar o processo de extinção (Duarte, 2005). Nesse cenário, o desenvolvimento das biotécnicas reprodutivas em espécies selvagens é apropriado para o manejo genético dessas populações; além disso, contribui para os bancos de germoplasma para as futuras aplicações na conservação (Roldan et al., 2006).

O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) é a espécie de cervídeo mais comum em cativeiro no Brasil, classificado como “pouco preocupante” pela Lista Vermelha da IUCN (Black-decima e Vogliotti, 2016). Por isso, tem sido utilizado como um modelo experimental para as biotécnicas reprodutivas, objetivando esclarecer aspectos reprodutivos limitantes em cervídeos neotropicais e contribuir com a sua conservação (Zanetti et al., 2010). Essa espécie é classificada como reprodutor poliéstrico não sazonal com duração média do ciclo estral de $26,9 \pm 1,7$ dias e duração média do estro comportamental de $2,3 \pm 0,2$ horas (Pereira et al., 2006).

O controle do momento preciso do estro e da ovulação é essencial para o sucesso de algumas biotecnologias reprodutivas (Asher et al., 1992). Por isso, a sincronização do estro permite predeterminar o intervalo específico para a sua manifestação, tornando dispensável a detecção do estro natural (Hodges, 1996). Os protocolos hormonais podem ser realizados a base de progesterona/progestágenos, prostaglandina (PGF 2α) ou a associação de ambos (Hosack et al., 1999; Morrow et al., 2020; Islam, 2011).

Algumas biotecnologias reprodutivas utilizadas em espécies de cervídeos são protocolos adaptados de ruminantes domésticos devido à similaridade fisiológica (Morrow et al., 2009). Os dispositivos intravaginais de progesterona (DIP) são amplamente empregados com sucesso na sincronização do estro em espécies de cervídeos de zonas temperadas (Morrow et al., 1992; Asher et al., 1992; Hosack et al., 1999) e poucos relatos em cervídeos de zonas tropicais (Zanetti et al., 2010; Cursino et al., 2014; Galindo et al., 2015). Entretanto, o uso

de DIP em cervídeos é limitado devido à alta susceptibilidade desses animais ao estresse, o que poderia causar um aumento na concentração de progesterona pelas glândulas adrenais, interferindo nas dosagens hormonais (Monfort et al., 1990; Landaeta-hernandez et al., 2002). Por isso, o acetato de melengestrol (MGA) surge como um progestágeno oral altamente palatável, com alta aplicabilidade em cervídeos. A dose diária sugerida para ovelhas (0,25mg) resultou em baixa resposta ao estro após o tratamento (Orjuela, 2016), assim como a dose indicada para a espécie bovina (0,5mg/dia) (Tanaka et al., 2020), ambos estudos realizados em *Mazama gouazoubira*. Entretanto, a dose de 1mg/dia sugere um efeito supressivo no estro comportamental (Tanaka et al., 2020), o mesmo observado em outras espécies de ungulados (Raphael et al., 2003; Patton et al., 2007). Por outro lado, uma única administração de progesterona injetável de longa ação tem sido estudada para protocolos de sincronização em vacas (Campos et al., 2016; Rocha et al., 2011), entretanto, não há relatos de seu uso em cervídeos.

Um método confiável para monitorar a funcionalidade ovariana é medir as flutuações cíclicas das concentrações de progesterona, sugerindo a presença de um corpo lúteo funcional (Thompson et al., 1998). Além disso, para evitar contenção física ou química durante a colheita de amostras biológicas devido às reações de estresse, os métodos de monitoramento não invasivo são as melhores opções (Christofollett, 2010). As análises hormonais fecais têm sido descritas em várias espécies de cervídeos como *Odocoileus virginianus* (Knox et al., 1992), *Cervus canadenses* (Garrot et al., 1998), *Rucervus eldii* (Monfort et al., 1990) e *Mazama gouazoubira* (Pereira et al., 2006). No entanto, ao contrário das amostras de sangue que expressam a concentração imediata do hormônio, as fezes de ruminantes fornecem um pool de concentração de metabólitos hormonais, refletindo uma média de 12 a 24 horas de oscilação (Morrow e Monfort, 1998; Thompson et al., 1998).

Portanto, o presente estudo objetivou protocolos pouco invasivos na sincronização do estro em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), avaliar o intervalo entre a administração de PGF2 α e início do estro e duração do estro, e a ocorrência de ovulação por meio das concentrações dos metabólitos de progesterona fecal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O *Mazama gouazoubira*

Há no Brasil, oito espécies descritas da família *Cervidae*, sendo elas: cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), veado-mateiro (*Mazama americana*), veado-mão-curta (*Mazama nana*), veado-roxo (*Mazama nemorivaga*) e veado-mateiro-pequeno (*Mazama bororo*) (Duarte, 1996). Os gêneros pertencem à ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, infraordem Pecora, superfamília Cervoidea, família Cervidae, subfamília Odocoileinae e tribo Odocoileini (Rossi, 2000).

O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) (Figura 1) é a espécie mais abundante de cervídeo que integra a fauna brasileira (Duarte, 1997). É um cervídeo considerado de pequeno a médio porte, com peso variando de 11 a 25 quilos e altura média de 50 cm (Rossi, 2000). A coloração da pelagem é muito variável e pode ser encontrada desde o cinza escuro até o marrom avermelhado (Pinder e Leeuwenberg, 1997). A porção ventral é baia e a face medial da cauda e a face interna da orelha são brancas. A maior parte dos representantes dessa espécie possuem uma pinta branca acima dos olhos, a qual é considerada uma característica particular do *Mazama gouazoubira*. Todos os machos do gênero *Mazama* possuem chifres simples, sem ramificações (Duarte, 1996).

Possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sul do México até o norte da Argentina (Figura 2). No Brasil, é encontrado em todos os biomas. Ocupa uma variedade considerável de ambientes, desde florestas densas contínuas a savanas abertas com pouca presença de mata (Duarte et al., 2012). Possui como característica a “plasticidade ecológica”, devido a essa adaptação de habitat da espécie, assim como pela sua presença em canaviais e plantios de eucalipto e pinheiro (Rodrigues et al., 2014). Essa vasta ocupação por diversos ecossistemas e regimes estacionais pode influenciar sobre seus aspectos ecológicos como seleção, dieta, densidade e reprodução. Ademais, essa adaptação do *Mazama gouazoubira* ocasionou modificações morfológicas e

genéticas importantes, levando ao desenvolvimento de várias subespécies (Pinder e Leeuwenberg, 1997).



Figura 1. Exemplar fêmea da espécie *Mazama gouazoubira*
(Foto: J. M. B. Duarte)

Outro exemplo de sua vantagem adaptativa é a relação disponibilidade alimentar/nutricional e reprodução. Muitas espécies de cervídeos sofrem diretamente um desequilíbrio reprodutivo devido à escassez de alimentos. Porém, esse não é o caso do *Mazama gouazoubira*, uma vez que os acasalamentos podem ocorrer em qualquer período do ano, independentemente de restrição alimentar (Fradrich, 1987; Pinder e Leeuwenberg, 1997; Barrozo et al., 2001).

O status de conservação da espécie é classificado como “*least concern/* pouco preocupante” (LC), ou seja, não possui risco iminente à sua sobrevivência, segundo a Lista Vermelha da IUCN (2015). Entretanto, no Brasil, as classificações são variáveis, dependendo da região analisada. No Rio Grande do Sul, a espécie é considerada como vulnerável (Marques et al., 2002) e no Rio de Janeiro, é ameaçada de extinção (Bergallo et al., 2000).

Por ser considerada a espécie mais difundida em cativeiro e pela acessibilidade de seus dados reprodutivos, é considerada como modelo

experimental para conservação e estudos dos demais cervídeos neotropicais, através de validações de biotécnicas reprodutivas.



Figura 2. Distribuição geográfica do *Mazama gouazoubira* (Fonte: IUCN 2016)

2.2 Fisiologia e comportamento reprodutivo

Embora haja pouco conhecimento sobre o ciclo reprodutivo dessa espécie, acredita-se que a maturidade sexual ocorre aos 18 meses de idade nas fêmeas, de acordo com o status nutricional do animal (Putman, 1988). O ciclo estral é classificado como poliéstrico não sazonal, segundo dados obtidos de estudos comportamentais, com duração média de $26,9 \pm 1,7$ dias (variação de 21 a 37 dias) e duração média do estro de $2,3 \pm 0,2$ dias (variação de 1 a 4 dias). O *Mazama gouazoubira* é considerado uma espécie unípara, igualmente à maioria das espécies de cervídeos (Pinder e Leeuwenberg, 2007), porém há relatos de ocorrência de gestação gemelar (Sadleir, 1987; Whitehead, 1996). O período de gestação varia entre 208 e 215 dias, podendo ocorrer estro pós-parto, evidenciando a ausência de sazonalidade reprodutiva (Polegato e Duarte, 2003; Pereira et al., 2006).

Assim como as outras espécies ruminantes, a fase luteínica do ciclo estral representa o período desde a ovulação até a ocorrência da luteólise, e a fase interluteal, consiste no final do recrutamento folicular até o momento da ovulação (Locatelli e Mermillod, 2005). Durante essas fases, as gonadotrofinas interferem desde os processos de foliculogênese e gametogênese até o momento da ovulação e regressão do corpo lúteo. A regulação da síntese e secreção das gonadotrofinas abrange uma sintonia entre interações hormonais que atuam no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, promovendo desenvolvimento, recrutamento e atresia de folículos ovarianos (Kojima, 2003). Os estímulos endócrinos e neuroendócrinos regulam a secreção do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH) pela hipófise anterior, resultante do estímulo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), sintetizado e liberado pelo hipotálamo (Schally et al., 1971). O FSH possui ação fundamental sobre o desenvolvimento e recrutamento folicular em ruminantes domésticos (Ireland, 1987). Além disso, estimula as células da granulosa a produzirem a enzima aromatase, responsável pela conversão da testosterona em estrógeno (McNatty et al., 1984). Durante cada ciclo estral, uma corte de folículos é recrutada para se desenvolver de forma sequencial seguindo o padrão de ondas foliculares (em média de 2 a 3 ondas por ciclo) (Ginther et al., 2003). Cada onda folicular possui três fases distintas: o **recrutamento** de pequenos folículos antrais dependentes de gonadotrofinas que se desenvolvem após estímulos iniciais, principalmente do FSH; posteriormente, os folículos são selecionados (**seleção**) de acordo com o número específico de ovulação de cada espécie, em apenas um (em espécies monovulares, incluindo ungulados) ou mais (em espécies poliovulares) para continuarem o crescimento, e regressão dos demais; e a **dominância**, estágio em que os folículos são funcionalmente dominantes, com capacidade ovulatória após a regressão luteal (Kojima, 2003; Fortune, 1994). Sugere-se que a capacidade ovulatória do folículo dominante está relacionada com o aumento de receptores de LH nas células da granulosa e que essa alteração pode influenciar no crescimento final do folículo dominante (Sartori et al., 2001). Logo no início do estágio de dominância, o maior folículo é responsável pela secreção de estradiol (conhecido como o inibidor mais potente do FSH) (Kojima, 2003), o qual está envolvido na regulação das concentrações de FSH (Ginther et al., 1999; 2000). Conforme há o crescimento progressivo dos folículos e

conseqüentemente, a produção de estradiol, o número de receptores para LH aumentam nas células da teca e granulosa. Assim, o aumento da responsividade dos folículos aos pulsos frequentes de LH (- e posteriormente pico pré ovulatório de LH-) confere o desenvolvimento final e maturação do folículo e posteriormente, a indução da ovulação (Hansel e Convey, 1983; Walters et al., 1984).

Muitos aspectos relacionados à fisiologia do ciclo estral em cervídeos são desconhecidos, entretanto, os poucos estudos que existem sobre dinâmica folicular foram realizados em *Cervus elaphus*. Asher et al. (1997) relataram que o número total de folículos com diâmetro maior que 3mm não teve variação significativa durante as fases do ciclo. Contudo, a emergência de novos folículos (diâmetro maior ou igual a 3mm) foi significativamente diferente entre o 1º e o 14º dia após a ocorrência da ovulação, sugerindo que houve dominância folicular. McLeod et al. (2001) avaliaram a dinâmica folicular na mesma espécie, em condições *in vitro*, por meio da obtenção de folículos de indivíduos ovariectomizados em diferentes fases após protocolos utilizando dispositivos intravaginais. Assim, foi possível concluir que a dinâmica folicular em *Cervus elaphus* é semelhante aos outros ruminantes monovulares. Os folículos antrais possuíam diâmetro de $8,3 \pm 0,38$ mm e concentrações elevadas de monofosfato de adenosina (AMPC), estradiol e aromatase.

Além da atuação direta das gonadotrofinas no processo luteínico, a formação do corpo lúteo é estabelecida devido a um conjunto de alterações bioquímicas e morfológicas nas células da teca interna do folículo pré-ovulatório. A função primordial do corpo lúteo é a produção de progesterona tanto em ciclos de animais não prenhes quanto em animais gestantes (Schams e Berisha, 2004). A concentração de progesterona no sangue começa a aumentar desde o desenvolvimento do corpo lúteo, atingindo níveis altos até o estágio final de presença do corpo lúteo e posteriormente, a capacidade de produção diminui de forma considerável em decorrência do estágio lúteo em regressão (Skarzynski et al., 2008). Sabe-se que em animais domésticos, há vários moduladores que atuam durante a fase luteal, entretanto, o LH secretado de forma pulsátil é um dos reguladores mais potentes na síntese e liberação de progesterona pelo corpo lúteo. Conseqüentemente, durante a regressão do corpo lúteo, a

diminuição nos níveis de progesterona está diretamente relacionada com a redução do fluxo sanguíneo e à perda de receptores de LH no corpo lúteo (Niswender et al., 1976).

A progesterona assim como os corticosteroides, estrógenos e andrógenos, são hormônios pertencentes à classe dos esteroides (Mann; lamming, 2001). Além de possuir como função o bloqueio da manifestação do estro e ovulação, a P4, normalmente secretada pelo CL, é fundamental para manutenção do feto e o tônus uterino durante a gestação (Gomes et al., 1965). A placenta produz progesterona no período gestacional, porém, a quantidade de P4 depende do crescimento placentário (Zander e Von Munstermann, 1956); e, além disso, há relatos de sua produção pelo córtex adrenal (Balfour et al., 1957; Klopper et al., 1957).

O processo de regressão luteal (denominado luteólise) é fundamental para o retorno da ciclicidade ovariana, o que possibilita a formação de um novo folículo ovulatório. Em *Dama dama* e em *Cervus elaphus*, a luteólise provavelmente acontece devido à associação da ocitocina luteal e a produção de prostaglandina pelo endométrio, assim como descrita em outros ruminantes (Skarzynski et al., 2008), entre os dias 16 e 20 do ciclo estral (Asher et al., 1988; Bainbridge et al., 1996).

Contudo, o monitoramento preciso da fisiologia ovariana assim como a compreensão de aspectos reprodutivos essenciais, são pontos extremamente delicados em espécies selvagens. Caracterizar a dinâmica folicular e determinar o momento exato para realização de uma inseminação artificial, por exemplo, é um fator limitante e irreal em cervídeos (Sontakke et al., 2018).

A expressão de comportamento reprodutivo, caracterizado por diversos sinais, é um dos métodos mais importantes e relevantes de avaliação de ciclo estral nas espécies selvagens. Em ruminantes domésticos, durante o período de estro, é comum ser observado sinais bem marcantes como receptividade ao macho, inquietação, vocalização, micção frequente e secreção vaginal mucoide, o que influencia positivamente no momento de inseminação ou monta natural (Rao et al., 2013). Li et al. (2001), observaram micção frequente e receptividade ao macho em *Elaphurus davidianus*. Além disso, foi também relatado reflexo de

parada ao manuseio por tratadores em algumas espécies de cervídeos como *Rucervus eldii* e *Cervus elaphus* (Krzywinski et al., 1978; Hosack et al., 1997). Em algumas espécies de cervídeos neotropicais como *Blastocerus dichotomus*, *Mazama americana* e *Mazama nemorivaga*, foram observados sinais de estro como hiperemia vulvar, aumento na taxa de micção, pouca reatividade estressante na presença de pessoas e reflexo de parada com um rápido levantamento da cauda (Krepschi et al., 2013; Polegato et al., 2018; Oliveira et al., 2016).

2.3 Sincronização do estro

Para obtenção de sucesso reprodutivo em fêmeas é fundamental o conhecimento de aspectos que envolvem a fisiologia ovariana, a fim de auxiliar no manejo desses animais em cativeiro, como também aprimorar as biotécnicas de reprodução assistida para aplicabilidade na conservação de espécies ameaçadas (Sontakke et al., 2018).

As biotécnicas reprodutivas como inseminação artificial (IA) e transferência de embrião (TE) são ferramentas essenciais para aumentar a taxa de ganho genético nas espécies domésticas, como a bovina. Por esse motivo, essas manipulações reprodutivas possuem efeito promissor na conservação de espécies de mamíferos ameaçados de extinção, como uma prevenção da endogamia de populações cativas (no caso, a inseminação artificial), ou por aumentar o número populacional por meio de programas de substituição de espécies (como exemplo, a transferência de embrião) (Asher et al., 1992). Essas biotécnicas foram aplicadas em algumas espécies de cervídeos de criadouros como o *Cervus elaphus* (Asher et al., 1988a; Fennessy et al., 1989, 1990) e *Dama dama* (Asher et al., 1988b, 1990; Jabbour et al., 1993), com graus diferentes de eficácia. O sucesso da IA e TE estão diretamente relacionados e totalmente dependentes de biotécnicas eficazes de controle do estro e ovulação (Asher et al., 1992). A utilização de protocolos de sincronização do estro permite a manipulação do ciclo estral ou indução de um grupo de animais a manifestarem

estro comportamental em um período predeterminado, sem a necessidade de detecção do estro natural (Odde, 1990; Hodges, 1996).

Essa biotécnica consiste basicamente na administração de hormônios como: progesterona/ progestágenos, prostaglandinas (ou análogos sintéticos), ou a associação destes (Hosack et al., 1999; Morrow et al., 2020; Islam, 2011), cada um com uma função específica e um mecanismo de ação diferente na gônada ovariana (Sontakke et al., 2018). Os hormônios utilizados atuam no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, podendo interferir na duração da fase lútea do ciclo estral ou no manejo de espécies sazonais, alterando o padrão de reprodução anual (Oliveira et al., 2013). A finalidade das associações hormonais em protocolos de sincronização com as fontes de progesterona é promover a lise do corpo lúteo, sincronizar as ondas foliculares e conseqüentemente, da ovulação (Moraes et al., 2008).

Um dos protocolos estabelecidos para a sincronização do estro é o uso de agentes luteolíticos (regressão do corpo lúteo) como a prostaglandina ou seus análogos sintéticos, responsáveis por controlar a duração da fase luteal (Sontakke et al., 2018). O reconhecimento da prostaglandina como agente luteolítico ocorreu na década de 70 (Rowson et al., 1972), na espécie bovina, utilizando uma dupla administração desse hormônio com 10 a 14 dias de intervalo entre elas (Macmillan et al., 1982). O uso da PGF2 α também pode ser empregado em protocolos associados à progesterona/ progestágenos em um dia específico (Moraes et al., 2008; Hosack et al., 1999). Entretanto, sua aplicação é somente efetiva se houver a presença de um corpo lúteo responsivo (Beal et al., 1990), por isso, há limitações de seu uso na sincronização do estro em espécies de cervídeos sazonais (Sontakke et al., 2018).

A progesterona ou análogos sintéticos da progesterona (progestágenos) podem ser originados e apresentados de diversas fontes e formas, como implantes auriculares subcutâneos, esponjas ou dispositivos intravaginais, administração oral e injetáveis (Sontakke et al., 2018; Islam, 2011, Hameed et al., 2020). A ação dos protocolos de sincronização a base de progesterona é suprimir a atividade ovariana, mantendo altos níveis do hormônio no sangue mesmo após a regressão do corpo lúteo (Islam, 2011). A sua função é inibir a

síntese e a secreção do hormônio GnRH e conseqüentemente, inibir o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante, impedindo a ocorrência da ovulação enquanto o tratamento com progesterona não é cessado (Densmore et al., 1987). Após a interrupção do tratamento com progestágenos/progesterona e a aplicação de um agente luteolítico, é esperado que os níveis de progesterona endógeno (proveniente do corpo lúteo) e exógeno (tratamento hormonal) diminuam gradativamente, ocorrendo maturação folicular e ovulação (Mauleon, 1974).

A adição de estrógeno (E2) em protocolos de sincronização a base de progesterona teve como intuito inicial a ocorrência de luteólise (Fanning et al., 1992). Entretanto, foi observado que essa associação promoveu atresia do folículo dominante e sincronia da emergência da onda folicular. A utilização de E2 mais P4 leva a uma diminuição dos níveis séricos de FSH e LH, causando conseqüentemente, regressão dos folículos que são dependentes das gonadotrofinas. Após a metabolização do estrógeno, e interrupção do feedback negativo para FSH, há a emergência de uma nova onda folicular (Bó et al., 1995). Conseqüentemente, foi observado que essa associação promoveu maior incidência de estro e taxa de prenhez em novilhas (Patterson et al., 1990; Rasby et al., 1998). Existem diferentes fontes de estrógeno exógeno utilizados em protocolos de sincronização, tais como: benzoato de estradiol (BE), valerato de estradiol (VE) e cipionato de estradiol (CE). O valerato e o cipionato apresentam meia vida longa e por isso, podem causar dispersão na emergência das ondas (Colazo et al., 2003), à medida que o benzoato possui uma meia vida menor, conferindo melhor sincronia da onda folicular (Sá Filho et al., 2004).

O uso dos dispositivos intravaginais liberadores de progesterona (DIP) tem sido realizado com sucesso na sincronização do estro em várias espécies de cervídeos de zonas temperadas como *Dama dama* (Morrow, 1992), *Cervus elaphus* (Asher et al., 1992; Ekrami et al., 2012), *Rucervus eldii* (Hosack et al., 1999), *Odocoileus virginianus* (Gentry et al., 2012); e alguns relatos em espécies de zonas tropicais, como *Mazama gouazoubira* (Zanetti et al., 2010; 2014) e *Blastocerus dichotomus* (Galindo et al., 2015). Sabe-se que a inserção do DIP contendo 0,33g de progesterona em ovelhas e cabras, resulta em um rápido aumento desse hormônio no sangue (>5ng/mL) durante 4 a 5 dias de tratamento,

aproximadamente (Menchaca e Rubianes, 2004), concentração semelhante àquela observada na fase luteal médio-tardia. Contudo, após 6 a 7 dias de tratamento, as concentrações de progesterona no sangue diminuem a níveis subluteais ($<2\text{ng/mL}$), o suficiente para bloquear o processo ovulatório, porém, pode provocar a persistência de um folículo dominante. Por isso, se o DIP permanecer por aproximadamente 12 a 14 dias, devido às condições dos níveis baixos de progesterona no organismo por um longo período, pode resultar em um crescimento persistente do folículo dominante e, conseqüentemente, em baixa taxa de fertilidade (Menchaca et al., 2017). Morrow et al. (1995), observaram que fêmeas de *Dama dama* submetidas à sincronização do estro com DIP por um longo período de 17 e 20 dias e aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ 48 horas após a inserção apresentaram ótima resposta ao estro de 100% e 94%, respectivamente, contudo, foi observado baixa taxa de prenhez, de 44% e 60%, respectivamente. Em alguns casos, o DIP pode ser substituído após 8 a 10 dias após a inserção do primeiro ou iniciar um protocolo com a inserção de dois dispositivos, ambos com o intuito de manter os níveis de progesterona até o final do tratamento (Fennessy et al., 1989). Zanetti et al. (2010), sincronizaram seis fêmeas de *Mazama gouazoubira* com DIP durante oito dias e aplicação de cloprostenol no dia da remoção do dispositivo. Todas as fêmeas manifestaram estro comportamental após o final do tratamento, com uma variação de tempo de início ao estro de $70,5 \pm 5,00$ horas, sincronia do estro de 36 horas e diâmetro do corpo lúteo de $4,85 \pm 0,74\text{mm}$.

Apesar das vantagens e alta aplicabilidade em protocolos hormonais, a utilização do DIP requer contenção física (manual) ou química, o que pode levar a um alto nível de estresse e conseqüentemente influenciar no manejo animal e nas dosagens hormonais (Dias, 1997; Bainbridge e Jabbour, 1998). O DIP é inserido por meio de um aplicador específico (modelo para grandes e pequenos ruminantes domésticos), sendo que, uma das extremidades fica em contato com a mucosa vaginal e a outra fica voltada para o meio externo para facilitar a remoção do DIP após o tratamento hormonal (Mapletoft et al., 2003). Nesse caso, os DIP podem causar processos inflamatórios, vaginites e até perda dos dispositivos durante o tratamento, refletindo na ineficiência da manipulação do estro (Ainsworth e Shrestha, 1983; Suarez et al., 2009; Martins et al., 2010).

Nesse contexto, o uso de um protocolo minimamente invasivo torna-se necessário. Por isso, progestágenos orais como o acetato de melengestrol (MGA) e hormônios injetáveis de uma única aplicação como a progesterona de longa ação (P4LA) tornam-se promissoras para sincronização do estro em espécies de cervídeos.

2.4 Acetato de melengestrol

Considerando a utilização de protocolos hormonais minimamente invasivos, as fontes de progesterona fornecidas via oral foram testadas na sincronização do estro em algumas espécies de cervídeos neotropicais, refletindo em um menor custo e menor intervenção nesses animais (Orjuela, 2016; Quadros et al., 2020; Tanaka et al., 2020).

Diferentemente das fontes de progesterona natural como os dispositivos intravaginais e soluções injetáveis de longa ação, que são provenientes de organismos vivos (humanos ou animais), há também os progestágenos sintéticos que podem ser extraídos de esteroides vegetais por meio de diversas reações químicas (Stanczyk, 2003).

As fontes sintéticas são classificadas de acordo com a sua estrutura química, podendo conter (pregnanos) ou não (norpregnanos) o grupo metila no carbono 10. Dentro do grupo dos pregnanos, há uma segunda divisão entre aqueles que apresentam o acetato e aqueles que não possuem. Como exemplo do subgrupo dos acetatos podem ser citados: 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 progestágeno de administração oral (6-methyl- 17-alpha-acetoxy-16-methylene-pregn-4,6-diene-3,20-dione) que foi desenvolvido em 1962, classificado biologicamente como um análogo do MPA (Miyake e Pincus, 1958). Estudos apontam que a administração oral do MGA confere uma potência maior em relação ao MPA, em média de 600 vezes na espécie bovina e 150 vezes na espécie ovina (Zimbelman e Smith, 1966; Patterson et al., 1989). É dificilmente degradado pela microbiota ruminal, possui metabolização hepática

e o principal órgão de excreção é o rim (Femia e Goyette, 2005). A utilização comercial do MGA teve início em novilhas confinadas a fim de melhorar a eficiência e a taxa de conversão alimentar, favorecendo o desenvolvimento folicular e inibições do estro e ovulação (Bloss et al., 1966; Zimbelman e Smith, 1966; Young et al., 1969). Sua função é similar aos efeitos da progesterona endógena, que é basicamente promover proliferação do tecido endometrial, manutenção da prenhez e estacionar a atividade ovariana (Duncan et al., 1964; Zimbelman e Smith, 1966).

As vantagens da utilização do MGA em protocolos de sincronização do estro é a facilidade na administração, custo relativamente baixo em relação à outras fontes de progesterona e um alto potencial em indução do estro (Patterson et al., 1989). Por esse motivo, há uma aplicabilidade promissora do MGA em protocolos de sincronização do estro em cervídeos, já que esses animais são altamente suscetíveis ao estresse (Christofoletti, 2010).

A administração do MGA em protocolos de sincronização do estro pode ser empregada juntamente com estrógeno e/ ou gonadotrofinas (Bartlewski et al., 2004; Sá Filho et al., 2009) e também com a associação de prostaglandina ou seus análogos luteolíticos (Imwalle et al., 2002; Mallory et al., 2010). Os esforços desenvolvidos para o controle do ciclo estral estão voltados basicamente para assegurar taxa de prenhez satisfatória (Salas-Razo et al., 2014). Como exemplo os ovinos, a taxa de prenhez resultante de protocolos de sincronização do estro pode variar de 25 a 85% (Windorski et al., 2008). Essa variação pode ser justificada pela dose utilizada, já que doses altas podem inibir a produção de LH e afetar o desenvolvimento folicular (Viñoles et al., 2001), como também, doses baixas podem alterar a frequência da pulsatilidade do LH e causar persistência do folículo dominante (Colazo et al., 2007). Salas-Razo et al. (2014) observaram que a dose intermediária de 0,22mg/dia de MGA teve efeito inibitório sobre a ovulação em 100% das ovelhas, com ótima resposta ao estro após o tratamento e ótima taxa de prenhez. Em contrapartida, Emsen et al. (2011) utilizando dose baixa de 0,125mg de MGA durante nove dias em 286 ovelhas obtiveram uma resposta ao estro de 62% e taxa de prenhez de 41%. Em outro estudo, Salas et al. (2011) fornecendo dose alta de MGA de 0,45mg por 17

dias em 20 ovelhas, obtiveram uma resposta do estro de 100% e uma taxa de prenhez de 70%.

Já na espécie bovina, os primeiros protocolos de sincronização do estro a base de MGA tiveram duração de tratamento de 14 a 18 dias e doses diárias variando entre 0,5 e 1mg (Zimbelman e Smith, 1966; Roussel e Beatty, 1969; Zimbelman et al., 1970; Wettemann et al., 1971). Foi observado que a dose mínima diária para suprimir a ovulação nessa espécie é de 0,42mg, coincidindo com maior número e tamanho folicular (Zimbelman e Smith, 1966). Ademais, Perry et al. (2005) observaram que o MGA possui alta afinidade pelos receptores de P4 e que a concentração de P4 plasmática de 0,03ng/mL é capaz de suprimir o estro e a ovulação na espécie bovina. As doses mais baixas levaram à uma diminuição da incidência de folículos maiores, e as doses mais altas foram associadas a uma alta incidência de folículos menores (Zimbelman e Smith, 1966; Patterson et al., 1989) e doses acima de 1mg/dia resultaram em um longo intervalo para manifestação do estro (Roussel e Beatty, 1969; Zimbelman et al., 1970; Wettemann et al., 1971). Por isso, muitos trabalhos utilizam a dose oral diária de 0,5mg para sincronizar o estro em vacas (Imwalle et al., 2002; Martinez et al., 2002; Post et al., 2005). Como esperado, tratamentos mais longos refletiram em baixa taxa de fertilidade (40 a 50%), o que levou ao desenvolvimento de associações hormonais com estrógenos, hormônio luteinizante, gonadotrofina coriônica equina (eCG), gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou ocitocina (Patterson et al., 1989).

Devido à similaridade fisiológica aos ruminantes domésticos, os protocolos utilizando MGA nessas espécies também foram extrapolados para as espécies de cervídeos (Asher et al., 2000; Morrow et al., 2009). Orjuela (2016) utilizando a dose recomendada para ovinos de 0,25mg/dia durante oito dias e aplicação de cloprostenol sódico no último dia de administração de MGA, observou que apenas 3/6 das fêmeas de *Mazama gouazoubira* utilizadas no experimento manifestaram estro após o tratamento. Além disso, a sincronia (intervalo entre a última e a primeira fêmea a manifestar estro) foi consideravelmente baixa, igual a 72 horas. Tanaka et al. (2020) avaliaram dois protocolos distintos utilizando doses diferentes de MGA na sincronização do estro em *Mazama gouazoubira*. No grupo 1, foi utilizada a dose de 0,5mg/dia,

dose recomendada para a espécie bovina, e no grupo 2, foi utilizada a dose de 1mg/dia. Foi observado que as fêmeas tratadas com 0,5mg de MGA manifestaram estro comportamental durante o tratamento hormonal, e as fêmeas tratadas com 1,0mg de MGA, manifestaram estro somente após a finalização do tratamento. Apesar de ter sido o primeiro e único estudo a avaliar a dose de 1,0mg de MGA na sincronização do estro em *Mazama gouazoubira*, além do número limitado de animais, é possível sugerir que essa dose foi eficaz em suprimir o estro comportamental na espécie. Além disso, o fornecimento diário de 1mg de MGA foi também eficaz em protocolos de sincronização do estro em outras espécies de cervídeos e em várias espécies da família *Bovidae* (Roughton, 1979; Raphael et al., 2003; Patton et al., 2007). Entretanto, foi observado uma baixa sincronia no tempo de início ao estro entre as fêmeas (12 a 72 horas de intervalo) (Tanaka et al., 2020).

A baixa sincronia do estro utilizando o MGA pode ser explicada pela própria formulação oral do progestágeno que mesmo após seu fornecimento ser cessado, os metabólitos ativos ainda podem estar presentes no sangue (Martinez-Alvarez et al., 2007). Outro fator que pode estar relacionado a essa dispersão de estro, é a metabolização do MGA, que pode ser armazenado no tecido adiposo e liberado em taxas diferentes entre as fêmeas (Neff, 1983); portanto, variação entre escores corporais podem afetar a taxa de liberação do MGA e conseqüentemente afetar o tempo de início ao estro e a ovulação após o tratamento com o progestágeno.

Windorski et al. (2008) utilizando MGA para sincronização do estro em ovelhas na dose de 0,3mg/dia no período da manhã, obtiveram uma resposta ao estro de 24,2% e taxa de prenhez de 18,2%. Contudo, Safranski et al. (1992) fornecendo MGA para ovelhas na dose de 0,125mg de manhã e 0,125mg a tarde, observaram resposta ao estro de 55,2% e taxa de prenhez de 40,5%. Segundo Windorski et al. (2008), a repartição da dose diária de MGA e oferecida em dois períodos do dia (manhã e tarde), poderia resultar em melhor sincronia do estro em ovelhas, por promover uma concentração maior e constante de progesterona no sangue (Kojima et al., 2000).

2.5 Progesterona injetável de longa ação

Dentre os variados métodos de administração e suplementação de progesterona/ progestágenos em protocolos hormonais, há a progesterona injetável de longa ação (P4LA). Existem poucos dados na literatura sobre o uso parenteral da P4LA na sincronização do estro e qual a sua farmacodinâmica na espécie bovina (Fernandez e Salazar, 2007; Rocha et al., 2011; Campos et al., 2016). Entretanto, a sua utilização é bastante empregada como suplementação após inseminações artificiais em tempo fixo (IATF) em vacas. De acordo com Macmillan et al. (1986) e Sianangama e Rajamahendram (1992), o uso da progesterona nesses casos, tem como intuito assegurar uma boa taxa de prenhez e manutenção do embrião bovino, prevenindo perdas embrionárias devido a um mal reconhecimento materno da gestação.

Campos e colaboradores (2016), avaliaram a taxa de prenhez de vacas da raça nelore submetidas a protocolos hormonais de IATF, comparando o grupo controle (DIP) com a progesterona injetável de longa ação (P4LA) (Progessincro®) na dose de 250mg. Foi observado que as vacas inseminadas 48 horas após a indução da ovulação no tratamento com a P4LA, apresentaram uma taxa de prenhez semelhante ao grupo controle (P4LA: 48,9%; DIP: 60,0%), sugerindo a P4LA como uma ferramenta promissora para sincronização do estro na espécie bovina.

Rocha et al. (2011) avaliaram por meio de dosagem hormonal diferentes doses e meios de administração, intramuscular (IM) e subcutânea (SC) da progesterona injetável de longa ação (MAD-4®) em vacas. Foi observado que a dose de 250mg IM teve pico de concentração sérica 12 horas ($2,48 \pm 2,05$ ng/mL) após a administração e a dose de 250mg SC 24 horas após ($3,23 \pm 2,15$ ng/mL). Essa diferença pode ser justificada pela própria absorção das duas vias, a SC é absorvida mais lentamente em relação à IM e de forma contínua. Ambos tratamentos elevaram as concentrações de progesterona a níveis superiores a 1ng/mL, desejável para inibição do estro na espécie bovina, contudo, a dose administrada via SC manteve os níveis superiores por um tempo maior, de 6 até às 96 horas e a via IM, as concentrações diminuíram a níveis menores que 1ng/mL após 48 horas de aplicação. A dose de 350mg administrada via SC proporcionou níveis acima de 1ng/mL durante 192 horas, refletindo uma

correlação entre a dose administrada e os níveis de P4 plasmático ao longo dos dias.

Em um trabalho semelhante, Souza et al. (2012) avaliaram o perfil plasmático de progesterona injetável (Sincrogest®) nas doses 300, 600 e 900mg em vacas leiteiras de alta produção da raça Holandesa. Foi observado que os grupos administrados com 300mg e 600mg de P4LA atingiram valores superiores (concentração de P4 plasmática acima de 1ng/mL) ao grupo controle apenas 24 e 48 horas após a aplicação, respectivamente. Em contrapartida, o grupo de 900mg apresentou valores significativamente superiores em relação ao grupo controle 24 horas após a aplicação até 216 horas depois. Pugliesi et al. (2014) observaram que a dose administrada em vacas de corte está diretamente relacionada com as concentrações de P4 plasmática e duração do tratamento após a aplicação. A dose indicada pelo fabricante para manipulação do ciclo estral utilizando a P4LA (Sincrogest®) na espécie bovina é de 150mg (Ourofino®). Porém, vale ressaltar que vacas de alta produção leiteira possuem maior metabolização hepática para hormônios esteroides (Sangsrivang et al., 2002) e por isso, a dose de 900mg foi escolhida e utilizada em experimentos posteriores (Souza et al., 2012). Além disso, estudos sugerem que a utilização de doses elevadas de P4LA podem causar uma maior supressão sobre as gonadotrofinas e indução de uma nova onda folicular (Cavaliere, 2018; 2019).

Algumas fontes de P4 foram desenvolvidas com a finalidade de induzir a puberdade na espécie bovina como o MGA, implantes subcutâneos e os DIP (Gonzalez-Padilla et al., 1975; Patterson et al., 1990; Patterson e Corah, 1992). Contudo, o conhecimento sobre a farmacodinâmica da P4LA nesses casos ainda não está totalmente esclarecido. Lemes et al. (2017) induziram novilhas da raça Nelore à puberdade com a utilização da P4LA na dose de 150mg. Foi verificado que a taxa de ciclicidade foi similar e a taxa de prenhez superior (68,64% e 42,74%, respectivamente) em relação ao grupo tratado com DIP de terceiro uso (63,25% e 26,49%, respectivamente). Segundo Neto et al. (2017), a dose de 150mg de P4LA é capaz de manter as concentrações de P4 plasmática acima de 1ng/mL durante 11 dias em novilhas da raça Nelore pré-puberes.

Lima (2017) avaliou a eficácia da pré-sincronização da ovulação com P4LA na dose de 150mg em novilhas da raça Nelore na taxa de prenhez após IATF. O grupo tratado com P4LA apresentou maior proporção de novilhas que possuíam corpo lúteo em relação ao grupo não tratado, com maior diferença nas fêmeas pré-púberes (controle: 11,4%/ tratado: 63,7%) em relação às fêmeas púberes (controle: 79,5%/ tratado: 91,2%). A taxa de prenhez nas novilhas pré-púberes foi maior no grupo tratado (44,2%) comparado ao grupo controle (33,6%) e similar nos dois grupos nas novilhas púberes, tratado (45,2%) e controle (41,1%). A resposta ao estro foi maior no grupo tratado (21,7%) em relação ao grupo controle (11,6%) em novilhas pré-púberes. A utilização da P4LA no protocolo de pré-sincronização aumentou expressivamente o número de novilhas pré-púberes que apresentavam corpo lúteo, de 11,4% para 63,7%, taxa superior à observada em novilhas púberes.

Sousa (2018) objetivou avaliar o uso da P4LA (Sincrogest®) na dose de 150mg como indutora da ciclicidade em novilhas e submetê-las a um protocolo de IATF posteriormente. Foi possível observar que tanto o tratamento de indução com P4LA e o tratamento controle (DIP reutilizado de 3º uso) aumentaram o diâmetro folicular no momento da IATF (P4LA: $9,85 \pm 2,7\text{mm}$; DIP: $10,03 \pm 2,4\text{mm}$) e, conseqüentemente, elevaram os níveis de LH circulantes. As novilhas pré-induzidas com P4LA tiveram uma indução de ciclicidade menor em relação ao grupo controle (P4LA: 39,53%; DIP: 54,26%), entretanto, não houve diferenças significativas na taxa de prenhez entre os dois tratamentos (P4LA: 46,51%; DIP: 48,83%).

Pugliesi et al. (2019) avaliaram o tamanho do folículo pré-ovulatório, taxa de prenhez e taxa de perda gestacional em vacas lactantes da raça Nelore após um protocolo de ressincronização com DIP associado ou não com 75mg de P4LA, realizado 12 dias após a IATF. Por meio do diagnóstico de prenhez realizado por Ultrassonografia Doppler após 22 dias de IATF foi possível verificar que o grupo administrado com P4LA aumentaram consideravelmente a taxa de prenhez (67,2%), semelhante ao grupo controle (DIP sem P4LA) (69,0%). As vacas não prenhes, foram submetidas a uma segunda IATF, resultando em detecção de estro e taxa de prenhez significativamente maior no grupo com P4LA (92,2% e 60,9%, respectivamente) em relação ao grupo controle (75% e

44,6%). O tamanho do folículo pré-ovulatório e a taxa cumulativa de prenhez após as duas IATF não apresentaram diferença significativa.

A P4LA possui baixo custo e, por apresentar administração parenteral, possui facilidade no manejo e ausência de risco de infecções vaginais e problemas sanitários se comparado aos dispositivos intravaginais de progesterona (Morotti et al., 2013) e por isso, apresenta alta aplicabilidade em cervídeos.

O armazenamento da progesterona endógena e exógena no tecido adiposo é relatado na literatura (Neff, 1983; Martinez-Alvarez et al., 2007; Rodrigues et al., 2011). Os mecanismos que envolvem esse estoque e a taxa de liberação da P4 para a corrente sanguínea ainda não são totalmente esclarecidos. Entretanto, estudos apontam que isso pode estar relacionado com o escore corporal dos animais. Em vacas de alta produção, Rodrigues et al. (2011) observaram que a mobilização do tecido adiposo estava diretamente relacionada com os níveis de progesterona no sangue, devido ao balanço energético negativo pós parto. Além disso, como já mencionado, a utilização da P4LA demonstrou uma correlação entre a dose administrada e os níveis de P4 circulantes ao decorrer do tempo após a aplicação.

Contudo, com base nos nossos conhecimentos, não há estudos sobre a utilização da P4LA em protocolos de sincronização do estro em cervídeos, tampouco a metabolização da P4 nessas espécies. Sabendo do escore corporal do *Mazama gouazoubira* e da resposta reprodutiva a outras fontes de progesterona exógena, optou-se pela utilização da dose de 75mg de P4LA, a mesma utilizada em protocolos de indução à ciclicidade e resincronização do estro em novilhas.

2.6 Monitoramento Endócrino Não Invasivo

A sequência de eventos que envolvem a dinâmica folicular é responsável pela correlação entre fatores endócrinos e parácrinos do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e a expressão de múltiplos genes (Ginther et al., 2003). A importância do conhecimento desses processos reprodutivos/ hormonais

poderiam simplificar o sucesso das biotécnicas reprodutivas em prol da conservação. Contudo, o monitoramento preciso da atividade ovariana é um dos maiores empecilhos para o manejo de espécies selvagens, assim como determinar o momento exato para realizar uma inseminação artificial, por exemplo.

O perfil endócrino é um dos métodos mais utilizados para monitorar a atividade ovariana de espécies selvagens (Thompson et al., 1998). Os hormônios são secretados em diversos materiais biológicos como sangue, fezes, urina, leite, saliva e pelo, e podem ser detectados como metabólitos hormonais (Bamberg et al., 1991; Micheletti et al., 2014). Por meio do monitoramento hormonal é possível alcançar o ciclo estral e também o estado de fertilidade de uma determinada espécie e conseqüentemente, intervir no manejo reprodutivo em prol da conservação (Schwarzenberger e Brown, 2013). A colheita de amostras com várias repetições ao longo do tempo é fundamental para caracterizar com exatidão a relação reprodutiva-hormonal de uma espécie. Entretanto, apesar da amostra de sangue ser considerada ideal e expressar de forma confiável o nível hormonal no momento da coleta, não é usual em cervídeos devido à necessidade de contenção química e a susceptibilidade desses animais ao estresse (Sontakke et al., 2018; Christofolletti, 2010). Além disso, concentrações elevadas de hormônios do estresse, como o hormônio adrenocorticotrófico, podem levar à secreção de progesterona pelas glândulas adrenais e interferir nas dosagens hormonais (Monfort et al., 1990; Landaeta-Hernandez et al., 2002). Isso pode resultar em alterações nos padrões reprodutivos como a frequência dos pulsos de LH e conseqüentemente no processo de maturação folicular e ovulação (Monfort et al., 1990; Dobson e Smith, 2000). Portanto, o monitoramento hormonal não invasivo utilizando amostras de urina ou fezes é o escolhido (Silva et al., 2017), e além disso, permite colheitas sucessivas desses materiais a longo prazo (Monfort et al., 2003). O monitoramento de hormônios pela urina é rápido, barato e não requer intervenções negativas no animal. Entretanto, sua colheita é relativamente difícil e por isso acaba sendo dispensável (Sontakke et al., 2018). Por outro lado, o monitoramento hormonal utilizando amostras fecais é amplamente utilizado em espécies selvagens para analisar a função reprodutiva da fêmea. O método de

extração de hormônio fecal permite avaliar a concentração dos metabólitos de progesterona, por exemplo, assim como foi descrito em várias espécies de cervídeos como *Mazama gouazoubira* (Pereira et al., 2006), *Mazama americana* (Krepschi et al., 2013), *Odocoileus virginianus* (Kapke et al., 1999), *Moschus berezovskii* (Wang et al., 2016), *Alces alces* (Schwartz et al., 1995), *Elaphurus davidianus* (Li et al., 2001), *Pudu puda* (Blanvillain et al., 1997), *Rusa timorensis* (Sudsukh et al., 2017). Por meio do monitoramento hormonal não invasivo, foi possível esclarecer informações essenciais sobre ciclo estral e ovulação de algumas espécies da família *Cervidae*, que até então eram desconhecidas.

3. MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil (protocolo número 012090/19. Este trabalho está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.1 Animais e Local de estudo

Quatro fêmeas adultas (idade entre 2 e 8 anos, peso entre 14,1 e 21,4Kg) e um macho adulto (fértil, 8 anos de idade, 19,60Kg) de *Mazama gouazoubira* foram utilizados neste estudo (Tabela 1). Todos os animais pertencem ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), FCAV-UNESP e foram mantidos em baias individuais (3,0m x 2,0m), e expostos a luminosidade natural. Dieta composta por alimentos concentrados utilizados para equinos (Equitech - Presence® -Paulínia -São Paulo- Brazil) e alimento volumoso: soja perene (*Neonotonia wightii*), amora (*Morus alba*) e rami (*Boehmeria nivea*). A água foi disponibilizada *ad libitum*.

Tabela 1. Identificação e histórico reprodutivo dos indivíduos da espécie *Mazama gouazoubira* utilizados neste estudo.

| Animais | Idade (anos) | Peso (Kg) | Histórico reprodutivo |
|----------------|---------------------|------------------|------------------------------|
| Fêmea A | Desconhecido | 21,4 | Desconhecido |
| Fêmea B | 8 | 19,8 | Primípara |
| Fêmea C | 5 | 14,8 | Nulípara |
| Fêmea D | 2 | 14,15 | Nulípara |
| Macho | 8 | 19,6 | Fértil |

3.2 Delineamento experimental

As quatro fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em um delineamento em quadrado latino em quatro tratamentos diferentes. O intervalo entre os períodos foi de 50 dias.

Tabela 2. Representação em quadrado latino dos quatro tratamentos distribuídos em quatro períodos diferentes

| Fêmea | Período I | Período II | Período III | Período IV |
|--------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| A | Tratamento P4LA | Tratamento MGA1x | Tratamento DIP | Tratamento MGA2x |
| B | Tratamento MGA2x | Tratamento DIP | Tratamento MGA1x | Tratamento P4LA |
| C | Tratamento DIP | Tratamento MGA2x | Tratamento P4LA | Tratamento MGA1x |
| D | Tratamento MGA1x | Tratamento P4LA | Tratamento MGA2x | Tratamento DIP |

Tratamento DIP: dispositivo intravaginal de progesterona por oito dias (DIP); Tratamento MGA1x: dose diária de acetato de melengestrol (MGA) oferecida uma vez ao dia no período da manhã por oito dias; Tratamento MGA2x: metade da dose diária de MGA oferecida duas vezes ao dia, no período da manhã e tarde por oito dias; Tratamento P4LA: progesterona de longa ação administrada no primeiro dia do tratamento.

3.3 Tratamentos

Em todos os tratamentos, todas as fêmeas receberam uma administração intramuscular (IM) de 0,25mg (0,25mL) de benzoato de estradiol (BE)

(Sincrodiol®; Ourofino Saúde Animal Ltda., Brasil) no primeiro dia do tratamento; ademais, cada fêmea recebeu uma fonte diferente de progesterona/progestágeno. Após oito dias do início dos tratamentos, todas as fêmeas receberam uma administração intramuscular (IM) de 265µg (1mL) de cloprostenol sódico (Ciosin® - Shering Plow Coopers® - Brasil) (Figura 3).

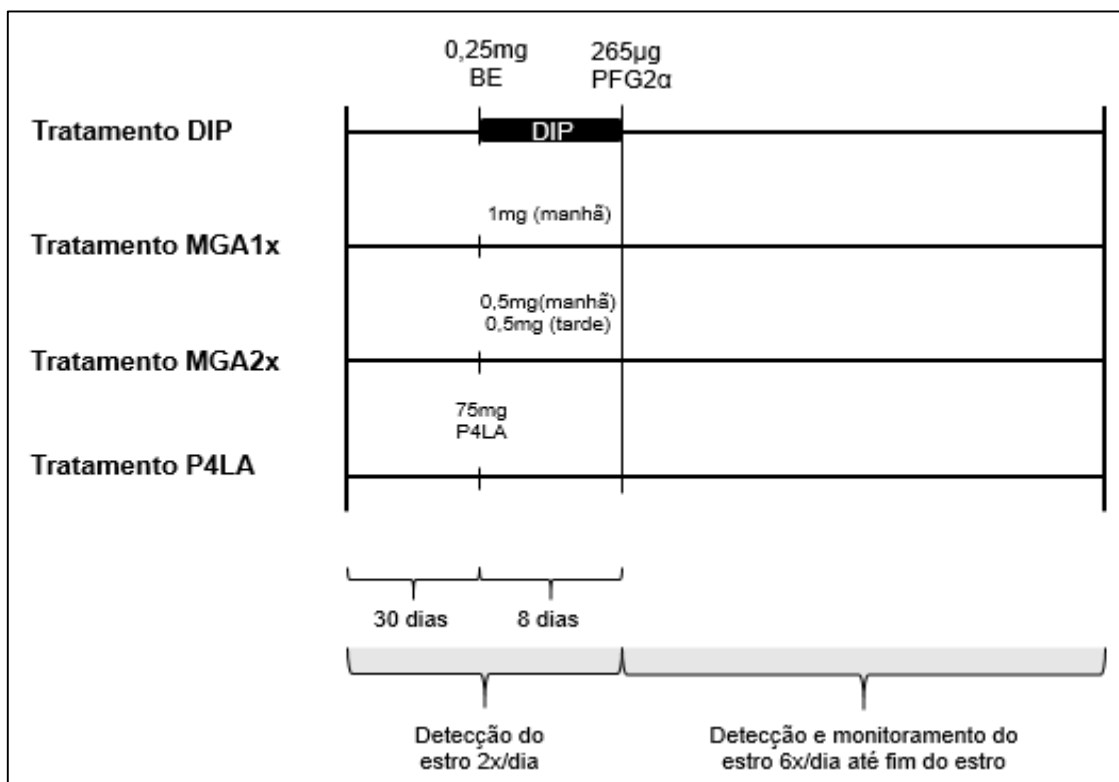


Figura 3: Diagrama esquemático do modelo experimental dos quatro tratamentos realizados na espécie *Mazama gouazoubira*. Tratamento DIP: dispositivo intravaginal de progesterona (DIP) durante oito dias; Tratamento MGA1x: 1mg de acetato de melengestrol (MGA) no período da manhã durante oito dias; Tratamento MGA2x: 0,5mg de MGA no período da manhã e tarde durante oito dias; Tratamento P4LA: administração de 75mg de P4LA no período da manhã no primeiro dia do tratamento. Administração de Benzoato de estradiol (BE) no primeiro dia do tratamento e cloprostenol sódico (PGF2α) oito dias após o início do tratamento. Detecção do estro natural um mês antes de começar cada tratamento; detecção do estro duas vezes ao dia durante os tratamentos.

Tratamento DIP – As fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona com 0,33g de progesterona (entre 8-9h) (CIDR-type T; Controlled Internal Drug Release, Zoetis, USA) que permaneceu na fêmea durante oito dias. O dispositivo foi inserido no canal vaginal com o auxílio de um aplicador específico por meio de contenção física manual de cada fêmea (Figura 5 (A))

Tratamento MGA1x – Uma dose oral de 1mg de acetato de melengestrol misturado com banana amassada oferecida no período da manhã (entre 8-9h) durante oito dias.

Tratamento MGA2x – Duas doses orais de acetato de melengestrol de 0,5mg misturado com banana amassada oferecida no período da manhã (entre 8-9h) e 0,5mg no período da tarde (entre 17-18h) durante oito dias.

Tratamento P4LA – Uma dose única de 75mg (0,5mL) de progesterona injetável de longa ação (IM) (entre 8-9h) (Sincrogest injetável®, Ourofino Saúde Animal Ltda., Brasil) no primeiro dia do tratamento.

*O acetato de melengestrol foi oferecido juntamente com banana amassada devido à alta palatabilidade e menor risco de perda do progestágeno (Figura 6).



Figura 4. Caixa de contenção onde os fármacos foram administrados via intramuscular na espécie *Mazama gouazoubira* (Eveline, 2009).

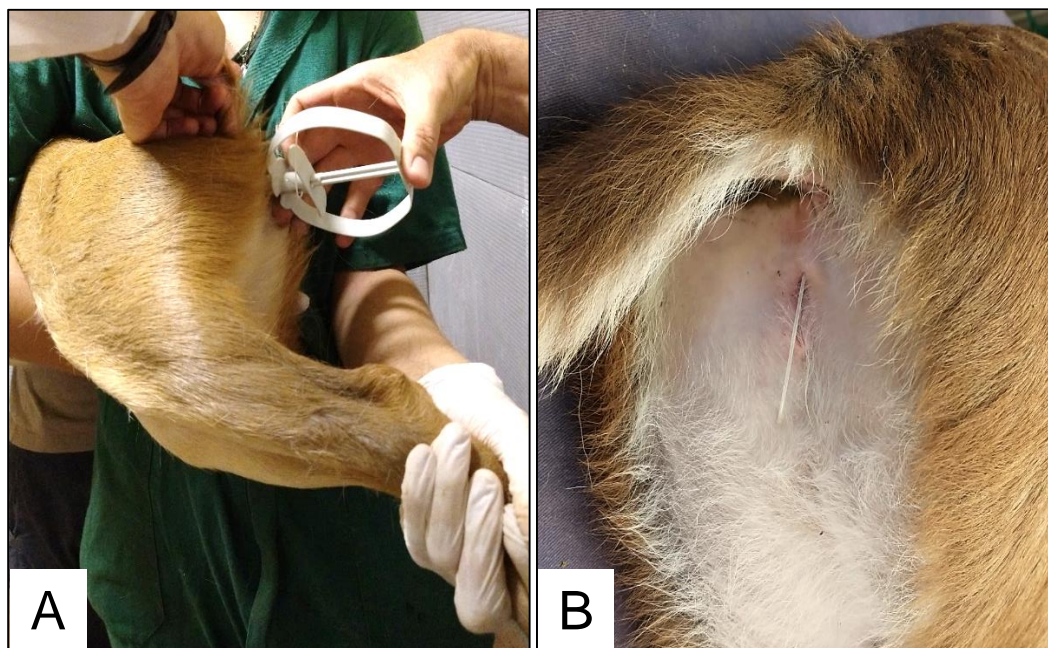


Figura 5. (A) Contenção física manual de fêmea de *Mazama gouazoubira* para inserção do dispositivo intravaginal de progesterona com o auxílio de um aplicador; (B) Dispositivo intravaginal de progesterona introduzido no canal vaginal. Arquivo pessoal.



Figura 6. Mistura de banana amassada com acetato de melengestrol (MGA) com alta aceitabilidade pelas fêmeas. Arquivo pessoal.

3.4 Detecção do estro e dados comportamentais

O estro comportamental foi detectado por meio do contato de cada fêmea com um macho adulto da mesma espécie. A fêmea que permanecesse estática na presença do macho (com reflexo de parada) foi considerada em estro (Krepschi et al., 2013). A detecção do estro foi realizada duas vezes ao dia (manhã e tarde) por um mês antes do início de cada protocolo de sincronização (dados do último estro comportamental natural) até o fim do experimento. Esse controle foi mantido em caso de ineficiência da progesterona exógena em inibir a manifestação do estro durante os tratamentos. Após a primeira detecção de estro positiva, o monitoramento foi realizado a cada quatro horas até o último horário de estro comportamental para determinar precisamente a duração do estro.

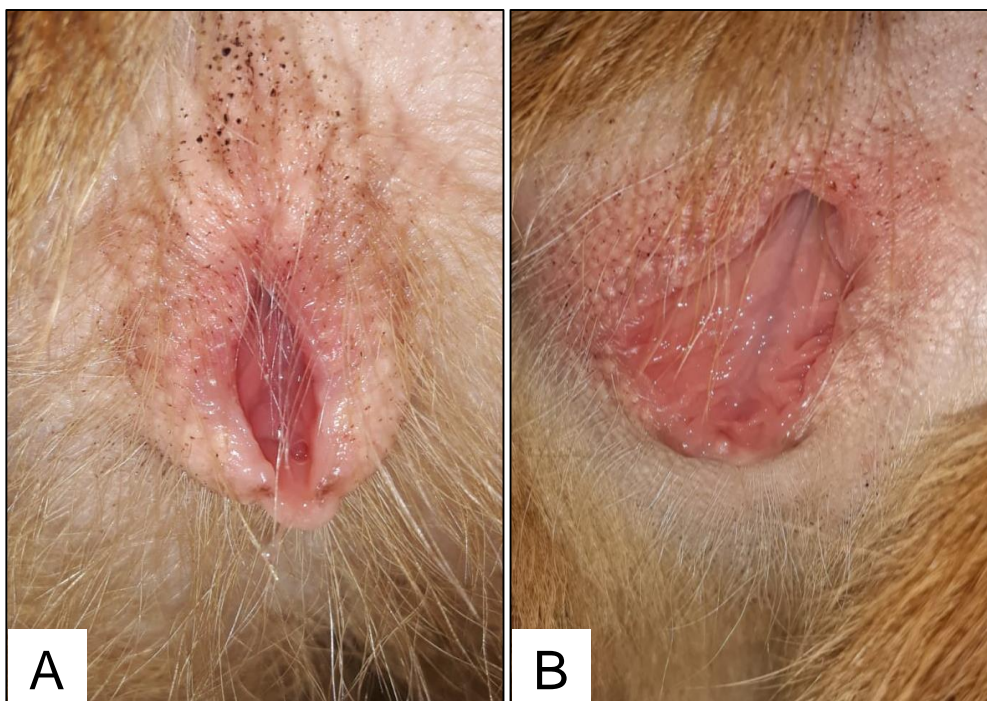


Figura 7. (A) e (B) Hiperemia vulvar e secreção vaginal mucoide de fêmea de *Mazama gouazoubira* em período de estro. Arquivo pessoal.

3.5 Avaliação da sincronização do estro

O intervalo PGF2 α – estro foi considerada como o intervalo entre a administração de prostaglandina (PGF2 α) e o início do estro comportamental após o tratamento. A sincronia de cada tratamento foi calculada considerando o intervalo entre a primeira e a última fêmea a manifestar o estro comportamental.

3.6 Colheita de fezes e extração de esteroides fecais

As amostras de fezes foram coletadas diariamente (aproximadamente às 6 horas da manhã) três dias antes do início dos tratamentos até dez dias após o último dia de estro comportamental (D9). As amostras foram congeladas a -20°C dentro de 20 minutos após a colheita até a realização da análise dos esteroides. Todas as amostras fecais foram secas em estufa (FANEM® LTDA, Guarulhos, São Paulo, Brasil) a 56°C por 72 horas. Em seguida, as amostras foram pulverizadas com um martelo de borracha e todo material sólido (como exemplo, a fibra da dieta) foram removidos (Yamauchi et al., 1997; Hamasaki et al., 2001); os esteroides foram extraídos de acordo com o método descrito por Graham et al. (2001). Uma proporção do pó resultante (0,5g) foi extraído com 5mL de metanol a 80%. Esses componentes foram homogeneizados por 30 segundos em alta velocidade e depois, foram dispostos em um homogeneizador horizontal (Mod. AP22® - Phoenix 139 Ltda. - Araraquara - Brasil) por 12 horas. Posteriormente, foram centrifugados em 400 giros por 20 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e armazenado a -20°C para análises posteriores

3.7 Validação hormonal e ensaio imunoenzimático (EIA)

As alíquotas do sobrenadante foram diluídas em 1:32 ou 1:64 (durante o período de estro comportamental) e 1:128 ou 1:256 (dias após o estro comportamental) para ensaio de progesterona, para análise imunoenzimática (EIA) (Multiskan MS, LabSystem, Helsinki, Finland). Amostras referentes ao tratamento DIP e tratamento P4LA durante o período de tratamento, as diluições

foram 1:1024, 1:2048 e 1:4096. As concentrações foram determinadas por meio do anticorpo CL425 (California University; Davis, CA, EUA) para progesterona (P4). Esse anticorpo foi escolhido devido a alta reatividade cruzadas com os metabólitos excretados nas fezes de *Mazama gouazoubira* – 5 α e 5 β -preganes (Polegato, 2004). De acordo com o protocolo de Brown et al. (2004), a validação das dosagens dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) foi realizada pela comparação entre a curva padrão e a curva obtida pelo pool de extratos fecais preparados por meio de diluição seriada (teste de paralelismo) ($y = -0.0215x + 2.5153$, $r^2 = 0.98$) (Figura 8). Adicionalmente, a validação da dosagem de FPM foi realizada de acordo com a relevância fisiológica dos resultados associado aos diferentes dias da resposta reprodutiva. Os coeficientes de variação interensaio para os dois controles foram 4,4% (n= 23 placas, 72% de ligação) e 9,5% (n= 23 placas, 30% de ligação). Os coeficientes de variação intraensaio foram <10%. Todos os dados fecais são expressos com base do peso seco (ng/g fezes).

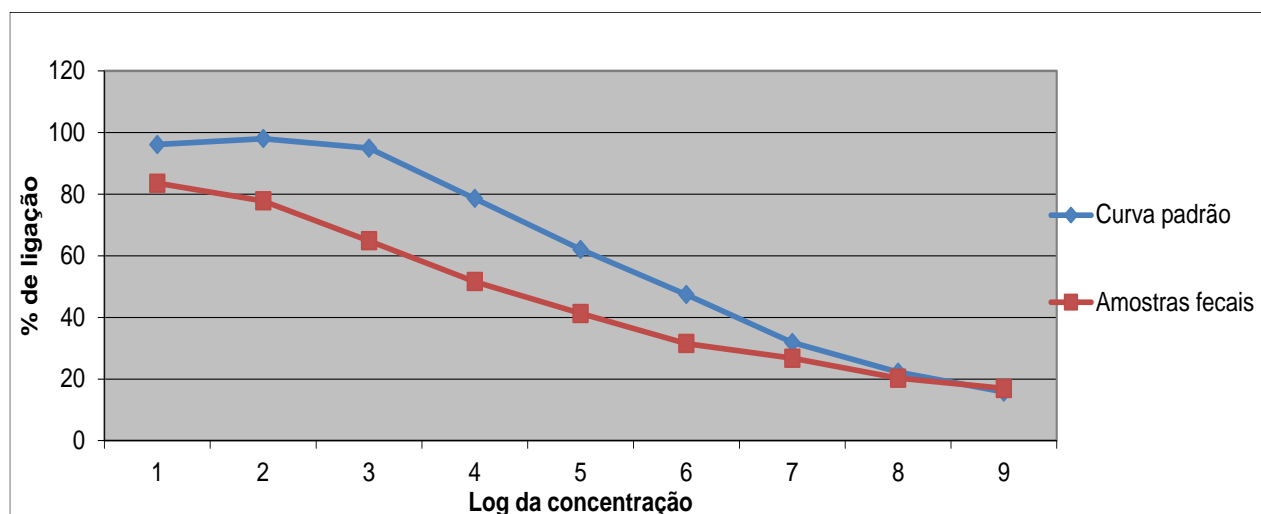


Figura 8. Resultado do teste de paralelismo da dosagem de progesterona com a disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada do pool das amostras fecais.

3.8 Análises estatísticas

As variáveis intervalo entre a administração da PGF2 α e início do estro e a duração do estro foram realizados de acordo com o delineamento experimental

em quadrado latino e os efeitos de animal (linha), período (coluna) e tratamentos foram obtidos utilizando a Análise de Variância (ANOVA). A comparação entre as médias de cada efeito foi obtida pelo Teste de tukey. As concentrações de FPM foram definidas selecionando os menores valores de FPM das quatro fêmeas de cada tratamento, de acordo com as análises de dados descritas por Thompson et al. (1998). Os valores acima do valor de critério (Média \pm 2Desvio padrão) foram considerados indicativos de fase luteal. Para padronizar os ciclos e calcular diariamente as médias hormonais, o dia 0 (D0) de cada ciclo foi definido como o dia seguinte ao último dia de estro comportamental. A Fêmea B foi removida das análises estatísticas no tratamento MGA1x e a Fêmea C foi removida das análises estatísticas no tratamento MGA2x. Todas as análises foram realizadas no Software R (R Core Team, 2020), adotando nível de significância igual a 5%.

4. RESULTADOS

O estro comportamental induzido foi observado em todas as fêmeas (4/4) nos tratamentos DIP, MGA2x e P4LA. Entretanto, no tratamento MGA1x, apenas 75% das fêmeas (3/4) manifestaram estro comportamental. A fêmea C apresentou “estro silencioso” após o tratamento MGA2x, e por isso, foi excluída das análises estatísticas nas variáveis intervalo PGF2 α - estro e duração do estro. Entretanto, as concentrações de FPM da fêmea C aumentaram progressivamente após o término do suspeito estro, atingindo valores acima do valor de critério, sugerindo ocorrência de ovulação. A fêmea B não apresentou estro comportamental ou perfil confiável e sugestivo de resposta ao tratamento na concentração de FPM após o tratamento MGA1x e foi removida das análises estatísticas. O tempo entre a administração de PGF2 α e o início do estro foi significativamente maior no tratamento P4LA em comparação ao tratamento DIP, tratamento MGA1x e ao tratamento MGA2x ($P < 0,05$) (Tabela 3). A sincronia, o intervalo entre a primeira e a última fêmea a manifestar estro comportamental após o fim do tratamento foi menor no tratamento DIP e no tratamento MGA2x (Tabela 3).

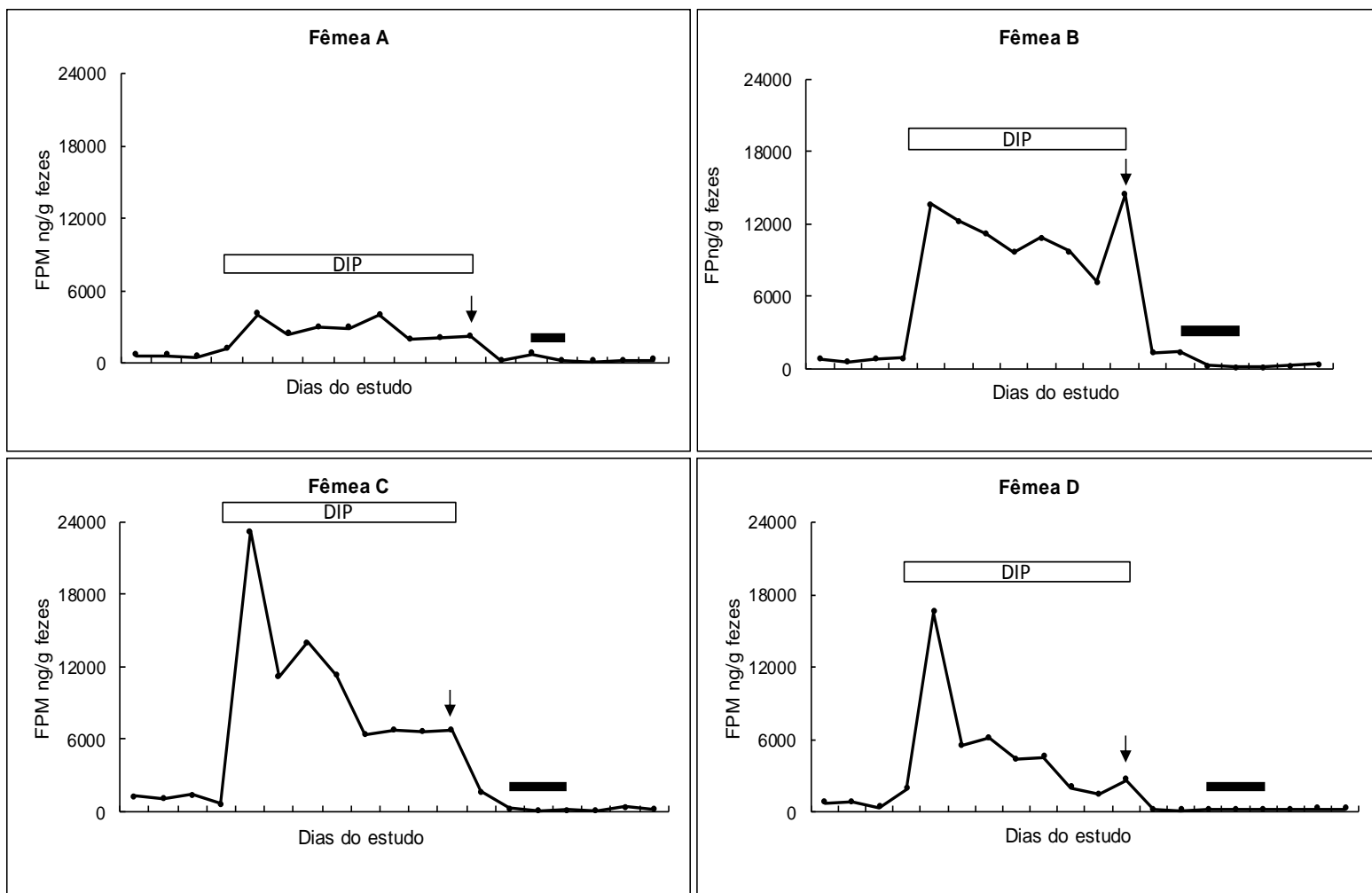


Figura 9. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) (ng/g fezes) de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira* (Fêmeas: A, B, C e D) durante o tratamento DIP (dispositivo intravaginal liberador de progesterona) por oito dias. A seta preta representa a administração de cloprostenol sódico (PGF2 α) e a barra preta indica os períodos de estro comportamental.

Nenhuma diferença estatística foi observada na duração do estro entre os tratamentos (Tabela 3). Entretanto, foi observado uma diferença estatística entre as fêmeas do estudo (efeito linha) na duração do estro ($P < 0,05$) (Tabela 4). O efeito coluna mostrou que os períodos I e II foram significativamente mais longos em comparação aos períodos III e IV ($P < 0,05$) (Tabela 4).

O aumento na concentração de FPM de cada fêmea em cada tratamento pode ser observada ao longo dos dias após o estro comportamental, com valores acima dos níveis basais de FPM (Média + 2DP). Os perfis de caracterização de FPM dos tratamentos DIP, MGA1x, MGA2x e P4LA estão ilustrados na Figura

13. A concentração média de FPM no D0 foi igual a $137,6 \pm 19,8$ ng/g no tratamento DIP, $133,3 \pm 46,8$ ng/g no tratamento MGA1x, $136,3 \pm 19,0$ ng/g no tratamento MGA2x, e $145,6 \pm 16,7$ ng/g no tratamento P4LA (Tabela 5). A média das concentrações de FPM no D9 foi de $952,0 \pm 127,9$ ng/g no tratamento DIP, $1078,5 \pm 144,6$ ng/g no tratamento MGA1x, $789,5 \pm 75,2$ ng/g no tratamento MGA2x e $1193,1 \pm 250,7$ ng/g no tratamento P4LA (Tabela 5).

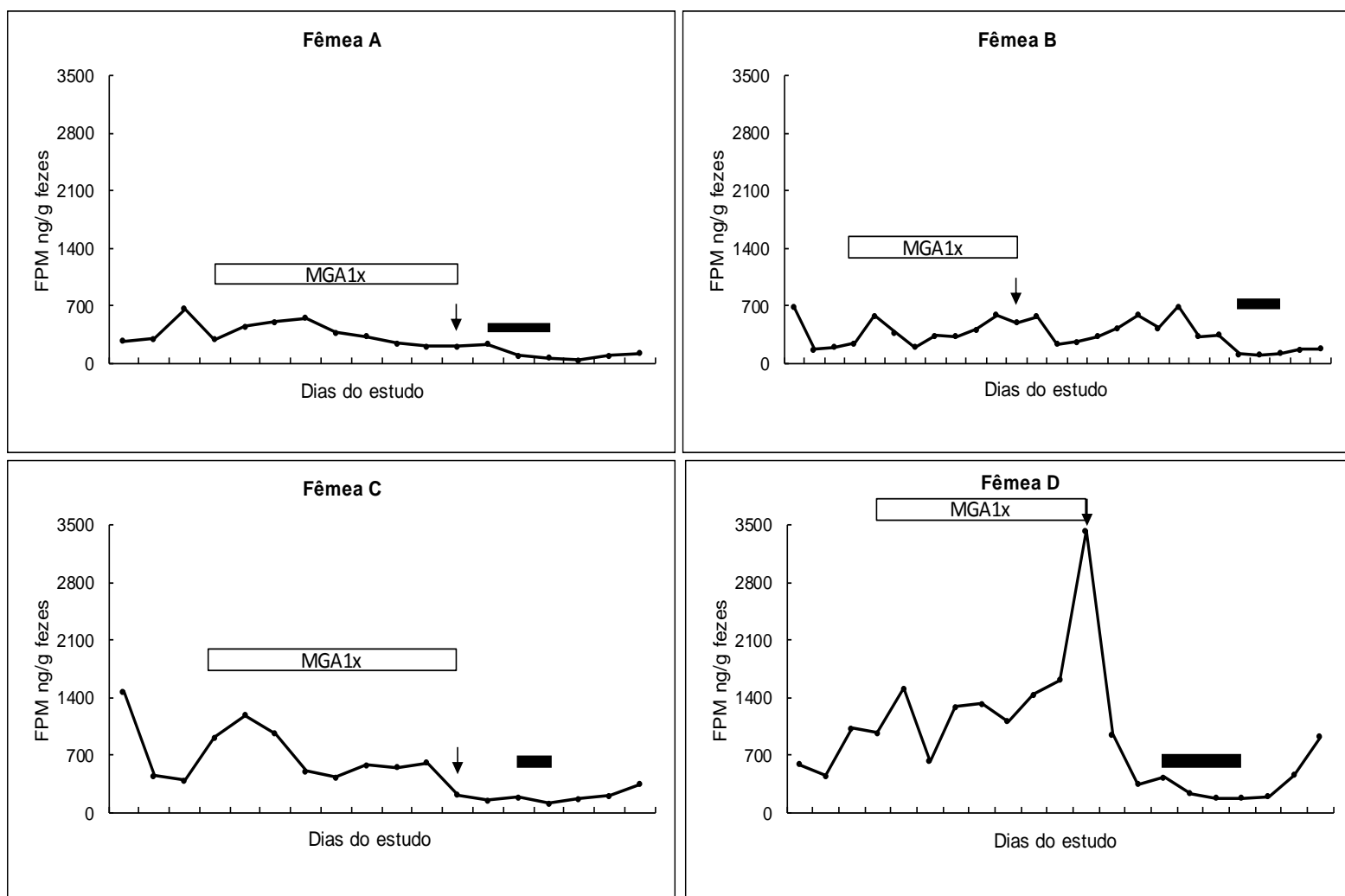


Figura 10. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) (ng/g fezes) de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira* (Fêmeas: A, B, C e D) durante o tratamento MGA1x (1mg de MGA no período da manhã) por oito dias. A seta preta representa a administração de cloprostenol sódico (PGF2 α) e a barra preta indica os períodos de estro comportamental.

Tabela 3. O intervalo entre a aplicação de PGF2A e início do estro, sincronia e duração do estro de quatro fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* no tratamento DIP (dispositivo intravaginal

por oito dias), tratamento MGA 1x (1mg de MGA oferecida no período da manhã por oito dias), tratamento MGA 2x (0,5mg de MGA oferecida de manhã e 0,5mg a tarde por oito dias) e tratamento P4LA (75mg de P4LA no primeiro dia do tratamento).

| Tratamento | Fêmea | Dia do ciclo | Intervalo PGF2 α - estro (h) | Sincronia (h) | Duração do estro (h) |
|------------|-----------------------------------|--------------|--|------------------|-------------------------|
| 1 | A | 18 | 49 | | 32 |
| | B | 13 | 61 | | 40 |
| | C | 16 | 61 | | 31 |
| | D | 14 | 81 | | 52 |
| | Média \pm EPM | | | 63 \pm 6,6b | 32 |
| 2 | A | 8 | 33 | | 40 |
| | B | 3 | | | |
| | C | 13 | 45 | | 24 |
| | D | 12 | 81 | | 68 |
| | Média \pm EPM | | | 53 \pm 14,4b | 48 |
| 3 | A | 16 | 33 | | 36 |
| | B | 24 | 61 | | 35 |
| | C | 17 | | | |
| | D | 14 | 29 | | 48 |
| | Média \pm EPM | | | 41 \pm 10,1b | 32 |
| 4 | A | 21 | 285 | | 56 |
| | B | 30 | 165 | | 32 |
| | C | 20 | 173 | | 32 |
| | D | 14 | 97 | | 64 |
| | Média \pm EPM | | | 180 \pm 38,9a | 188 |

Médias dentro da coluna com letras incomuns (a e b) diferem ($P < 0,05$) pelo teste de tukey

***Dia do ciclo** de cada fêmea foi determinado considerando a data do último estro comportamental natural antes do início de cada tratamento (dia 0= primeiro dia do estro comportamental natural).

Tabela 4. Média \pm erro padrão dos períodos experimentais (I, II, III e IV) e das fêmeas (A, B, C e D) nas variáveis intervalo PGF2 α - estro (horas) e duração do estro (horas).

| | Períodos | Média \pm EP | Fêmeas | Média \pm EP |
|--|----------|-------------------|--------|-------------------|
| Intervalo PGF2α - estro (h) | I | 122,0 \pm 54,5a | A | 100,0 \pm 61,8a |
| | II | 63,7 \pm 18,5a | B | 95,7 \pm 34,7a |
| | III | 83,7 \pm 45,0a | C | 93,0 \pm 40,3a |
| | IV | 81,0 \pm 29,8a | D | 72,0 \pm 14,8a |
| Duração do estro (h) | I | 47,5 \pm 8,8a | A | 41,0 \pm 5,3b |
| | II | 52,0 \pm 12,0a | B | 33,5 \pm 1,5bc |
| | III | 37,3 \pm 5,3b | C | 29,0 \pm 2,5c |
| | IV | 36,0 \pm 5,9b | D | 58,0 \pm 4,8a |

Letras diferentes dentro de cada variável indicam diferença significativa no teste de tukey ($P < 0,05$).

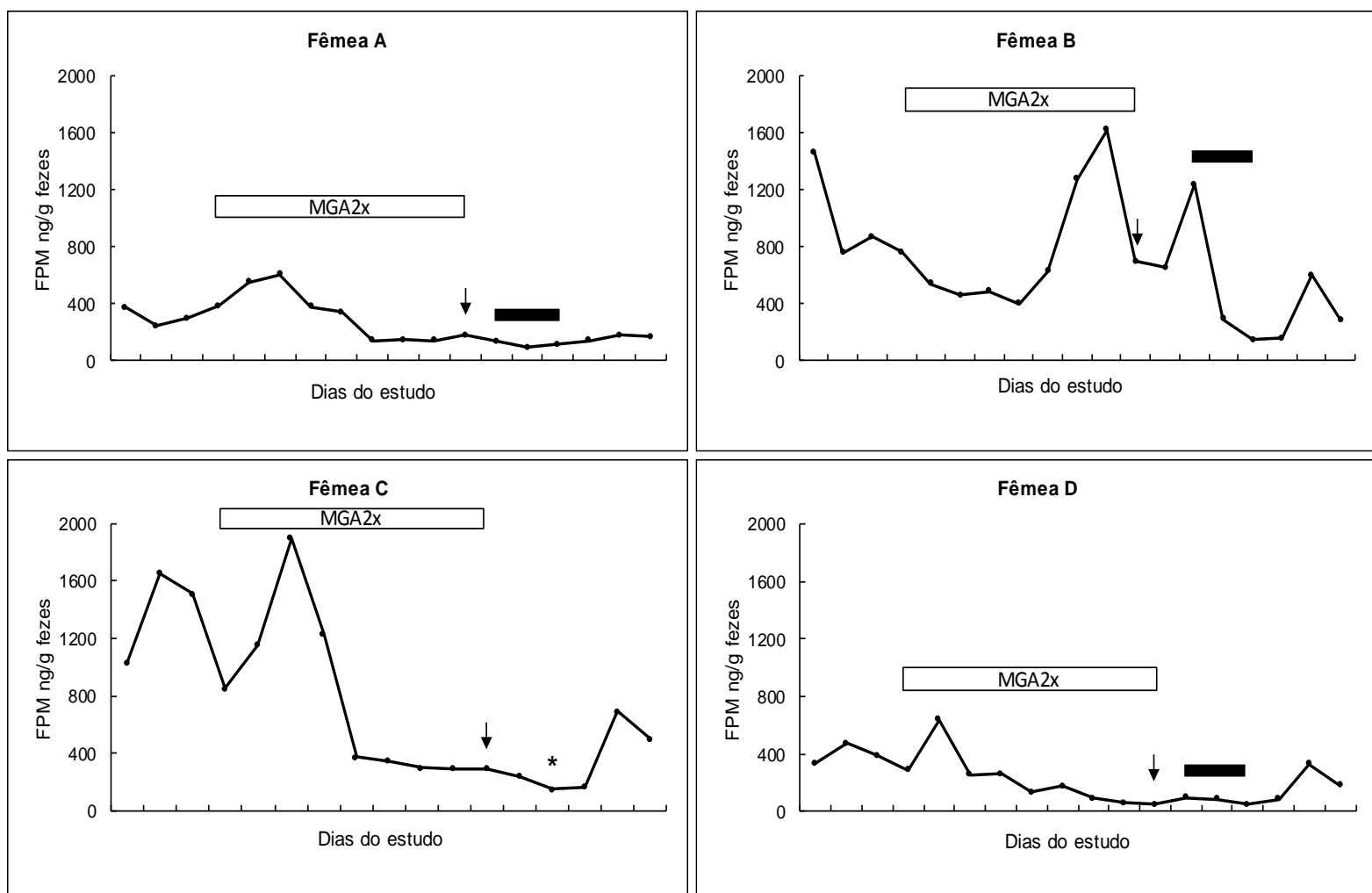


Figura 11. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) (ng/g fezes) de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira* (Fêmeas: A, B, C e D) durante o tratamento MGA2x (0,5mg de MGA no período da manhã e 0,5mg no período da tarde) por oito dias. A seta preta representa a administração de cloprostenol sódico (PGF2 α) e a barra preta indica os períodos de estro comportamental. (*) indica suspeita de estro comportamental.

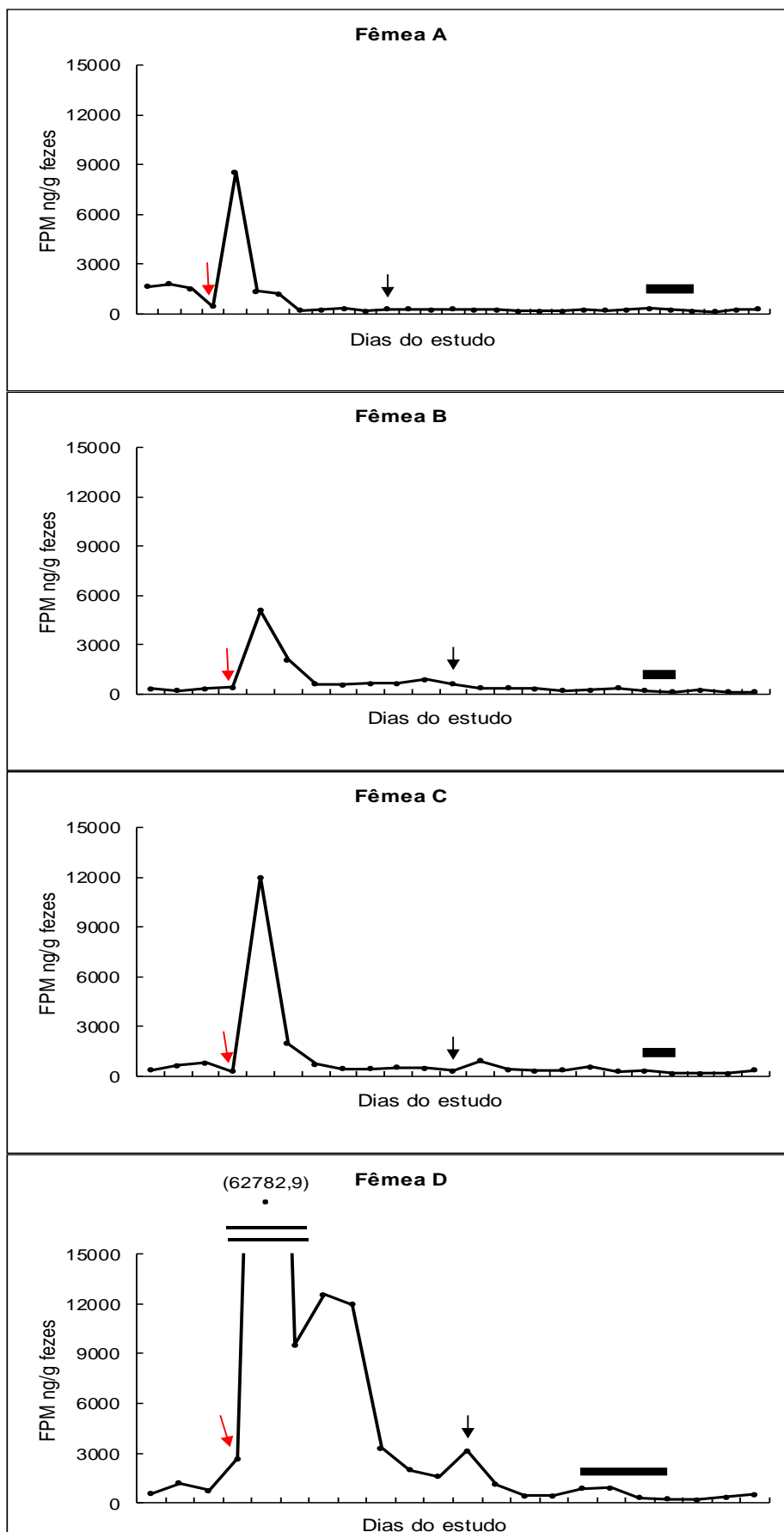


Figura 12. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) (ng/g fezes) de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira* (Fêmeas: A, B, C e D) durante o tratamento P4LA (administração

de 75mg de P4LA no período da manhã no primeiro dia do tratamento). A seta vermelha representa a administração da P4LA. A seta preta representa a administração de cloprostenol sódico ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e a barra preta indica os períodos de estro comportamental.

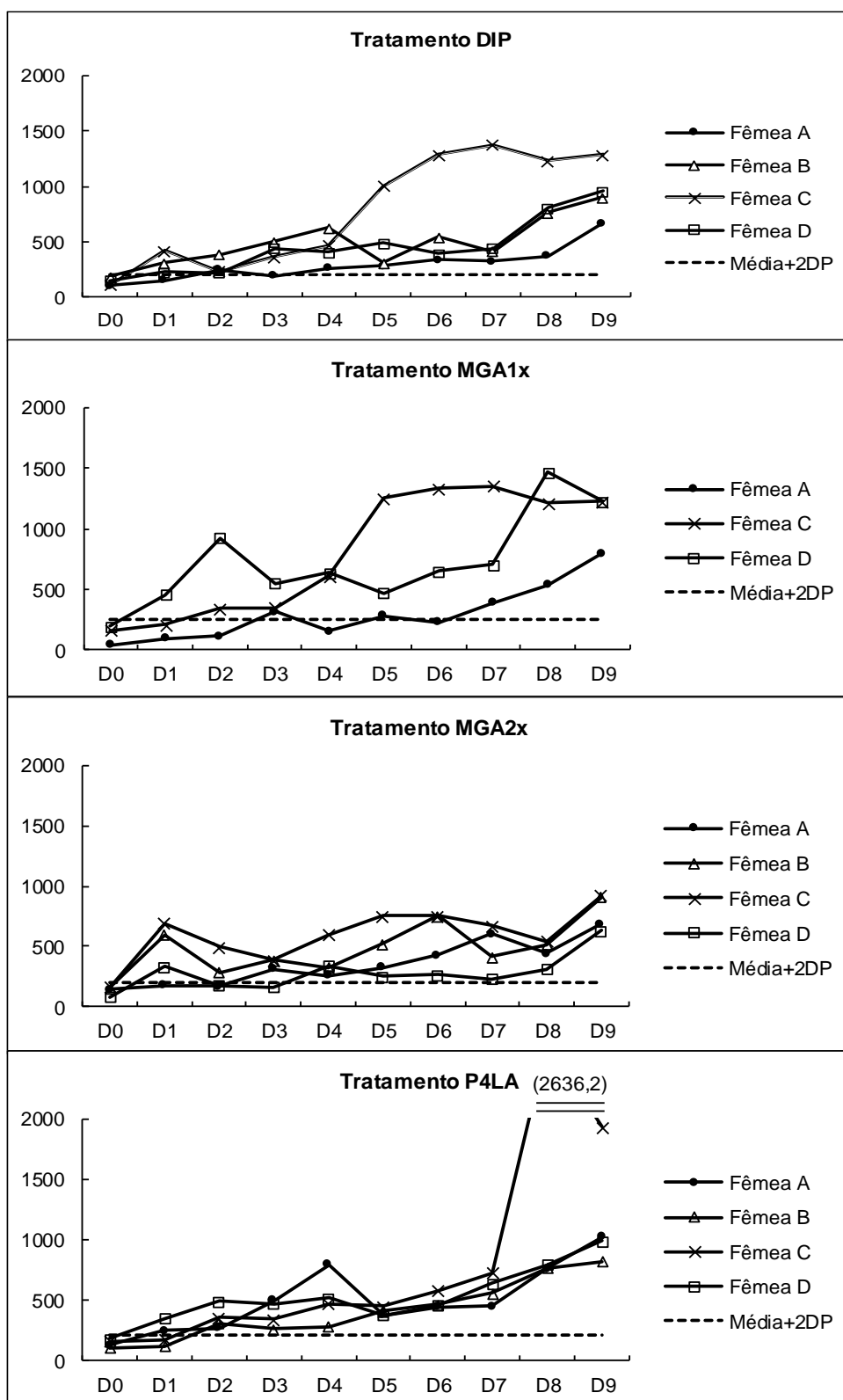


Figura 13. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal de quatro fêmeas de *Mazama gouazoubira*: A, B, C e D, a partir de um dia após o último dia de estro comportamental (D0) até dez dias após o estro (D9), após o tratamento DIP, tratamento MGA1x, tratamento MGA2x e

tratamento P4LA, respectivamente. Linha tracejada: concentração basal dos metabólitos de progesterona fecal. Concentração acima deste limite sugere formação de corpo lúteo.

Tabela 5. Concentração dos metabólitos de progesterona fecal (FPM) de quatro fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* no D0 e D9 do tratamento DIP (dispositivo intravaginal durante oito dias), tratamento MGA1x (1mg de MGA oferecida no período da manhã durante oito dias), tratamento MGA2x (0,5mg de MGA oferecida de manhã e 0,5mg a tarde durante oito dias) e tratamento P4LA (75mg de P4LA no primeiro dia do tratamento).

| Tratamento | Fêmea | [P4] (ng/g fezes) ¹ | [P4] (ng/g fezes) ² |
|------------|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | A | 102,1 | 665,8 |
| | B | 186,6 | 899,7 |
| | C | 108,9 | 1286,1 |
| | D | 152,8 | 956,3 |
| | Média ± EPM | 137,6 ± 19,8 | 952,0 ± 127,9 |
| 2 | A | 41,5 | 789,3 |
| | B | | |
| | C | 163,3 | 1223,6 |
| | D | 195,1 | 1222,6 |
| | Média ± EPM | 133,3 ± 46,8 | 1078,5 ± 144,6 |
| 3 | A | 141,0 | 687,8 |
| | B | 158,5 | 910,4 |
| | C | 164,3 | 926,0 |
| | D | 81,3 | 633,6 |
| | Média ± EPM | 136,3 ± 19,0 | 789,5 ± 75,2 |
| 4 | A | 126,1 | 1022,0 |
| | B | 110,0 | 824,8 |
| | C | 163,4 | 1934,0 |
| | D | 182,7 | 991,7 |
| | Média ± EPM | 145,6 ± 16,7 | 1193,1 ± 250,7 |

¹ Um dia após o último dia de estro comportamental (D0)

² Dez dias após o último dia de estro comportamental (D9).

5. DISCUSSÃO

Em relação ao tratamento DIP, todas as fêmeas manifestaram estro comportamental em um intervalo de 49 – 81 horas após o tratamento, semelhante ao que foi observado por Zanetti et al. (2010) (52 – 88 horas) em um protocolo de curta duração (8 dias). Entretanto, Duarte e Garcia (1995) relataram um curto período de início ao estro após o tratamento (48 – 72 horas) utilizando

dispositivos intravaginais de medroxiprogesterona em um protocolo de longa duração (14 dias). Os protocolos de curta duração podem levar a um intervalo maior em relação ao início do estro após o fim do tratamento, assim como foi descrito em algumas espécies de cervídeos (Morrow et al., 1995; Flint et al., 1997). Este intervalo pode estar relacionado aos resíduos de progesterona no tecido adiposo após a remoção do dispositivo intravaginal (Wheaton et al., 1993) e ao estágio da onda folicular no final do tratamento (Roche et al., 1999). Contudo, os protocolos de curta duração são frequentemente utilizados devido à persistência folicular causada pelos protocolos de longa duração (12 – 14 dias) (Menchaca et al., 2017), podendo afetar a taxa de fertilidade, assim como foi observado em *Cervus elaphus* (Fennessy et al., 1990) e *Dama dama* (Morrow et al., 1995). Por meio da detetabilidade do DIP pelo ensaio imunoenzimático, foi possível observar que as fêmeas apresentaram padrões semelhantes de FPM durante o tratamento com DIP, embora com diferentes concentrações de FPM notáveis entre as fêmeas (Figura 9). O incremento da concentração de FPM após a inserção do DIP pôde ser observada um dia após, devido à oscilação hormonal de 12 a 24 horas das amostras fecais em relação ao sangue. Além disso, é possível visualizar que no 3º dia após a inserção, as concentrações de FPM decresceram, porém, em concentrações suficientes para suprimir o estro (Figura 9). Após a retirada da fonte endógena e exógena de progesterona, com a remoção do DIP e aplicação de PGF2 α , as concentrações de FPM diminuíram consideravelmente em todas as fêmeas (Figura 9).

A dose de 1mg de MGA fornecida uma vez ao dia em protocolos de sincronização do estro sugerem a eficácia do progestágeno em prevenir a manifestação do estro comportamental, como foi descrito por Tanaka et al. (2020). Entretanto, o longo intervalo de início ao estro após o tratamento também foi relatado por Tanaka et al. (2020), com uma sincronia de 60 horas, semelhante ao que foi observado no presente estudo, com uma sincronia de 48 horas. Embora o MGA tenha sido ofertado aos animais de forma individual para assegurar um consumo uniforme e evitar perdas, a absorção e o metabolismo de um progestágeno oral pode implicar em variação nas concentrações circulantes (Perry et al., 2004). O MGA pode ser estocado no tecido adiposo e liberado na corrente sanguínea em diferentes taxas após o tratamento entre as

fêmeas, o que poderia justificar o longo intervalo de início ao estro (Neff, 1983; Martinez-Alvarez et al., 2007). Além do peso e condição corporal, a metabolização do MGA pode ser diferente entre as fêmeas em relação às suas características particulares como idade, dieta, quantidade de alimento ingerido, tempo de intervalo entre as ingestões e funcionamento do trato gastrointestinal (TGI) (Stevens e Hume, 1995; Pereira et al., 2010). Por sua vez, a molécula do MGA pode ser modificada devido à ação de enzimas e microorganismos presentes no TGI (Stanczyk, 2003). Em relação a este tratamento, apenas a Fêmea B não apresentou estro comportamental após oferta de 1mg de MGA pela manhã por oito dias, sugerindo não resposta ao tratamento.

De acordo com Windorski et al. (2008), a dose diária de MGA repartida em dois períodos (manhã e tarde), poderia proporcionar uma menor variação no tempo de início ao estro em ovelhas, resultando em uma concentração maior e constante de progesterona no sangue (Kojima et al., 2000). Nesse estudo, foi observado que a repartição da dose diária do MGA ocasionou em uma menor variação de início ao estro entre as fêmeas no tratamento MGA2x (29 – 31 horas) e, conseqüentemente, uma melhor sincronia (32 horas) em relação ao tratamento MGA1x. Entretanto, nenhuma diferença estatística foi observada entre os tratamentos. Após o tratamento MGA2x, a fêmea C não permitiu a aproximação ou monta do macho, entretanto, apresentava hiperemia vaginal e secreção mucosa, indicativo de estro comportamental. Além disso, foi observado um aumento progressivo nas concentrações de FPM após o período sugestivo de manifestação do estro, sugerindo uma potencial ovulação e formação do corpo lúteo subsequente. Por isso, foi especulado a ocorrência de um “estro silencioso” (Figura 11: Fêmea C). O acetato de melengestrol, por ser um progestágeno sintético, não possui afinidade pelo anticorpo CL425 e conseqüentemente, não é detectado pelo ensaio imunoenzimático. Por isso, os gráficos das concentrações de FPM demonstram os níveis de progesterona endógena das fêmeas, refletindo a presença ou não de corpo lúteo durante os tratamentos (Figura 10 e Figura 11).

A progesterona injetável de longa ação (P4LA), apesar de ser mais utilizada após protocolos de IATF (Sampaio et al, 2015; Pugliesi et al 2016; Motta et al., 2020), demonstrou ser eficaz em protocolos de sincronização do estro

(Rocha et al., 2011; Campos et al., 2016), ressincronização do estro (Pugliesi et al., 2019) e indução da ciclicidade (Lemes et al., 2017; Souza, 2018), todos os estudos na espécie bovina. No entanto, o longo intervalo entre a administração de PGF2 α e início ao estro e baixa sincronia de estro entre as fêmeas sugerem que a dose de 75mg de P4LA foi alta e ineficaz para *Mazama gouazoubira*. Além disso, para o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo utilizando a P4LA em protocolos de sincronização do estro em cervídeos; apesar de que, deve ser mencionado, que a farmacodinâmica da progesterona exógena não é totalmente conhecida.

Devido ao armazenamento da progesterona no tecido adiposo descrito em vários estudos (Perry et al., 2005; Wheaton et al., 1993), a proporção do peso corporal pode estar associada à taxa de eliminação do esteroide para a corrente sanguínea em diferentes taxas entre os animais (Windorski et al., 2008; Hamudikuwanda et al., 1996). No presente estudo, uma relação pôde ser observada entre a condição corporal da fêmea e o intervalo entre a administração de PGF2 α e início do estro após a única administração de P4LA. A fêmea A tem maior peso corporal entre as fêmeas do estudo e conseqüentemente, apresentou o maior intervalo de início ao estro (288 horas) após a aplicação de PGF2 α . De forma similar, a fêmea D apresenta menor peso corporal e teve o menor intervalo PGF2 α - estro. Apesar dessas considerações, os dados do último dia de estro comportamental natural e as concentrações de FPM, pode ser sugerido que a fêmea A não apresentava corpo lúteo e o atraso no início do estro foi provavelmente a presença ativa da P4LA no sangue. Portanto, pode ser especulado que a progesterona originada da P4LA foi armazenada no tecido adiposo e liberada no sangue em diferentes taxas entre as fêmeas. Por meio das concentrações de FPM após a administração da P4LA, mensuradas pelo ensaio imunoenzimático, pôde ser observado que todas as fêmeas apresentaram pico de concentração imediatamente após a administração da P4LA (Figura 12). Em seguida, as concentrações de P4 decrescem consideravelmente, mas em concentrações capazes de bloquear manifestação do estro. Na fêmea A, as concentrações elevadas de P4 se mantiveram por um período maior mesmo após a administração de PGF2 α . Vale

ressaltar que, devido à oscilação hormonal das fezes em relação ao sangue, esse pico é visualizado após 24 horas.

Apesar do uso da P4LA não ter sido eficaz no presente estudo, deve ser ressaltado que a única aplicação intramuscular de P4LA, baixa intervenção animal e, conseqüentemente, baixo manejo refletem sua alta aplicabilidade e relevância em biotécnicas reprodutivas em cervídeos. Entretanto, devido ao número limitado de animais, essa relação entre peso corporal e metabolização da P4LA deve ser melhor investigada e além disso, considerar o reajuste de dose nessa espécie.

A duração do estro no tratamento DIP, MGA2x e P4LA foram similares ao descrito por Zanetti et al. (2010), com uma duração de 24 – 52 horas em fêmeas sincronizadas de *M. gouazoubira* e à duração do estro natural (12 – 54 horas) descrita por Santos et al. (2001). Entretanto, esses intervalos foram menores em comparação ao tratamento MGA1x, que apresentou uma duração do estro de 24 – 68 horas.

Em relação aos períodos do estudo, foi observado que os períodos I e II (conduzidos no inverno) apresentaram duração do estro mais longo em relação aos períodos III e IV (conduzidos na primavera). Apesar do *Mazama gouazoubira* não possuir sazonalidade reprodutiva, sabe-se que as variações ambientais, nutrição, manejo e umidade podem alterar a fisiologia reprodutiva de cervídeos neotropicais (Bubenik et al., 1991; Pereira et al., 2010). Na espécie bovina, é descrito que o estresse térmico pelo calor promove uma curta duração do estro (Gwazdauskas et al., 1981; Gwazdauskas, 1985), sugerindo que o aumento do hormônio adrenocorticotrófico influenciaria negativamente a relação estrógeno/progesterona, diminuindo a expressão do estro (Landaeta-Hernandez et al., 2002). De acordo com as temperaturas médias durante os períodos de estudo, pode-se sugerir que o período I (Min: 12,3°C; Max: 26,5°C) e o período II (Min: 13,8°C; Max: 29,4°C) apresentaram condições climáticas naturais mais agradáveis em relação aos períodos III (Min: 22,4°C; Max: 37,9°C) e IV (Min: 19,3°C; Max: 31,5°C) (INMET). Além do fator temperatura/ estresse, estudos relatam a influência do genótipo, idade e histórico reprodutivo na duração do estro em vacas (Landaeta-Hernandez et al., 2002), o que justifica a diferença

observada entre as fêmeas de *Mazama gouazoubira* no presente estudo ($P < 0,05$).

As concentrações de FPM foram mensuradas por dez dias após o final do estro comportamental com a intenção de observar um aumento progressivo que sugerisse a ocorrência de ovulação. Os dias referentes ao estro comportamental foram associados aos menores valores nas concentrações de FPM, assim como também foi observado por Pereira et al. (2006) e Zanetti et al. (2010). Um aumento progressivo na concentração de FPM com valores acima da linha basal de FPM, puderam ser observados ao longo dos dias após o estro, sugerindo a formação de corpo lúteo em todas as fêmeas que responderam aos tratamentos (15/15). Pereira et al. (2006) observaram que a média das concentrações de FPM durante a fase luteal ($357 \pm 22,0$ ng/g fezes) em ciclo estral natural em *Mazama gouazoubira* pode atingir três vezes a média das concentrações de FPM da fase interluteal ($91,3 \pm 9,6$ ng/g fezes). Embora o presente estudo não avaliou todo o período de ciclo estral, foi possível observar um aumento significativo nas concentrações de FPM dez dias após o final do estro nos tratamentos em relação às concentrações de FPM durante os dias de estro comportamental. No tratamento DIP, a concentração média de FPM no D9 (dez dias após o estro comportamental) foi sete vezes a concentração média no D0 (um dia após o último dia de estro comportamental). No tratamento MGA1x, a concentração média de FPM no D9 foi oito vezes a concentração média no D0; No tratamento MGA2x, a concentração média no D9 foi quase seis vezes a concentração no D0 e no tratamento P4LA, a concentração média no D9 chegou a ser oito vezes a concentração média no D0.

Os tratamentos DIP, MGA1x e MGA2x obtiveram bons resultados na sincronização do estro em *Mazama gouazoubira*. Entretanto, a utilização da dose diária do acetato de melengestrol repartida duas vezes ao dia (MGA2x), como esperado, demonstrou ser eficaz na sincronia do estro. As fêmeas apresentaram baixa variação no intervalo entre a administração da PGF2 α e início do estro com uma sincronia de 32 horas, sendo considerada a melhor entre os outros tratamentos do presente estudo. O emprego desse tratamento em cervídeos, apesar de exigir um manejo maior, possui alta relevância, por ser um

progestágeno oral e palatável e pela não necessidade de contenção física ou manual, já que, os cervídeos são animais altamente suscetíveis ao estresse.

A fim de confirmar a ocorrência de ovulação, o ideal seria acessar a presença do corpo lúteo através de laparoscopia, assim como foi realizado por Asher et al. (1992) e Zanetti et al. (2010). No entanto, devido ao delineamento experimental utilizando os mesmos animais, os procedimentos cirúrgicos e anestésicos seriam inviáveis. Além disso, devido a duração de todo o estudo e ao número limitado de animais, não foi possível avaliar taxa de fertilidade.

6. CONCLUSÃO

Os tratamentos DIP, MGA1x e MGA2x foram efetivos na sincronização do estro em *Mazama gouazoubira* com sugestiva formação de corpo lúteo observada pela concentração dos metabólitos de progesterona fecal. Por outro lado, a dose de 75mg de P4LA utilizada no tratamento P4LA demonstrou ser muito alta e não efetiva para a espécie, como observado no longo intervalo entre a administração de PGF2A e início do estro e baixa sincronia entre as fêmeas.

7. REFERÊNCIAS

- Ainsworth, L.; Shrestha, J. N. B., 1983. Effect of type of intravaginal progestagen treatment on estrous response and reproductive performance of ewes. **Theriogenology**, v. 19, p. 869-875.
- Asher, G. W.; Adam, J. L.; Otway, W.; Bowmar, P.; Van Reenan, G.; Mackintosh, C. G.; Dratch, P., 1988a. Hybridization of Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*) and Red deer (*Cervus elaphus*) by artificial insemination. **Journal Zool**, London, v. 215, p. 197-203.
- Asher, G. W.; Adam, J. L.; James, R. W.; Barnes, D., 1988b. Artificial insemination of farmed fallow deer (*Dama dama*): fixed-time insemination at a synchronized oestrus. **Animal Science**, v. 47, p. 487-492.

Asher, G. W.; Fisher M. W.; Jabbour H. N.; Smith J. F.; Mulley R. C.; Morrow C. J.; Veldhuizen F. A.; Langridge M., 1992. 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**, v. 96, p. 261-273.

Asher, G. W.; Scott, I. C.; O'Neill, K. T.; Smith, J. F.; Inskoop, E. K.; Townsend, E. C., 1997. Ultrasonographic monitoring of antral follicle development in red deer (*Cervus elaphus*). **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 111, p. 91-99.

Bainbridge, D. R., Hunter, M. G., Chapple, D. G., Flint, A. P.; Jabbour, H. N., 1996. Role of estrogen and prostaglandin F2 α in premature luteal regression in monovulatory and superovulated Red Deer (*Cervus elaphus*). **Biology of reproduction**, v. 54, n. 2, p. 347-354.

Bainbridge, D. R. J.; Jabbour, H. N., 1998. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Veterinary record**, v. 143, n. 6, p. 159-168.

Balfour, W. E.; Comline, R. So; Short, R. Vo., 1957. Secretion of progesterone by the adrenal gland. **Nature**, v. 180, n. 4600, p. 1480-1481.

Bamberg, E.; Mostl, E.; Platz, M.; King, G. J., 1991. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v. 22, p. 73-77.

Barrozo, L. A.; Toniollo, G. H. I.; Duarte, J. M. B.; Pinho, M. P.; Oliveira, J. A., 2001. Padrão anual de variação da testosterona sérica, volume testicular e aspectos seminais de veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*, Fisher, 1814) em cativeiro. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, p. 210-211.

Bartlewski, P. M.; Aravindakshan, J.; Beard, A. P.; Nelson, M. L.; Batista-Arteaga, M.; Cook, S. J.; Rawlings, N. C., 2004. Effects of medroxyprogesterone acetate (MAP) on ovarian antral follicle development, gonadotrophin secretion and response to ovulation induction with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in seasonally anoestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 1-2, p. 63-75.

Bergallo, H. G. C.; Rocha, F. D.; Alves, M. L. S.; Sluys, M., 2000. A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro, **EdUERJ**, Rio de Janeiro.

Black-Decima, P. A.; Vogliotti, A., 2016. *Mazama gouazoubira*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, p. 2016-2020.

Blanvillain, C.; Berthier, J. L.; Bomsel-Demontoy, M. C.; Sempere, A. J.; Olbricht, G.; Schwarzenberg, F., 1997. Analysis of reproductive data and measurement of fecal progesterone metabolites to monitor the ovarian function in the Pudu (*Pudu puda*). **Mammalia**, v. 61, p. 589-602.

Bó, G. A.; Adams, G. P. Caccia, M.; Martinez, M.; Pierson, R. A.; Mapletoft, R. J., 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**., v. 39, p. 193-204.

Bubenik, G. A., Brown, R. D., Schams, D., 1991. Antler cycle and endocrine parameters in male axis deer (*Axis axis*): Seasonal levels of LH, FSH, testosterone, and prolactin and results of GnRH and ACTH challenge tests. **Comp. Biochem. Physiol.** -- Part A Physiol., v. 99, p. 645-650.

Campos, J. T.; Morotti, F.; Costa, C. B.; Bergamo, L. Z.; Seneda, M. M., 2016. Evaluation of pregnancy rates of *Bos indicus* cows subjected to different synchronization ovulation protocols using injectable progesterone or na intravaginal device. **Semina Ciências Agrárias**, v. 37, n. 6, p. 4149-4156.

Cavalieri, J.; Gaina, C.; Hepworth, G., 2018. Randomised controlled trial of the effect of concentration of progesterone before artificial insemination on fertility in ovulatory and anovulatory *Bos indicus* cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 96, p. 346-355.

Cavalieri, J., 2019. Absence of a corpus luteum and relatively lesser concentrations of progesterone during the period of pre-ovulatory follicle emergence results in lesser pregnancy rates in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 204, p. 39-49.

Colazo, M. G.; Kastelic, J. P.; Mapletoft, R. J., 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 855-865.

Colazo, Marcos G.; Mapletoft, R.; Martinez, M. F.; Kastelic, J., 2007. El uso de tratamientos para sincronizar el celo y la ovulación en vaquillonas.

Christofoletti, D. M., 2010. Perfil de Progesteronas Fecais Durante a Gestação de Veado- Campeiro (*Ozotoceros Bezoarticus*) No Pantanal. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária: Reprodução Animal). Faculdade de ciências agrarias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

Cursino, M. S.; Salviano, M. B.; Abril, V. V.; dos Santos Zanetti, E. Duarte, J. M. B., 2014. The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 1-13.

Dobson, H.; Smith, R. F., 2000. What is stress, and how does it affect reproduction. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 743-752.

Duarte, J. M. B.; Garcia, J. M., 1995. Reprodução assistida em cervídeos brasileiros. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 19, p. 111-121.

Duarte, J. M. B., 1996. Guia de identificação dos cervídeos brasileiros. Jaboticabal, FUNEP, p. 14.

Duarte, J. M. B., 1997. Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*, Jaboticabal, FUNEP.

Duarte, J. M. B.; Beisiegel, B. M.; Medici, E. P.; Keuroghlian, A.; Léonard, A.; Desbiez, J., 2012. Biodiversidade brasileira, número temático, avaliação do estado de conservação dos ungulados. **Biodiversidade Brasileira**, Ano II Nº 3, 1-2.

Ekrami, B.; Moghadas, D.; Tamadon, A., 2012. Control of red deer (*Cervus elaphus*) stag domination in rut season by estrus synchronization. **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, v. 6, n. 3, p. 155-158.

Emsen, E.; Gimenez-Diaz, C.; Kutluca, M.; Koycegiz, F., 2011. Reproductive response of ewes synchronized with different lengths of MGA treatments in intrauterine insemination program. **Animal Reproduction Science**, v. 126, n. 1-2, p. 57-60.

Fanning, M. D.; Spitzer, J. C.; Burns, G. L.; Plyler, B. B., 1992. Luteal function and reproductive response in suckled beef cows after metestrus administration of a norgestomet implant and injection of estradiol valerate with various dosages of injectable norgestomet. **Journal of animal science**, v. 70, n. 5, p. 1352-1356.

Fennessy, P. F.; Fisher, M. W.; Shackell, G. H.; Mackintosh, C. G., 1989. Superovulation and embryo recovery in red deer (*Cervus elaphus*) hinds. **Theriogenology**, Stoneham, v. 32, n. 5, p. 877-883.

Fernandez, D.; Salazar, E., 2007. Determinación de niveles de progesterona en sangre luego de la administración parenteral de progesterona y evaluación de diferentes protocolos de sincronización de celos em vaquillonas de la raza Holando. Tese de Doutorado: Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, p. 58.

Fortune, J. E., 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biological Reproduction**, v. 50, p. 225.

Frädrieh, H., 1987. The husbandry of tropical and temperate cervids in the West Berlin zoo. In: Wemmer, C (Ed.). **Biology and management of the Cervidae**. Washington D. C.: Smithsonian Inst. Press, p. 422-428.

Galindo, D. J.; Garcia, J. M.; Oliveira, M. E. F.; Duarte, J. M. B., 2015. Superovulation with equine chorionic gonadotropin in Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Spermova**, v. 5, p. 163-167.

Garrot, R. A., Monfort, S. L., White, P. J., Mashburn, K. L., Cook, J. G., 1998. One-sample pregnancy diagnosis in elk using fecal steroid metabolites. **J Wildl Dis.**, v. 34, p. 126-131.

Ginther, O. J.; Beg, M. A.; Donadeu, F. X.; Bergfelt, D. R., 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257.

Ginther, O. J.; Bergfelt, D. R.; Kulick, L. J.; Kot, K., 1999. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079-1093.

Ginther, O. J.; Berfelt, D. R.; Kulick, L. J.; Kot, K., 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biological Reproduction**, Champaign, v. 63, p. 383-389.

Gomes, W. R.; Erb, R. E., 1965. Progesterone in bovine reproduction: A review. **Journal of dairy science**, v. 48, n. 3, p. 314-330.

Gonzalez-Padilla, E.; Niswender, G. D.; Wiltbank, J. N., 1975. Puberty in beef heifers. Effects of injections of progesterone and estradiol-17beta on serum LH, FSH and ovarian activity. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 1105-1109.

Gwazdauskas, F. C.; Thatcher, W. W.; Kiddy, C. A.; Paape, M. J.; Wilcox, C. J., 1981. Hormonal patterns during heat stress following PGF₂ α -tham salt induced luteal regression in heifers. **Theriogenology**, v. 16, n. 3, p. 271-285.

Gwazdauskas, F. C., 1985. Effects of climate on reproduction in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 6, p. 1568-1578.

Hamasaki, S. I.; Yamauchi, K.; Ohki, T.; Murakami, M.; Takahara, Y.; Takeuchi, Y.; Mori, Y., 2001. Comparison of various reproductive status in sika deer (*Cervus nippon*) using fecal steroid analysis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 2, p. 195-198.

Hansel, W.; Convey, E. M., 1983. Physiology of the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 2, p. 404-424.

Hodges, J. K., 1996. Determining and manipulating female reproductive parameters. In: Kleiman, D. G., Allen, M. E., Thompson, K. V., Lumpkin, S., Harris, H. (Eds.), **Wild Mammals in Captivity Principles and Techniques**. The University of Chicago Press, Chicago/London, p. 418-428.

Hosack, D. A.; Miller, K. V.; Marchinton, R. L.; Monfort, S. L., 1997. Ovarian activity in captive eld's deer (*Cervus eldi thamin*). **Journal Mammal**, v. 78, p. 669-674.

Hosack, D. A.; Miller, K. V.; Ware, L. H.; Mashburn, K. L.; Morrow, C. L.; Williamson, L. R.; Marchinton, R. L.; Monfort, S. L., 1999. 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.

Imwalle, D. B.; Fernandez, D. L.; Schillo, K. K., 2002. Melengestrol acetate blocks the preovulatory surge of luteinizing hormone, the expression of behavioral estrus, and ovulation in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 80, n. 5, p. 1280-1284.

Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil – **INMET**. Normais Climatológicas (1961/1990). Brasília - DF, 1992.

Ireland, J. J., 1987. Control of follicular growth and development. **Journal Reproduction Fertility**, v. 34, p. 39-54.

Jabbour, H.N.; Argo, C.M.; Brinklow, B.R.; Loudon, A.S.I.; Hooton, J., 1993. Conception rates following intrauterine insemination of European (*Dama dama dama*) fallow deer does with fresh or frozen-thawed Mesopotamian (*Dama dama mesopotamica*) fallow deer spermatozoa. **J Zool** (London), v. 230, p. 379-384

Kapke, C. A.; Arcese, P.; Ziegler, T. E.; Scheffler, G. R., 1999. Estradiol and progesterone metabolite concentration in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) feces. **Journal Zoo Wildl Med**, v. 30, p. 361-371.

Klopper, A.; Strong, J. A.; Cook, L. R., 1957. The excretion of pregnanediol and adrenocortical activity. **Journal of Endocrinology**, v. 15, n. 2, p. 180-189.

Knox, W. M.; Miller, K. V.; Collins, D. C.; Bush, P. B.; Kiser, T. E.; Marchinton, R.L., 1992. Serum and Urinary levels of reproductive hormones associated with the estrous cycle in white-tailed deer (*Odocoileus Virginianus*). **Zoo Biol.**, v. 11, p. 121-131.

Kojima, F. N., 2003. The estrous cycle in cattle: Physiology, Endocrinology, and Follicular waves. **The professional animal scientist**, v. 19, n. 2, p. 83-95.

Krepschi, V. G.; Polegato, B. F.; Zanetti, E. S.; Duarte, J. M., 2013. Fecal progestins during pregnancy and postpartum periods of captive red brocket deer (*Mazama americana*). **Anim Reprod Sci**, v. 137, n. 1-2, p. 62-68.

- Krzywinski A, Jaczewski Z., 1978. Observations on the artificial breeding of red deer. **Symp Zool Soc London**, v. 43, p. 271–287.
- Landaeta-Hernández, A. J.; Yelich, J. V.; Lemaster, J. W.; Fields, M. J.; Tran, T.; Chase Jr, C. C.; Rae, D. O.; Chenoweth, P. J., 2002. Environmental, genetic and social factors affecting the expression of estrus in beef cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1357-1370.
- Lemes, K. M., 2017. Comparação da eficiência de diferentes formulações à base de progesterona para indução da puberdade e desempenho reprodutivo em novilhas da raça Nelore. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- Li, C. W.; Jiang, Z. G.; Jiang, G. H.; Fang, J. M., 2001. Seasonal changes of reproductive behavior and fecal steroid concentrations in Pere David's deer. **Horm Behav**, v. 40, p. 518-525.
- Lima, R. S., 2017. Emprego de progesterona injetável de longa ação para pré-sincronização da ovulação em novilhas Nelore. Tese de doutorado em Ciências. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- Locatelli, Y.; Mermillod, P., 2005. Caractéristiques et maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. **INRA Prod. Anim.**, Paris, v. 18, n. 1, p. 3-25.
- Macmillan, K. L.; Day, A. M., 1982. Prostaglandin F₂α—a fertility drug in dairy cattle?. **Theriogenology**, v. 18, n. 3, p. 245-253.
- Macmillan, K. L.; Taufa, V. K.; Day, A. M., 1986. Effects of an agonist of gonadotrophin releasing hormone (Bureselin) in cattle. III. Pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or dioestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 11, p. 1-10, 1986.
- Mallory, D. A.; Wilson, D. J.; Busch, D. C.; Ellersieck, M. R.; Smith, M. F.; Patterson, D. J., 2010. Comparison of long-term progestin-based estrus synchronization protocols in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 88, n. 11, p. 3568-3578.

Mann, G. E.; Lamming, G. E., 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 175-180.

Mapletoft, R. J.; Martinez, M. F.; Colazo, M. G.; Kastelic, J. P., 2003. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. **Journal of animal science**, v. 81, p. 28-36.

Marques, A. A. B.; Fontana, C. S.; Vélez, E.; Bencke, G. A.; Schneider, M.; Reis, R. E., 2002. Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul: Decreto no 41.672, de 10 junho de 2002. Porto Alegre: FZB / MCT–PUCRS / Pangea (Publicações Avulsas FZB, 11).

Martins, L. T.; Neto, P. C. S.; Neto, S. G.; Rauber, L. P.; Bertolinil, M.; Diniz, V. A.; Mezzalira, A., 2010. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2., p. 389-395.

Martinez, M. F.; Kastelic, J. P.; Adams, G. P. AND Mapletoft, R. J., 2002. 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. **Journal of Animal Science**, v.80, p. 1746- 1751.

Martínez-Álvarez, L. E.; Hernández-Cerón, J.; González-Padilla, E.; Perera-Marín, G.; Valencia, J., 2007. Serum LH peak and ovulation following synchronized estrus in goats. **Small Ruminant Research**, v. 69, p. 124-128.

Mcleod, B. J.; Meikle, L. M.; Fisher, T. R.; Manley, T. R.; Heath, D. A.; McNatty, P., 2001. Variation in antral follicle development during the follicular phase of the oestrous cycle in red deer (*Cervus elaphus*) hinds. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 697-705.

McNatty, K. P.; Heath, D. A.; Henderson, K. M.; Lun, S.; Hurst, P. R.; Ellis, L. M.; Montgomery, G. W.; Morrison, L.; Thurley, D. C., 1984. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 72, p. 39-53.

Menchaca, A.; Neto, C. D. S.; Cuadro, F., 2017. Estrous synchronization treatments in sheep: brief update. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 340-344.

Micheletti, T.; Brown, L. J.; Walter, S. L., 2014. 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.

Miyake, T.; Pincus, G., 1958. Progestational activity of certain 19-nor steroids and progesterone derivatives. **Endocrinology**, v. 63, n. 6, p. 816-824.

Monfort, S. L., 2003. Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations in *Reproductive Science and Integrated Conservation* edited by WV Holt, AR Pickard, JC Rodger and DE Wildt, p. 147-165.

Monfort, S. L.; Wemmer, C.; Kepler, T. H.; Bush, M.; Brown, J. L.; Wildt, D. E., 1990. Monitoring ovarian function and pregnancy in Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) by evaluating urinary steroid metabolite excretion. **Journal Reproduction Fertility**, v. 88, p. 271-281.

Moraes, J. C. F.; Souza, C. J. H.; Gonçalves, P. B. D.; Freitas, F. V. J.; Junior, L. S. E., 2008. 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.

Morotti, F.; Campos, J. T.; Oliveira, E. R.; Seneda, M. M., 2013. Ovarian follicular dynamics of Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to a fixed-time artificial insemination protocol with injectable progesterone. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 3859-3866.

Morrow, C. J.; Asher, G. W.; Smith, J. F.; Jabbour, H. N.; Mulley, R. C.; Mcleay, L.M., 1992. Seasonal effects on the efficacy of intravaginal CIDR devices for oestrous synchronization of farmed fallow deer (*Dama dama*). **Proc NZ Soc Anim Prod.**, v. 52, p. 165-169.

Morrow, C. J., Asher, G. W., & Macmillan, K. L., 1995. Oestrous synchronisation 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. 3, n.2, p. 159-174.

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

Neff, A. W., 1983. Analytical methods for MGA (melengestrol acetate). In: Meissonnier, E.; Mitchell, V. J. Proceedings of a Symposium on Anabolics in Animal Production: Public Health Aspects, Analytical Methods and Regulation. Paris: **Office International des Epizooties**, p. 457-485.

Neto, A. R. F.; Zanatta, G. M.; Fernando, D.; Freitas, B. G.; Bastos, M. R.; Guerreiro, B. M.; Massari, P. J.; Melo, G. D.; Mingoti, R. D.; Baruselli, P. S., 2017. Dosagem de progesterona com o Sincrogest Injetável na indução da ciclicidade. In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Cabo de Santo Agostinho. **Anais...** p. 85.

Niswender, G. D., Reimers, T. J., Diekman, M. A., & Nett, T. M., 1976. Blood flow: a mediator of ovarian function. **Biology of Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 64-81.

Oliveira, M. E. F.; Zanetti, E. S.; Cursino, M. S.; Peroni, E. D. F. C.; Rola, L. D.; Feliciano, M. A. R.; Duarte, J. M. B., 2016. First live offspring of Amazonian brown brocket deer (*Mazama nemorivaga*) born by artificial insemination. **European journal of wildlife research**, v. 62, n. 6, p. 767-770.

Orjuela, L. L. C., 2016. Avaliação do uso de acetato de melengestrol (MGA) via oral em fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*).

Patterson, D. J.; Kiracofe, G. H.; Stevenson, J. S.; Corah, L. R., 1989. Control of the bovine estrous cycle with melengestrol acetate (MGA): **A review J. Anim. Sci**, v. 67, p. 1895-1906.

Patterson, D. J.; Corah, L. R.; Brethour, J. R., 1990. Response of prepubertal *Bos Taurus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers to melengestrol acetate with or without gonadotropin-releasing hormone. **Theriogenology**, v. 33, n. 3, p. 661-668.

Patterson, D. J.; Corah, L. R., 1992. Evaluation of melengestrol acetate and prostaglandinF2 alpha system for the synchronization of estrus in beef heifers. **Theriogenology**, v. 38, n. 3, p. 441-448.

Patton, M.L.; Jöchle, W.; Penfold, L.M., 2007. Review of contraception in ungulate species. **Journal of Zoo Biology**, v. 26, n. 4, p. 311-326.

Pereira, J. R. G.; Polegato, B. F.; Souza, S.; Negrão, J. A.; Duarte, J. M. B., 2006. Monitoring ovarian cycle and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, Stoneham, v. 2, p. 387-399.

Pereira, R. J. G., 2010. Male reproduction., in: Duarte, J. M. B.; González, S. (Eds.). **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. FUNEP, Jaboticabal, p. 39-50.

Pereira, R.J.G.; Zanetti, E. S.; Polegato, B.F., 2010. Female reproduction. In: Duarte, J.M.B; Gonzales, S. **Neotropical Cervidology: FUNEP, Jaboticabal**, p.51-63.

Perry, G. A.; Welshons, W. V.; Bott, R. C.; Smith, M. F., 2005. Basis of melengestrol acetate action as a progestin. **Domestic animal endocrinology**, v. 28, n. 2, p. 147-161.

Pinder, L.; Leeuwenberg, F., 1997. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fisher 1814). In: Duarte, J. M. B. (Ed.). *Biologia e conservação de cervídeos SulAmericanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama*. Jaboticabal: **Funep**, p. 60-68.

Polegato, B. F.; Duarte, J. M. B., 2003. Período de gestação e cio pós-parto em veadocatingueiro (*Mazama gouazoubira*). In: Livro de resumos, II Congresso Brasileiro de Mastozoologia. **Sociedade Brasileira de Mastozoologia**. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

Polegato, B. F.; Zanetti, E. S.; Duarte, J. M. B., 2018. Monitoring ovarian cycles, pregnancy and post-partum in captive marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) by measuring fecal steroids. **Conservation physiology**, v. 6, n. 1, p. cox073.

Post, N. M.; Kreider, D. L.; Rorie, R. W., 2005. Case study: timed insemination in beef heifers after synchronization of estrus with controlled intravaginal drug releasing device and melengestrol acetate. **Prof. Animal Science**, v. 21, p. 107-113.

Pugliesi, G., Bisinotto, D. Z., Mello, B. P., Lahr, F. C., Ferreira, C. A., Melo, G. D.; Madureira, E. H., 2019. A novel strategy for resynchronization of ovulation in Nelore cows using injectable progesterone (P4) and P4 releasing devices to perform two timed inseminations within 22 days. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, p. 1149-1154.

Putman, R., 1988. The natural history of deer. New York: **Cornell University Press**.

Quadros, A. P.; Tanaka, Y.; Duarte, J. M., 2020. Avaliação do acetato de melengestrol (MGA) na sincronização do estro em fêmeas de veado-mão-curta (*Mazama nana*) e veado-roxo (*Mazama nemorivaga*): estudo piloto. **R. bras. Reprod. Anim.**, p. 78-80.

Rao, M. M.; Yelisetti, U. M., 2013. Progesterone Profile in Embryo Transfer Recipient Cows. **The Indian Veterinary Journal**, v. 90, n. 1, p. 59.

Raphael, B.L.; Kalk, P.; Thomas, P.; Calle, P.P.; Doherty, J.G.; Cook, R.A., 2003. Use of melengestrol acetate in feed for contraception in herds of captive ungulates. **Journal of Zoo Biology**, v. 22, n. 5, p. 455-463.

Rasby, R. J.; Day, M. L.; Johnson, S. K.; Kinder, J. E.; Lynch, J. M.; Short, R. E.; Wettermann, R. P.; Hafs, H. D., 1998. Luteal function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subsequent injection of estradiol. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 55-64.

R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Rocha, D. C.; Beskow, A.; Pimentel, C. M. M.; Mattos, R. C.; Gregory, R. M., 2011. Níveis séricos de progesterona em vacas ovariectomizadas tratadas com MAD4 com diferentes concentrações e vias de administração. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 9, p. 974.

Rodrigues, R. O.; Trevisanuto, C.; Cooke, R. F.; Vasconcelos, J. L. M., 2011. Effects of body weight loss on serum progesterone concentrations of non-lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 131-137.

Rodrigues, T. F.; Cerveira, J. F.; Duarte, J. M. B., 2014. Uso de áreas agrícolas por *Mazama gouazoubira* (Mammalia, Cervidae) no estado de São paulo. Iheringia, **Sér. Zool.**, v. 104, Porto Alegre.

Roldan, E. R. S.; Gomendio, M.; Garde, J. J.; Espeso, G.; Ledda, S.; Berlinguer, F.; Del Olmo, A.; Soler, A. J.; Arregui, L.; Crespo, C.; Gonzalez, R., 2006. Inbreeding and Reproduction in Endangered Ungulates: Preservation of Genetic Variation through the Organization of Genetic Resource Banks. **Reprod. Dom. Anim.**, Berlin, v. 41, p. 82-92.

Rossi, R. V., 2000. Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artyodactyla, Cervidae). Dissertação (Mestrado), 2000. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Roussel, J. D.; Beatty, J. F., 1969. Effect of melengestrol acetate on synchronization of estrus, subsequent fertility and milk constituents of lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 52, n. 12, p. 2020-2023.

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

Sá Filho, M. F.; Reis, E. L.; Viel Jr, J. O.; Nichi, M.; Madureira, E. H.; Baruselli, P. S., 2004. Dinâmica folicular de vacas Nelore em anestro tratadas com implante auricular, eCG e GnRH. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 235.

Sá Filho, O. G.; Patterson, D. J.; Vasconcelos, J. L. M., 2009. Development of estrous synchronization protocols using melengestrol acetate in *Bos indicus* cattle. **Journal of animal science**, v. 87, n. 6, p. 1981-1990.

Salas, G.; Mata, F.; Perea, M.; Garcidueñas, R.; Gutierrez, E.; Caratachea, A.; Flores, J. P., 2011. Estrus grouping in sheep treated with Melengestrol Acetate (MGA). **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 1, p. 1295-1296.

Salas, R. G.; Rojo, M. J. A.; Garcidueñas, P. R.; Espinoza, V. J. L., 2014. Effect of an intermediate dose of melengestrol acetate (MGA) on ovulation inhibition in ewes. **International Journal of Bioscience**, Biochemistry and Bioinformatics, v. 4, n. 3, p. 171.

Sangsritavong, S.; Combs, D. K.; Sartori, R.; Armentano, L. E.; Wiltbank, M. C., 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 2831-2842.

Santos, G. L.; Ceravolo, L.; Souza, S.; Duarte, J. M. B., 2001. Sazonalidade reprodutiva e duração do ciclo estral e do cio de fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) sob condições de cativeiro. In: Proceedings V Congreso Internacional Manejo del Fauna Silvestre en Amazonia y Latinoamerica, p. 232.

Sartori, R.; Fricke, P. M.; Ferreira, J. C.; Ginther, O. J.; Wiltbank, M. C., 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1403-1409.

Schally, A. V.; Arimura, A.; Kastin, A. J.; Matsuo, H.; Baba, Y.; Redding, T. W.; Nair, R. M. G.; Debeljuk, L.; White, R. F., 1971. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones, **Science**, v. 173, p. 1036.

Schams, D.; Berisha, B., 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. **Reproduction in domestic animals**, v. 39, n. 4, p. 241-251.

Schwartz, C. C.; Monfort, S. L.; Dennis, P.; Hundertmark, K. J., 1995. Fecal progesterone concentration as an indicator of the estrous cycle and pregnancy in moose. **Journal Wildl Manag**, v. 59, p. 590-593.

Schwarzenberger, F.; Brown, J. L., 2013. Hormone monitoring: an important tool for the breeding management of wildlife species. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 100, n. 9-10, p. 209-225.

Sianangama, P. C.; Rajamahendram, R., 1992. Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. **Theriogenology**, v. 38, p. 85-96.

Silva, A.R.; Moreira, N.; Pereira, A.F.; Peixoto, G.C.X.; Maia, K.M.; Campos, L.B.; Borges, A.A., 2017. Estrous cycle monitoring in Wild Mammals: Challenges and Perspectives. A book chapter in Veterinary Medicine and Science "Theriogenology", edited by R. P. Carreira, p. 21-45.

Skarzynski, D. J.; Dias, F. G.; Okuda, K., 2008. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 57-65.

Sontakke, S. D., 2018. Monitoring and controlling ovarian activities in wild ungulates. **Theriogenology**, v. 109, p. 31-41.

Souza, E. D. F.; Azrak, A. J.; Maio, J. R. G.; Teixeira, A. A.; Bastos, M. R.; Sales, J. N. S.; Nogueira, G. P.; Baruselli, P. S., 2012. Perfil plasmático de diferentes doses de progesterona injetável em vacas de leite de alta produção. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES. Resumos... Foz do Iguaçu: SBTE, p. 356.

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

Stevens, C. E.; Hume, I. D., 1995. Digesta transit and retention. *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*, 2nd, p.118–151.

Suarez, G. A. P.; Zunino, B. H.; Carol C. R., 2006. 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.

Sudsukh, A.; Taya, K.; Watanabe, G.; Wajjwalku, W.; Thongphakdee, A.; Thongtip, N., 2017. Annual ovarian activity monitored by the noninvasive measurement of fecal concentrations of progesterone and 17 β -estradiol metabolites in rusa deer (*Rusa timorensis*). **Journal Vet Med Sci**, v. 78, n. 12, p. 1785-1790.

Tanaka, Y.; Americano, A. P.; Galindo, D. J.; Duarte, J. M. B., 2021. Low invasive estrous synchronization protocol for wild animals: an example with melengestrol

acetate in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Anim. Reprod. Sci.**, v. 17.

Thompson, K. V.; Mashburn, K. L.; Monfort, S. L., 1998. Characterization of estrous cyclicity in the Sable Antelope (*Hippotragus niger*) through fecal progesterone monitoring. **Gen. Comp. Endocrinol.**, San Diego, v. 112, p. 129-137.

Viñoles, C.; Forsberg, M.; Banchemo, G.; Rubianes, E., 2001. Effect of long-term and short-term progesterone treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 993-1004.

Walters, D. L., & Schallenberger, E. (1984). Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. **Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 503-512.

Wang, Y. H.; Liu, S. Q.; Yang, S.; Zhang, T. X.; Wei, Y. T.; Zhou, J. T.; Hu, D. F.; Li, L. H., 2016. Determination of ovarian cyclicity and pregnancy using fecal progesterone in forest musk deer (*Moschus berezovskii*). **Anim Reprod Sci**, v. 170, p. 1-9.

Wettemann, R. P.; Morrow, D. A.; Hafs, H. D., 1971. Changes in luteinizing hormone and prolactin, and interval to ovulation after melengestrol acetate in cattle. In: Journal of Dairy Science. 1111 n dunlap ave, savoy, il 61874: **Amer Dairy Science Assoc**, v. 54, p. 780.

Wheaton, J. E.; Carlson, K. M.; Windels, H. F.; Johnston, L. J., 1993. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1-4, p. 127-141.

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

Windorski, E. J.; Schauer, C. S.; Wurst, A. K.; Inskeep, E. K.; Luther, J. S., 2008. Effects of melengestrol acetate and P.G. 600 on fertility in Rambouillet ewes outside the natural breeding season. **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 227-232.

Yamauchi, K.; Hamasaki, S.; Takeuchi, Y.; MORI, Y., 1997. Assessment of reproductive status of sika deer by fecal steroid analysis. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, n. 3, p. 221-226.

Zander, J.; Von Münstermann, A. M., 1956. Progesteron in menschlichem Blut und Geweben. **Klinische Wochenschrift**, v. 34, n. 35-36, p. 944-953.

Zanetti, E. S.; Polegato, B. F.; Duarte, J. M. B., 2010. Comparison of two methods of synchronization of estrus in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Anim Reprod Sci.**, v. 117, p. 266-274.

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

Zimbelman, R. G.; Lauderdale, J. W.; Sokolowski, J. H.; Schalk, T. G., 1970. Safety and pharmacologic evaluations of melengestrol acetate in cattle and other animals: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 157, n. 11, p. 1528-1536.