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

ESTUDO COLPOCITOLÓGICO E ASPECTOS ENDÓCRINOS DE PACAS (*Agouti paca*, L.1766) ADULTAS.

Ana Carolina Gonçalves dos Reis
Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2009

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

ESTUDO COLPOCITOLÓGICO E ASPECTOS ENDÓCRINOS DE PACAS (*Agouti paca*, L.1766) ADULTAS.

Ana Carolina Gonçalves dos Reis

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Cirurgia Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO- BRASIL
Fevereiro de 2009

Reis, Ana Carolina Gonçalves dos
R375e Estudo colpocitológico e aspectos endócrinos de pacas (*Agouti Paca*, L.1766) adultas/ Ana Carolina Gonçalves dos Reis. – – Jaboticabal, 2009
xi, 75 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Márcia Rita Fernandes Machado
Banca examinadora: Paulo Henrique Franceschini, Claudio Alvarenga de Oliveira
Bibliografia

1. *Agouti paca*. 2. Colpocitologia. 3. Membrana Vaginal. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072.5:599.324

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO COLPOCITOLÓGICO E ASPECTOS ENDÓCRINOS DE PACAS (*Agouti paca*, L., 1766) ADULTAS

AUTORA: **ANA CAROLINA GONÇALVES DOS REIS**

ORIENTADORA: **Dra. MARCIA RITA FERNANDES MACHADO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIRURGIA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:

Dra. MARCIA RITA FERNANDES MACHADO

Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI

Dr. CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA

Data da realização: 26 de fevereiro de 2009.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. MARCIA RITA FERNANDES MACHADO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ana Carolina Gonçalves dos Reis– nasceu na cidade de Santos, em 12 de agosto de 1983. Em março de 2001, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal – da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, que foi concluído em janeiro de 2006. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no estágio curricular durante segundo semestre de 2005. Em Janeiro de 2007, ingressou no curso de Mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP; neste período, foi concedida cota de Bolsa de Mestrado com duração de 24 meses, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Dedico

A meus pais, David Renato Francisco dos Reis e Neusa Maria Gonçalves dos Reis, por terem me dado o privilégio da vida e por terem me ensinado que educação, bondade e honestidade sempre nos levam ao caminho certo, mesmo quando tudo parece errado. Foi me espelhando na força deles e me baseando nos ensinamentos que dedicaram a mim durante toda a vida, que sigo caminhando e nunca desisto dos meus sonhos.

Muito Obrigada

Agradecimentos Especiais

À querida mestra e amiga Professora Dr. Márcia Rita Fernandes Machado por auxiliar e acompanhar intensamente todas as etapas deste experimento, tornando possível o desenvolvimento e o término desta pesquisa. Você conduz com sabedoria, competência e dedicação a sublime missão de ensinar e orientar, transmitindo a todos que te cercam, seu grande amor pela profissão. Por tanta devoção, companheirismo e ensinamentos sou eternamente grata!

Ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira pela ajuda essencial para o desfecho desta dissertação. Agradeço não somente pelos conhecimentos compartilhados que, sem dúvida, foram indispensáveis, mas também por me fazer acreditar novamente na carreira acadêmica, demonstrando com seu desprendimento e solicitude, que em todos os caminhos podemos encontrar pessoas dispostas a nos auxiliar.

Ao Professor Dr. Paulo Henrique Franceschini que, com seu conhecimento e sensibilidade, sabe falar à alma dos seres humanos e enxergar a alma de seus alunos. Obrigada pela credibilidde, apoio e palavras de incentivo que certamente me ajudaram a persistir, mesmo diante de tantas adversidades.

Ao Professor Dr. Júlio Carlos Canola por todas as contribuições importantes na execução e correção desta dissertação. Sua disponibilidade em me ajudar na realização dos exames e suas opiniões expressas com clareza fortalecem minha admiração pelo profissional competente e professor dedicado, que desde o início de minha graduação me ensinou, orientou e conduziu.

Agradecimentos

À Deus pela proteção e por sempre me guiar pelo melhor caminho, permitindo que eu pudesse aproveitar todas as oportunidades que me foram oferecidas.

Ao meu irmão, David Renato Francisco dos Reis Jr., pelo incentivo constante ao meu crescimento profissional e pessoal.

À minha família que sempre me apoiou e sempre brigou pela minha integridade e felicidade.

Ao Dr. Pedro Eduardo de Felício e Dr. José Roberto Drugowich de Felício, tios queridos e especiais, pela atenção, orientação e apoio oferecidos na condução desta dissertação.

Ao Médico Veterinário Fernando Augusto Cardoso Lopes pela cumplicidade, companheirismo e principalmente amizade durante tantos anos. Seu apoio e estímulo foram fundamentais para a busca de novas oportunidades e realizações.

Ao Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto por sua imensa ajuda nas etapas dessa dissertação, pela paciência e compreensão durante esses dois anos de convivência.

Ao Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte pelos conselhos e conhecimentos transmitidos e pela constante disposição em me orientar, de forma a conduzir esta pesquisa de modo mais adequado. Extendo este agradecimento à todos os seus orientados, especialmente à Eveline dos Santos Zanetti e Bruna Furlan Polegato por se apresentarem sempre solícitas em todos os momentos de dúvidas e desespero.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães e à Dra. Priscila Viau Furtado pela ajuda fundamental para a finalização deste projeto.

Ao Prof. Juan Carlos Illera Del Portal, à Profa. Gema Silván Granado e todos os colaboradores do Departamento de Fisiologia Animal da Universidade Complutense de Madri, pela oportunidade de expandir meus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Antonio de Queiroz Neto, à Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, à Profa. Dr. Isabel Cristina Boleli, à Maria Isabel Mataqueiro e à Damares Perecim Roviero, por cederem os equipamentos necessários para o desenvolvimento da parte experimental desta dissertação.

À Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado pelo apoio e compreensão em todos os momentos de necessidade.

Ao amigo Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira pela colaboração no delineamento inicial desta dissertação e por todo conhecimento compartilhado ao longo de todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Fernando Ávila e à amiga Médica Veterinária Selma Helena Pineiro de Ávila (Tia Selma) pela amizade, acolhimento e pelas divertidas histórias contadas nas comemorações e churrascos.

Ao amigo e colega de trabalho Leandro Luis Martins pelo companheirismo de todas as horas e a imprescindível ajuda nestes dois anos de batalha. Você faz parte dessa pesquisa!

Aos colegas de trabalho Alessandra Scavone, Alessandra Silva, Andrea Bosso, Andrea Toniollo, Ângela, Cláudia Nagatsuyu, Denise Lachat, Flávia Borsari, Henrique Freitas, José Geraldo, Leonardo Leal, Luciana Agostinho, Monica Biagioni, Sergio Pinter e Tatiane Ishizawa pela ajuda, companhia e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Iara Maria Messiano, Marilda de Paula Ribeiro e Nilton de Araújo, pela companhia agrádavel de todos os dias e o auxílio sempre que necessário.

Aos funcionários do Setor de Animais Silvestres, Beterraba e Turquinho, pela incansável paciência e ajuda no manejo dos animais.

Ao Sr. Luiz Fernandes e Dona Irany Apparecida Mastrorocco Fernandes por todas as correções gramaticais nos trabalhos e na dissertação e por todas as conversas agradáveis e lições de vida que sempre lembrarei com muito carinho.

Às amigas e companheiras da República SóFadinhas (Patchanga, Juréia, Ruelinha, Ninfeta, Miúda, Mitrinka, Taradona, Pixirica e Ingrata) amigas de casa, baladas e estudo, e à Rampera, minha irmã, amiga e parceira de todas as horas. Meninas, não tenho palavras para expressar a importância que vocês têm em minha vida! Obrigada pelos agradáveis momentos e por toda a força que sempre me deram.

Aos eternos amigos e colegas de profissão André Marcos Santana, Maira Góes Carnielli, Marina Suzuki Cursino e Renato Pariz Maluta.

Aos vizinhos da República KarcoArco, aos companheiros da República Mata Burro/ CS e República Xic nu Úrtimu pelas horas de descontração e de boas risadas.

Aos amigos da Turma de Zootecnia de 2008, que me possibilitaram a experiência de lecionar sendo sempre muito compreensivos.

À D. Mileide ("in memorian") pela dedicação e alegria de todos os dias.

À Eronita e à Patrícia por tornarem mais amena nossa trajetória, nos ajudando a contornar com bom humor e muitas risadas, todos os momentos de tensão.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, UNESP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de mestrado e de auxílio à pesquisa.

Aos animais, fonte de estudo e inspiração para meu desenvolvimento profissional, especialmente às minhas queridas pacas pela indispensável participação para a obtenção do meu título de mestre.

SUMÁRIO

Página

RESUMO..... x

SUMMARY..... xi

I. INTRODUÇÃO..... 1

II. REVISÃO DA LITERATURA..... 3

2.1 Características Peculiares de Mamíferos..... 3

2.2 Parâmetros Reprodutivos de Mamíferos..... 6

2.2.1 Endocrinologia..... 8

2.2.1.1 Técnicas de dosagens hormonais..... 12

2.2.2 Colpocitologia..... 17

III. MATERIAL E MÉTODOS..... 21

3.1 Obtenção do Extrato Fecal..... 25

3.2 Dosagens Hormonais do Extrato Fecal..... 27

3.3 Avaliação Colpocitológica..... 30

IV. RESULTADOS..... 31

V. DISCUSSÃO..... 45

VI. CONCLUSÃO..... 48

VII. REFERÊNCIAS..... 49

APÊNDICE..... 64

ESTUDO COLPOCITOLÓGICO E ASPECTOS ENDÓCRINOS DE PACAS (*Agouti paca*, L.1766) ADULTAS.

RESUMO – Objetivou-se com este estudo determinar o perfil preliminar das progestinas, estrógenos e corticosteróides, da paca, segundo maior roedor da fauna brasileira, mediante a técnica de enzimaimunoensaio no extrato fecal de cinco fêmeas adultas, não nulíparas, diagnosticadas não prenhes por meio de exame ultrassonográfico e alojadas individualmente; também, verificaram-se os aspectos morfológicos, por meio da colpocitologia desses mesmos animais. Mediante as condições e exigências em que o experimento foi conduzido pôde-se verificar alterações na morfologia das células da mucosa vaginal, observando tipos celulares característicos das fases de proestro, estro e diestro, embora não se tenha verificado sinais de anestro. No período em que se realizaram as análises colpocitológicas não foi possível caracterizar episódio de um ciclo estral completo. Dessa forma, para a obtenção de resultados mais consistentes, outros estudos referentes a análises hormonais e colpocitologia, com delineamentos experimentais mais bem elaborados, devem ser realizados.

Palavras-Chave: *Agouti paca*, colpocitologia, histricomorfos, membrana vaginal, roedor

COLPOCYTOLOGIC STUDY AND ENDOCRINE ASPETS OF ADULT PACAS (*Agouti paca*, L.1766).

SUMMARY – The aim of this study was to determine the preliminary profile of fecal progestin, estrogen and corticosteroids of the *Agouti paca*, the second biggest Brazilian rodent, through enzymeimmuneassay in five adults female paca, diagnosed non-pregnant by ultrasonograph exam and housed individually; also verify the morphological aspects of colpocytology in this animals. Thus, in the conditions and requirements in which the experiment was conduced, morphological changes in vaginal cells could be verified, observing cellular types proper of proestrus, estrus and diestrus, thought signs of anestrous could not be verified. In the period of colpocytology analysis it was not possible to determine the occurrence of a complete estrous cycle episode. To obtain consistent results, other studies concerning the fecal hormone analysis and colpocytology should be conducted with more elaborated experimental outlines.

Keywords: *Agouti paca*, colpocytology, histricomorphs, rodent, vaginal membrane

I. INTRODUÇÃO

A espécie *Agouti paca*, popularmente chamada de paca, constitui-se no segundo maior roedor componente da fauna silvestre brasileira, cujos aspectos do ciclo reprodutivo não foram totalmente elucidados até o momento e o esclarecimento das várias peculiaridades que compõem este evento, em uma espécie, sem dúvida, contribuirá para sua preservação, pois a exploração de métodos que acessem eventos reprodutivos é essencial para o manejo de animais cativos e populações de vida livre (MORROW & MONFORT, 1998).

No caso da paca, esse conhecimento, além de auxiliar na edificação de criadouros racionais, fornecerá subsídios para seu estabelecimento como um animal de experimentação; isto se deve ao fato de que esta espécie pertence à ordem dos roedores e, como tal, juntamente com os lagomorfos representam grupos de animais experimentais “ad hoc", em virtude de apresentarem aspectos característicos tais como tamanho adequado, preço acessível e curto período de prenhez (BJÖRKMAN et al.,1989).

A paca apresenta, segundo EISENBERG (1989), a seguinte classificação na escala zoológica: Reino: animal; Filo: chordata; Classe: mammalia; Ordem: rodentia; Subordem: hystricomorpha; Família: agoutidae; Superfamília: caviidae; Gênero: agouti; Espécie: *Agouti paca* (Linnaeus, 1766), e é conhecida como paca comum; os machos adultos medem de 60 a 80 centímetros, do focinho à ponta da cauda, e as fêmeas, de 55 a 70 centímetros (MONDOLFI, 1972; BENTTI, 1981) e seu peso corpóreo varia de 5 a 10 kg, podendo chegar até aos 14 kg (MATAMOROS, 1982).

Distribuem-se geograficamente do Sudeste do México ao Sul do Brasil; vivem em áreas cobertas com vegetação alta, tais como matas e capoeirões, sempre próximo aos rios ou riachos, pois estes animais têm o costume de mergulhar, principalmente quando se sentem ameaçados. Possuem hábitos noturnos, apresentam audição e olfato bem desenvolvidos, mas não enxergam muito bem. Abrigam-se em tocas, geralmente situadas em meio a rochas ou a raízes, onde passam o dia todo, e saem

apenas à noite para se alimentarem. Ingerem vegetais diversos, mas parecem ter preferência por frutos (MONDOLFI, 1972; SILVA, 1984).

Desta forma, enfatiza-se o melhor entendimento a cerca dos níveis hormonais da paca, foco deste estudo, principalmente para que se possa compreender o ciclo reprodutivo deste roedor histricomorfo, uma vez que, entre outras peculiaridades, ao possuir hábito noturno, não permitiu até o momento que seu ciclo fosse totalmente esclarecido.

Inicialmente, julgou-se pertinente determinar os parâmetros hormonais desses roedores mediante avaliação dos metabólitos esteroidais de amostras fecais por técnica não invasiva de enzimaimunoensaio. Todavia, diante de alguns fatores limitantes na execução dessa metodologia na paca, dada a dificuldade, após várias tentativas, na colheita de fezes dos animais convivendo em grupo e ainda, da manutenção de um macho previamente vasectomizado, em um dos grupos, fatores imprescindíveis para o êxito desta proposta, achou-se por bem, uma vez que o estudo já se encontrava em andamento, efetuar análises preliminares do perfil hormonal pela técnica de enzimaimunoensaio em pacas fêmeas, complementando com o estudo colpocitológico desses animais, técnica esta, comumente utilizada como diagnóstico auxiliar na detecção das fases do ciclo estral.

Assim, objetivou-se inicialmente com este estudo determinar o perfil preliminar das progestinas, estrógenos e corticosteróides, mediante a técnica de enzimaimunoensaio no extrato fecal em pacas fêmeas adultas, não prenhes, diagnosticadas por meio de exame ultrassonográfico, alojadas individualmente, além de determinar os aspectos morfológicos celulares por meio da colpocitologia desses animais. Face ao impedimento da utilização dos resultados pertinentes às dosagens hormonais, o objetivo final do presente trabalho foi determinar as características morfológicas celulares por meio da colpocitologia e abordar alguns aspectos endócrinos de pacas adultas não prenhes.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características Peculiares de Mamíferos

Para WEIR & ROWLANDS (1973), dentre as estratégia reprodutivas dos mamíferos, a mais importante é a de produzir descendentes e assim perpetuar sua espécie. Tratando-se dos roedores, estes representam aproximadamente um terço do numero total de espécies de mamíferos, dentre os quais, 170 espécies pertencem à subordem histricomorfa, na qual se insere a paca e onde os modelos reprodutivos parecem ser mais diversificados do que em qualquer outro grupo de mamíferos.

Sendo assim, deve-se observar que a realização de métodos que acessem eventos reprodutivos é essencial para o manejo de animais cativos e populações de vida livre (MORROW & MONFORT, 1998).

Uma das características dos fenômenos da reprodução dos mamíferos é que alguns ovulam espontânea e ciclicamente, independentemente da presença do parceiro, enquanto outros apresentam ovulação reflexa, dependente do coito ou da estimulação genital. Esta ritmicidade sexual depende fundamentalmente das alterações funcionais, cíclicas, que ocorrem no sistema hipotálamo–hipofisário-gonadal. Este sistema é muito sensível às modificações ambientais: ritmo de claro e escuro, temperatura, odores provenientes do animal do sexo oposto ou qualquer tipo de estresse (ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO, 1999).

Tanto as fêmeas de mamíferos que apresentam ovulação induzida por estimulação sensorial associada à cópula, quanto as fêmeas de ovulação espontânea passam por períodos de estro comportamental, embora nos ciclos ovarianos destas últimas, a ovulação é induzida por hormônios esteroidais ovarianos em intervalos regulares (BAKKER & BAUN, 2000).

Muito se questiona sobre a rigidez que se atribui a classificação de ovulação espontânea ou induzida para uma espécie (ZARROW & CLARK , 1968; CONAWAY, 1971; JÖCHLE, 1975; MILLIGAN, 1982). Em espécies de ovulação espontânea há vários exemplos da ocorrência de coito induzido ou de coito facilitador da ovulação; os

ratos de laboratório são, provavelmente, os melhores exemplos de espécies, nas quais, ambos os mecanismos ovulatórios parecem estar integrados (BAKKER & BAUN, 2000).

A fêmea do rato precisa receber o estímulo da penetração como um comando para o ovário desenvolver o corpo lúteo completamente funcional. O estímulo da cópula libera prolactina pela pituitária anterior, o que é necessário para a atividade luteal (TERKEL, 1988). Todas essas observações sugerem que o circuito neural embasa a liberação reflexa de hormônio luteinizante (LH) e este evento está presente em algumas espécies de ovulação espontânea. Ao contrário, espécies de ovulação induzida, geralmente, não apresentam ondas de LH pré-ovulatorias promovidas por esteróides (BAKKER & BAUN, 2000).

Em muitas espécies de ovulação induzida o estímulo do trato genital feminino é feito pela penetração peniana, induzindo efetivamente a liberação pré-ovulatória de LH pela pituitária, embora haja relatos (ENDERS, 1952; ADAMS, 1981) de ocorrência da ovulação em fêmeas de mink (mustelídeos) após breve exposição ao macho, mesmo na ausência de cópula (BAKKER & BAUN, 2000).

Em espécie de ovulação induzida o estradiol é o único estímulo endócrino agindo no cérebro para promover comportamento de estro (BAKKER & BAUN, 2000).

Animais gregários, tal qual o esquilo terrícola africano (*Xerus inauris*), cujo ciclo estral é assincrônico, são capazes de reproduzir o ano todo (HERZIG-STRASCHIL, 1978; WATERMAN, 1995; BOUCHIE et al., 2006), mas mesmo em animais com estas peculiaridades, várias observações comportamentais podem indicar que possuam ovulação induzida (WATERMAN,1995; BOUCHIE et al., 2006).

Alguns roedores histricomorfos vivem isolados encontrando apenas por época do acasalamento, quando é esperada a ocorrência de ovulação induzida (CONAWAY, 1971; WEIR & ROWLANDS, 1973; FLOWERDEW, 1987; BOUCHIE et al., 2006) e embora se considere o habitat solitário para a paca, é descrito na literatura que este roedor apresenta ovulação espontânea (MATAMOROS & PASHOV, 1984; FIERRO & MORALES,1995; GUIMARÃES et al., 1999; PÉREZ & BAZ, 2006).

Nas espécies comprovadamente de ovulação induzida, que incluem coelhos, roedores, ferrets, visons, lhamas, alpacas, camelos, dromedários e gatos domésticos a

ovulação ocorre na dependência da cópula (BAKKER & BAUM, 2000). Isso acontece em virtude da estimulação de mecano-receptores (somato-sensoriais) presentes na vagina por meio do contato com centenas de espículas penianas (BANKS, 1986; CHRISTIANSEN, 1988). Os estímulos são responsáveis pela formação de impulsos nervosos que induzem o hipotálamo a secretar o GnRH, o qual atua na hipófise que, por sua vez, secreta o LH (BAKKER & BAUM, 2000). A elevação de LH inicia-se poucos minutos após a cópula, chega ao pico em 2h e retorna ao nível basal em 8h (TSUTSUI & STABENFELDT, 1993). A ovulação é desencadeada de 26 a 58 h após a cópula (WILDT et al., 1980, 1981).

Quanto a este fato, chama a atenção algumas particularidades inerentes aos órgãos copulatórios da paca, pois no macho, na região de transição entre o corpo peniano e a glande, se observa a presença de uma lâmina cartilaginosa e queratinizada de margens espiculadas; também se verifica, internamente à glande, uma estrutura sacular, onde se alojam dois esporões rígidos com extremidade livre pontiaguda (MACHADO et al., 2004). Na fêmea são observadas na região do clitoris, ventralmente à abertura uretral, a presença de duas estruturas pontiagudas, semelhantes a espinhos, que são detectadas somente quando se traciona cranialmente o prepúcio que recobre o clitoris (GERBASI et al., 2006).

Destaca-se também outra característica da genitália externa de roedores, pois segundo KLEIMAN et al. (1980) e ROWLANDS & WEIR (1984), há clara indicação de que todos os caviomorfos, exceto o *Myocastor coypus*, possuam uma membrana vaginal oclusa, a qual, para ROWLANDS & WEIR (1984) e FOWLER (2003), é formada em função da hiperplasia de células epiteliais, que se abre somente durante o estro e o parto. MATAMOROS & PASHOV (1984) consideraram a duração do ciclo estral da paca como sendo o período compreendido entre o primeiro dia de abertura da membrana vaginal e o dia anterior à abertura seguinte, estabelecendo a média de 31,16 dias de duração, com amplitude de variação entre 12 e 67 dias. Contudo, NOGUEIRA et al. (2005) salientam que se deve observar, detalhadamente, o tempo em que a membrana vaginal, característica nas fêmeas de paca, permanece aberta, para a possível associação entre a ocorrência destes eventos e o ciclo estral.

2.2 Parâmetros Reprodutivos de Mamíferos

Nas fêmeas não-primatas o ciclo sexual é chamado de ciclo estral e corresponde ao período de alterações fisiológicas e comportamentais cíclicas que consiste em períodos distintos correspondentes ao estado endócrino da fêmea, isto é, proestro, estro, metaestro, diestro e anestro também pode ser dividido em duas fases gerais: 1) fase folicular correspondente ao período de crescimento e maturação dos folículos ovarianos caracterizada por secreção estrogênica gradualmente acelerada e alteração da mucosa uterina e vaginal; 2) fase lútea, iniciada pela ovulação do folículo e sua subsequente transformação em corpo lúteo (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Cada ciclo reprodutivo animal consiste em uma fase folicular onde ocorre crescimento e maturação de um ou mais folículos ovarianos, e a fase luteal que representa a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo. Na fase folicular o hormônio mais secretado é o estrógeno e na fase luteal, é a progesterona (BRAMBELL, 1956; PERRY & ROWLANDS, 1962; PERRY, 1971).

A classificação dos tipos básicos de ciclos reprodutivos não prenhes, nas fêmeas, baseia-se em três tipos, a saber: O tipo I caracteriza-se pelo fato de que tanto a ovulação, quanto a pseudo-prenhez, são espontâneas e a cópula estéril não altera o período da fase progestacional. O tipo I apresenta os seguintes subtipos, A e B. No subtipo A o ciclo tem duração media de 2 a 5 semanas e a fase folicular é relativamente variável podendo durar, desde poucos dias, até muitas semanas, sendo a fase que caracteriza este subtipo, já que a fase luteal é relativamente constante, durando entre 12 e 16 dias; os ciclos deste tipo parecem ser regra nos ungulados, roedores histricomorfos e primatas superiores. O subtipo B é característico dos canídeos (CONAWAY, 1971).

No ciclo reprodutivo do tipo II a ovulação é induzida e ocorre pseudo-prenhez espontânea. Também apresenta subtipos, no subtipo A o estro pode ser induzido pela presença do macho ou por estimulação social; no subtipo B, o estro é mais espontâneo na sua duração e mais fixo do que o subtipo A (CONAWAY, 1971).

No ciclo reprodutivo do tipo III, tanto a ovulação, quanto o corpo lúteo, formam-se espontaneamente, mas a pseudo-prenhez é induzida mediante liberação do LH,

seguida da cópula não fértil, resultando em um ciclo semelhante aos do tipo IA e IIA. Caso não ocorra a cópula, o ciclo será curto, pois não havendo a cópula, não haverá a formação do corpo lúteo e a ovulação ocorrerá novamente, após 4 a 7 dias. Este ciclo tipo III, altamente especializado ocorre em duas famílias de roedores, a cricetidae e a muridae (CONAWAY, 1971).

A ovulação induzida parece ser uma ocorrência geral da primitiva ordem Eutheria dos insetívoros. Entre os roedores, a ovulação induzida ocorre nos primitivos sciuromorfas enquanto que entre os histricomorfos (mais evoluídos) parecem ter ovulação espontânea (CONAWAY, 1971).

O sucesso na reprodução de animais silvestres depende de fatores exógenos e endógenos (BRONSON, 1989) e para a caracterização da reprodução de cada espécie animal deve-se considerar vários parâmetros reprodutivos, dentre os quais a ocorrência de cio pós-parto, o número de filhotes por parto, a endocrinologia, a colpocitologia e épocas de parição.

O período e o estado reprodutivo de várias espécies de mamíferos podem ser alterados sazonalmente. Algumas espécies apresentam sua reprodução restrita a uma época do ano. Outras espécies podem reproduzir-se ao longo de todo o ano, apresentando picos ou não de reprodução em determinadas estações (BRONSON, 1989).

Populações do roedor *Mastomys natalensis* que vivem na África apresentam diferenças sexuais nas respostas às condições ambientais, sendo que os machos ficam mais tempo ativos durante o inverno do que as fêmeas (BRONNER et al., 1988). TOBIN et al. (1994) observaram que o rato (*Rattus rattus*), no Havaí, apresentou reprodução ao longo de todo ano, mas com maior capacidade reprodutiva durante o mês de abril.

BERGALLO (1995), ao estudar duas espécies de roedores da mata Atlântica na Estação Ecológica Juréia-Itatins em São Paulo, verificou que *Proechimys iheringi* tem pico reprodutivo durante os meses de verão, enquanto *Oryzomys intermedius* não apresenta esta tendência.

Em estudo realizado na Venezuela foi verificado que nas pacas os nascimentos ocorrem entre os meses de março a maio (MONDOFI, 1972). Na Costa Rica o maior

número de nascimentos em cativeiro, para estes animais, deu-se entre abril e maio (MATAMOROS & PASHOV, 1984).

Pacas criadas em cativeiro no Panamá apresentaram maior número de parições em duas épocas do ano, de março a maio e, posteriormente, nos meses de agosto e setembro (SMYTHE & BROWN de LA GUANTI, 1995). Na região sudeste do Brasil, NOGUEIRA et al. (2005) verificaram que os nascimentos de pacas em cativeiro foram mais abundantes nos meses de julho (inverno) e entre novembro e janeiro (verão), sendo observando nascimentos nos meses de fevereiro, março e agosto Para DUBOST et al. (2005), os nascimentos de filhotes de paca ocorrem mais de fevereiro a abril.

2.2.1 Endocrinologia

Dosagens de hormônios têm sido utilizadas para determinar ciclos reprodutivos, desenvolvimento de estratégias para inseminação artificial e monitoramento de gestação de animais silvestres, pois os hormônios ovarianos (estrógenos e progestágenos) exercem efeitos marcantes em todas as etapas do ciclo reprodutivo das espécies animais (KIRBY & RIDYWAY, 1984; HELLGREN et al., 1985; SCHROEDER & KELLER, 1989).

Sob o ponto de vista hormonal, o ciclo estral é controlado pela integração entre os seguintes hormônios: foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH), estrógeno e progesterona, que são hormônios comuns a todas as espécies, mas sua secreção e seus efeitos variam entre elas, de modo a ocasionar variações e diferenças no ciclo (McCRACKEN et al., 1999).

No ciclo estral, a primeira fase é denominada de folicular, caracterizada pelo desenvolvimento do folículo, estrutura do ovário que contém o óvulo e culmina com sua liberação. A segunda é a fase luteínica, caracterizada pelo desenvolvimento do corpo lúteo, estrutura que se forma após a ruptura do folículo e produz progesterona, que é o hormônio responsável pela manutenção da gestação. Se houver fertilização, o corpo lúteo será mantido caso contrário regridirá e terá início uma nova fase folicular (McCRACKEN et al., 1999).

Os hormônios esteróides ovarianos, estrógenos e progestágenos, são sintetizados pelos folículos ovarianos por meio de ações combinadas das células da granulosa e tecais. Durante o decorrer do ciclo estral, esses hormônios são responsáveis pelas alterações que ocorrem no endométrio, na cérvix e na vagina e, também, pela regulação por "feedback" da secreção de FSH e LH, pela hipófise anterior (COSTANZO, 1999). A variabilidade da duração do ciclo estral está intimamente relacionada com a duração da fase luteínica (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A fase folicular ou proliferativa é dominada pelo estrógeno (principalmente 17β-estradiol), cujos níveis aumentam gradativamente no início da fase, subindo depois rapidamente até atingir o pico máximo, antes do pico pré-ovulatório do LH (ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO, 1999). Nos ovários o período de estro é caracterizado por elevada secreção de estrógenos dos folículos pré-ovulatórios (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Os altos níveis de estradiol promovem a proliferação do revestimento endometrial uterino e inibem a secreção de LH pela hipófise anterior, por meio de "feedback" negativo (COSTANZO, 1999).

No final da fase folicular ocorre a ovulação, que consiste no rompimento do folículo maduro e liberação do óvulo, que será captado pelas fímbrias, podendo ou não ser fecundado. O restante do folículo torna-se hemorrágico, formando o corpo lúteo, que pode ser funcionante ou não, segundo a espécie considerada (ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO, 1999). Os níveis de estradiol diminuem imediatamente após a ovulação, mas vai aumentar de novo, durante a fase lútea (COSTANZO, 1999).

Na fase lútea ou secretória, o corpo lúteo se desenvolve e começa a sintetizar estradiol e progesterona. Os altos níveis de progesterona, durante esta fase, estimulam a atividade secretora do endométrio e aumentam sua vascularização (COSTANZO, 1999). O corpo lúteo é formado por dois tipos celulares esteroidogênicos distintos e ambos contribuem significativamente para a quantidade de progesterona total secretada durante a fase luteínica do ciclo estral. As células luteínicas pequenas secretam pouca progesterona estimuladas pelo LH, enquanto as células luteínicas grandes secretam progesterona espontaneamente em alta proporção (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Tardiamente na fase lútea, se não ocorre fertilização o corpo lúteo regride. Com essa

regressão a fonte lútea de estradiol e progesterona é perdida e os níveis sanguíneos desses hormônios caem abruptamente (COSTANZO, 1999). A prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) é o hormônio luteolítico em várias espécies de mamíferos. A $PGF_2\alpha$ uterina controla a vida útil do corpo lúteo, que, em contrapartida, regula a extensão do ciclo. Ocorrendo gestação, a influência luteolítica uterina é anulada, pois a progesterona secretada pelo corpo lúteo é necessária para a manutenção da gestação (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A duração do ciclo estral corresponde ao intervalo de dias entre a ocorrência de dois picos de metabólitos de estradiol; quando este intervalo ultrapassa 60 dias, ou seja, duas vezes o período de duração do ciclo estral da paca conforme relatado na literatura (MATAMOROS & PASHOV, 1984; NOGUEIRA, 2005; PEREZ & BAZ, 2006; GUIMARÃES et al., 2008), considera-se como período de anestro (BROWN et al., 1996; MOREIRA et al., 2001). Pode-se considerar a duração do estro como o número de dias em que os valores dos metabólitos de estradiol se mantiveram com concentrações acima do valor basal (elevações) associados a presença de pico desse hormônio (MOREIRA et al., 2001).

Os principais hormônios reprodutivos incluem os derivados do hipotálamo, lobos posterior e anterior da hipófise, gônadas (testículos e ovários), útero e placenta, sendo os hormônios gonadais classificados como esteroidais, cujo precursor é a pregnenolona, um esteróide com 21 carbonos derivado do colesterol, encontrada nos tecidos produtores desse tipo de hormônio, pois pode ser convertida em progesterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), cortisol e aldosterona dependendo das necessidades dos tecidos (DEVLIN, 2005).

Um dos fatores que pode modificar o controle de glicocorticóides por “feedback” negativo é o estresse, que pode resultar de impulsos físicos ou psicológicos que são prejudiciais ao indivíduo. A resposta dos glicocorticóides ao estresse é imediata, pois aumentam as concentrações de cortisol rapidamente para atingir valores que são várias vezes maiores do que o normal dentro de poucos minutos. A resposta de glicocorticóides é proporcional à gravidade do estresse, isto é, níveis menores de

estresse resultam em menos produção de cortisol quando comparados com elevados níveis de estresse (GRECO & STABENFELDT, 1999).

As respostas ao estresse, classicamente conhecidas, incluem a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que provoca a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a subsequente liberação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (RAZDAN et al., 2002).

Os hormônios liberados em resposta ao estresse alteram as funções reprodutivas por meio do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, inibem a secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e, consequentemente, interferem na liberação de FSH e de LH, de modo a alterar o efeito estimulante das gonadotrofinas na secreção de esteróides sexuais. É bem conhecido o efeito negativo do estresse sobre o desempenho reprodutivo, mas os exatos mecanismos que controlam este efeito não estão bem esclarecidos (RAZDAN et al., 2002).

Elevada concentração plasmática de cortisol algumas horas ou dias próximos à ovulação causa mudanças que reduzem os níveis de LH e consequentemente, inadequada luteinização dos folículos maduros. Neste caso os folículos císticos são formados e a fêmea pode permanecer em constante estro ou anestro. Este exemplo extremo serve para ilustrar como o estresse pode alterar os eventos hormonais e modificar a habilidade dos animais de apresentar ciclo estral normal (VARLEY, 1991).

A proporção e a composição do glicocorticóide circulante no sangue varia entre as espécies. Por exemplo, corticosterona é o principal glicocorticóide presente em aves e pequenos mamíferos, ao passo que o cortisol é o glicocorticóide predominante nos mamíferos de médio a grande porte, peixes e seres humanos (HADLEY, 1996; MILLSPAUGH & WASHBURN, 2004). No entanto há algumas exceções importantes sobre este fato em alguns grupos de animais que podem influenciar a seleção e realização do enzimaimunoensaio, como é o caso da cobaia que excreta o cortisol (MILLSPAUGH & WASHBURN, 2004).

No ciclo estral de fêmeas com ovulação espontânea, o estro coincide com o inicio da ovulação; já, nas fêmeas com ovulação induzida, elas são receptivas ao

macho em qualquer momento, e a ovulação ocorre a intervalos variáveis após o coito (SILVA, 2007).

Os roedores de laboratório requerem estimulação coital para produzirem um corpo lúteo funcional durante a gestação. Tal estímulo ocorre no acasalamento, com machos férteis ou inférteis, sendo que na segunda condição haverá o desenvolvimento de uma pseudogestação. Considera-se a reprodução destes roedores como altamente eficiente, pois, desde que não haja um desenvolvimento espontâneo da fase luteal admite-se a possibilidade das fêmeas ovularem em intervalos muito curtos (McCRACKEN et al., 1999).

2.2.1.2 Técnicas de dosagens hormonais

Para uma investigação bem sucedida do perfil dos hormônios reprodutivos há a necessidade da realização da análise de amostras sanguíneas colhidas frequentemente. No entanto, na maioria das espécies não domesticadas, estas colheitas de sangue repetidas várias vezes não são possíveis e, portanto, a avaliação desses metabólitos esteroidais por técnicas não invasivas, feitas em amostras fecais e urinárias, é muito utilizada (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

Deve-se considerar que amostras de sangue podem não ser apropriadas para a monitoração da atividade adrenocortical, pois essas representam concentrações hormonais de um momento pontual. Também o manejo, a contenção fisica e o procedimento para a colheita de sangue podem afetar expressivamente as concentrações de corticosteróide (BAUER et al., 2008). Neste sentido, verificou-se que as concentrações plasmáticas de cortisol na cobaia aumentaram significativamente em 5 minutos após a manipulação do animal (SACHER, 1994).

Também há de se ponderar que a contenção do animal, repetidas vezes para a realização de colheitas sequênciais de sangue, causa ativação da adrenocortical com liberação de cortisol (STEPHENS, 1980). O cortisol atua de modo a mobilizar as reservas de energia e adequa-las à necessidade fisiológica que aumenta durante o estresse e pode afetar os níveis plasmáticos de outros hormônios, o que compromete a

veracidade da informação endócrina obtida (LASLEY et al., 1989; KORNDÔRFER, 1996; MORROW & MONFORT, 1998; HAMASAKI et al., 2001).

Como métodos não invasivos, amostras de fezes e urina podem ser colhidas para acessar o estado reprodutivo em animais selvagens e exóticos em cativeiro, embora a dificuldade na colheita de urina limita seu uso para a investigação em animais de vida livre. Por esta razão, a avaliação da amostra fecal é a escolha mais praticável para este propósito (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

Os métodos não invasivos de dosagens de metabólitos fecais para verificar o estado endócrino de um animal iniciaram-se em 1970 com análise em aves (CZEKALA & LASLEY, 1977; PALME, 2005) e em 1980 com a abordagem de mamíferos (MÖSTL et al., 1983; MÖSTL et al., 1984; PALME, 2005; BROWN, 2006).

A análise hormonal em amostra fecal é uma técnica completamente não invasiva e já foi usada e validada com sucesso para monitorar atividade gonadal e adrenocortical em inúmeras espécies de animais de laboratório, domésticos, de zoológicos e selvagens (HUBER et al., 2003; TOUMA & PALME, 2005; SCHWARZENBERGER, 2007; PEREIRA et al., 2006; BAUER et al., 2008).

A colheita de fezes é fácil e pode ser feita sem a manipulação do animal. Dessa forma, amostragens repetidas são possíveis mesmo em fêmeas prenhes ou animais jovens sem interferir em seu estado endócrino. Além disso, pequenas quantidades de amostras são suficientes para vários ensaios hormonais diferentes. Outra vantagem é que enzimaimunoensaios (EIEs) sensíveis podem mensurar os metabólitos hormonais nas fezes mesmo se apenas pequena porcentagem for excretada (PALME et al., 1996, BAUER et al., 2008)

A rota de excreção dos esteróides varia entre as espécies, assim como os próprios esteróides dentro da mesma espécie (SCHWARZENBERGER et al., 1996; CHELINI et al., 2005). Em razão dos complicados eventos que são consequências da ação enterohepática, é difícil atribuir definitivamente a origem de qualquer esteróide intestinal (SHILLE et al., 1990). Para SCHWARZENBERGER et al. (1996) o atraso observado na excreção fecal dos hormônios esteróides é maior nos animais que apresentam ceco funcional.

Estudos de radioinfusão têm contribuído para o entendimento da circulação entero-hepática dos hormônios esteróides e indicam que a excreção no intestino é por meio da bile, embora se verifique que pequena proporção da circulação dos esteróides é secretada através da mucosa do intestino grosso (SHILLE et al., 1990).

Os metabólitos de hormônios esteróides são excretados nas fezes no intervalo entre 0,3 e 3 dias, após sua secreção, de modo a refletir diretamente a duração do trânsito gastrintestinal (PEREZ et al., 1988; ZIEGLER et al., 1989; HEISTERMANN et al., 1993; SHIDELER et al., 1993; WASSER et al., 1994).

BUSSO et al. (2007) relatam que na chinchila após o tratamento com ^{3}H-estradiol e ^{14}C-progesterona, o estradiol é rapidamente metabolizado e predominantemente excretado na urina, enquanto a progesterona, cuja metabolização origina vários produtos sendo os principais a pregnanediona, pregnenolona e pregnanediol, apresenta pico de excreção com atraso de 36h e é encontrado em quantidades iguais, tanto na urina quanto nas fezes. Este padrão de excreção também é relatado para outros roedores, como é o caso do hamster, cobaia e rato (TAYLOR, 1971; BUSSO et al., 2007).

Diferente de humanos, que excretam metabólitos de corticosteróide primariamente através dos rins, no camundongo e no rato esteróides passam rapidamente pelo fígado e pelo intestino e são excretados através do trato gastrointestinal (DIRSCHERL & MOSEBACH, 1961; LOWY et al., 1969; HAN et al., 1983).

Como metodologias analíticas para medir a concentração de substâncias como os hormônios esteróides, não mensuráveis por métodos bioquímicos convencionais, foram estabelecidos o método de radioimunoensaio em 1960 por Solomon Berson e Rosalyn Yalow, em Nova York, e o método de análise de saturação, por Roger Ekins, em Londres, ambos baseados no uso de um agente ligante específico e de hormônios radioativos como traçadores, métodos de princípios do radioimunoensaio (RIE) (THORELL & LARSON, 1978).

O RIE utiliza material radioativo o que requer licença especial da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), para sua execução, pois gera resíduos

radioativos que necessitam de cuidados especiais; também apresenta custo elevado quando comparado a outras metodologias imunométricas

Como alternativa a esse método radioativo, foi desenvolvido para a quantificação hormonal em soro humano o enzimaimunoensaio (EIE), no qual as enzimas são os marcadores mais utilizados na atualidade, com as vantagens de não apresentarem riscos associados à exposição de radioisótopos, bem como a possibilidade da amplificação catalítica e da associação com outros marcadores, como por exemplo, os quimioluminescentes e fluorescentes, resultando em ensaios de baixo limite de detecção (TSUJI et al, 1989; JOHANNSSON, 1991).

O exemplo significativo de enzimaimunoensaio heterogêneo é o método que emprega anticorpos imobilizados em placa de poliestireno com número variável de poços de ensaio. Em protocolo clássico o método é realizado nas seguintes etapas: 1-ativação da placa, 2-lavagem, 3-imobilização dos anticorpos, 4-lavagem, 5-incubação, 6-lavagem, 7-adição de substrato cromogênico e 8-leitura óptica dos poços. Este sistema de placas possibilita a realização do ensaio de maneira que garanta a uniformidade de todas as etapas tanto para amostras e referências, condição essencial para confiabilidade dos dados. Outro ponto muito importante é que devido à alta sensibilidade do método, ele é feito em micro escala o que o torna bastante econômico dada à reduzida quantidade de reagentes utilizados, além da rapidez do método. (JOHANNSSON, 1991; ZIEGLER & WITTWER, 2005).

A maioria dos EIE utiliza anticorpos específicos para hormônios esteróides não metabolizados ou conjugados de esteróides metabolizados, o que os torna mais aplicáveis para a mensuração de hormônios esteróides circulantes no sangue ou metabólitos conjugados na urina, respectivamente. Entretanto, fezes são mais fáceis de colher do que soro ou urina, sendo a análise de esteróides fecais o método preferencial para o monitoramento não invasivo da função ovariana em animais selvagens de cativeiro ou de vida livre (LASLEY & KIRKPATRICK, 1991; MUNRO et al., 1991; CZEKALA et al., 1994).

Esses ensaios enzimáticos têm sido usados com sucesso para quantificação de metabólitos de progesterona em fezes de animais de produção como vacas de corte,

com o objetivo de facilitar o manejo e permitir o monitoramento do ciclo ovariano. ISOBE et al. (2005) concluiram que o EIE é um ótimo método para a mensuração de progesterona fecal em gado de corte. Este tipo de ensaio permite resultado rápido, sensível a concentrações de progesterona plasmática inferiores a 1,0ng/mL, é relativamente mais barato e pode ser realizado com maior facilidade, até mesmo em trabalhos a campo (SINGER et al., 2004).

Especificamente às pesquisas concernentes a análises de metabólitos hormonais, em roedores, foi verificado em porco espinho, mediante dosagem plasmática de estradiol e progesterona, que as características hormonais do ciclo estral de fêmeas, tanto alojadas com machos vasectomizado, quanto com machos não vasectomizados, eram semelhantes, embora o autor tenha verificado perfis inconsistentes quanto as relações entre estrógeno e progesterona, em quatro dos doze ciclos analisados, alegando ser este fato, proveniente de ciclos anovulatórios, regressão luteal precoce ou falhas nos mecanismos hormonais responsáveis pela formação do corpo lúteo (van AARDE, 1985).

Também em ratos de laboratório observou-se que a concentração plasmática de estradiol aumenta a partir do proestro, atingindo o pico no início do estro. Já, a progesterona, apresenta dois picos: um produzido pela adrenal no final do proestro e início do estro, e outro produzido pelo corpo lúteo durante o metaestro. Este é dependente da produção de prolactina pela hipófise (ECKERT et al., 1988; BRONSON, 1989).

As concentrações de estrógenos, tanto no plasma quanto nas fezes de cobaia, apresentam dois picos distintos e refletem a fase folicular bifásica do ciclo estral (BLAND, 1980; HUTZ et al., 1990; BAUER et al., 2008). BAUER et al. (2008) observaram o primeiro pico cinco dias antes do estro, que indica o desenvolvimento da primeira onda folicular, e o segundo pico próximo ao estro, que procede a ovulação do segundo grupo de folículos.

As poucas pesquisas referentes à determinação do ciclo estral da paca, baseiam-se na colpocitologia vaginal, somente PEREZ & BAZ (2006) se embasaram na análise hormonal do plasma destas fêmeas e verificaram que os níveis de esteróides na

fase folicular foram de 1,6±0,65 ng/ml e 39±24 pg/ml, para progesterona (P4) e estradiol (E2), respectivamente; para a fase luteal foram de 6,2±3,7 ng/ml para P4, e de 29±16 pg/ml, para E2.

Em roedores que não ovulam não há a formação de corpo lúteo, mas o folículo terciário desenvolvido pode se tornar um folículo luteinizado não rompido e produzir pequena quantidade de progesterona durante o ciclo ovariano, mesmo sem a ocorrência da ovulação. Estes folículos podem ainda atuar como um corpo lúteo acessório, cuja função seria de manter níveis adequados de progesterona durante o período de gestação. Esta ocorrência foi observada em algumas espécies de roedores histricomorfos (WEIR & ROWLANDS, 1974) e em outras espécies com ovulação induzida (BOUCHIE et al., 2006).

2.2.2 Colpocitologia

As fases do ciclo estral, nos mamíferos em geral, podem ser determinadas com base na resposta do epitélio vaginal ao estímulo hormonal, especialmente estrogênios e progesterona. Tal observação é considerada um meio indireto de avaliação da função ovariana e do estado hormonal do indivíduo (FARIA, 2000; LUSTOSA *et al*, 2002), pois o estudo da citologia vaginal possibilita a observação da variação dos tipos celulares vaginais, coincidentes com a fase hormonal correspondente, sofrendo modificações ao longo do ciclo estral, sob a influência dos hormônios esteróides E2 e P4 (SCHUTTE, 1967).

Sob a ação dos estrógenos o epitélio vaginal torna-se espesso e no esfregaço predominam células superficiais, queratinizadas, que apresentam núcleo picnótico e citoplasma acidófilo, caracterizando período de estro (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A fase inicial do proestro é caracterizada pela presença de células parabasais, intermediárias, superficiais e leucócitos. Após a metade deste período, as células parabasais, as intermediárias pequenas e os leucócitos estão ausentes, aumentando assim, o numero de células intermediárias grandes e superficiais (ROSZEL, 1975).

No estro, as células superficiais perfazem mais que 80% do total de células do esfregaço vaginal, podendo chegar a 100% (FELDMAN & NELSON, 1987).

O início do metaestro pode ser determinado pela súbita aparição de neutrófilos, células parabasais e intermediárias no esfregaço vaginal. No anestro são encontradas poucas células intermediárias e parabasais, com moderado número de leucócitos presentes ou ausentes (POST, 1985).

O ciclo estral da rata é composto por quatro fases que além de expressarem mudanças na mucosa vaginal com prsença de células nucleadas, leucócitos e celulas cornificadas em cada período (MATTHEWS & KENYON, 1984), exibem variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais e consequentemente de gonadotrofinas. Também, associada a essas mudanças cíclicas é posivel observar alterações comportamentais. Por exemplo , a noite do proestro é o periodo no qual a fêmea apresenta o “desejo sexual”, isto é, ela está pronta para o coito, o proestro dura de 12 a 14 horas e precede o estro. O estro dura de 25 a 27 horas e é durante este período, mais precisamente durante a madrugada do estro que ocorre a ovulação. Se não há concepção, após o estro existe um periodo de recuperação, denominado metaestro ou diestro I, cuja duração é de 6 a 8 horas, seguido pelo diestro II que dura d 55 a 57 horas, onde se reinicia a secreção de hôrmonios ovarianos para o proximo ciclo (FREEMAN, 1994).

Na rata o esfregaço da parede vaginal revela padrão mutável de células e muco. No começo do estro, o esfregaço é composto quase exclusivamente de células epiteliais cornificadas. No fim do estro, aparece muito muco enquanto as células cornificadas ainda são bastante conspícuas. Doze horas mais tarde no metaestro, o esfregaço apresenta células cornificadas, muitos leucócitos e quase nenhum muco. Na rata, o ciclo se sucede rapidamente: os corpo amarelos não são secretores e o metaestro é curto, a não ser que se instale um processo de gravidez ou pseudogravidez. Em animais cujos corpos amarelos são secretores, o metaestro é prolongado. O diestro é associado a um esfregaço vaginal que contém quase apenas leucócitos e ocasionalmente células ovais com grandes núcleos, células epiteliais nucleadas. Um dia depois o esfregaço se caracteriza por células epiteliais nucleadas

apenas; o animal está então no proestro. Diestro, proestro e estro ocorrem na fase folícular da função ovariana, enquanto que o metaestro ocorre na fase lútea (MARCONDES et al., 2002)

Para a cutia (*Dasyprocta prymnolopha*), GUIMARÃES et al. (1997) verificaram reprodução do tipo poliestral contínua. A duração média dos ciclos estrais de 30,69 ± 4,65 dias e periodo médio de gestação de 104,33 ± 0,57 dias. Com relação ao estudo da citologia esfoliativa, notou-se que no proestro houve frequência maior de células superficiais anucleadas, intermediárias e parabasais; no estro observou-se em número elevado, as células superficiais (anucleadas e nucleadas) e ausência de leucócitos; na fase de metaestro houve aumento de células intermediariás e leucócitos; no diestro, as células parabasais foram observadas em número maior de vezes.

Na análise do ciclo estral da paca por meio da citologia esfoliativa, foi observada a presença de todas as células do epitélio vaginal (superficial, intermediária, parabasal e basal), cuja frequência dos tipos celulares variava de acordo com as fases do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro) (NOGUEIRA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008).

Na paca, a duração média do proestro foi de 10,3 ± 4,21 dias (7-12 dias), e nesta fase ocorreu aumento progressivo de célula superficial (nucleada), concomitantemente com a diminuição na frequência dos outros tipos celulares (NOGUEIRA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008), além da presença de grande quantidade de leucócitos, que diminuíram, gradativamente, até o final da fase (MATAMOROS & PASHOV, 1984; GUIMARÃES et al., 2008).

A duração média do estro nestes roedores foi de foi de 1,05 ± 0,22 dias. As células superficiais anucleadas representaram quase a totalidade celular observada e não foi verificada a presença de leucócitos (MATAMOROS & PASHOV, 1984; NOGUEIRA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008). Nesta fase o muco estava mais abundante e com aspecto fluido, entretanto não foi observada a sua presença durante a análise microscópica do material, após o processo de coloração. Clinicamente, a vulva apresentava-se edemaciada e com mucosa hiperêmica (GUIMARÃES et al., 2008).

O metaestro, na paca, apresentou duração média de 5,6 ± 3,87 dias (4-9 dias); nesta fase observou-se a prevalência das células intermediárias com aumento na taxa leucocitária (MATAMOROS & PASHOV, 1984; NOGUEIRA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008). Foram verificadas também as células de Foam (com a presença de vacúolos no citoplasma) e as células do metaestro (com leucócito em seu citoplasma); também nesta fase, a quantidade do muco diminuiu tornou-se mais viscoso e a vulva apresentava-se rosada e com aspecto normal (GUIMARÃES et al., 2008).

A média de duração do diestro na paca foi de 14,7 ± 4,57 dias (7-20 dias). As células parabasais e basais ocorreram em número elevado em relação às outras fases, com reduzida presença de leucócitos. Nesta fase, foi possível observar as células intermediárias frequentes e células em processo degenerativo (NOGUEIRA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008).

NOGUEIRA et al. (2005), ao analisarem as mudanças colpocitológicas durante o ciclo estral da paca, registraram, em média, período de 33,4 dias; também relataram para esta espécie reprodução do tipo poliestral, com estimativa de produção de duas parições anuais por fêmea e apenas um produto por cria, mas salientaram que ainda existem algumas divergências quanto à definição de cada fase deste ciclo estral, enfatizando a necessidade de observações mais detalhadas quanto às mudanças que ocorrem neste evento, sugerindo que se determine, com maior precisão, a duração de suas diferentes fases.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Para o estabelecimento dos grupos experimentais propostos no projeto inicial, realizaram-se três exames ultrassonográficos em 18 pacas fêmeas adultas não nulíparas, do plantel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, UNESP, com intervalos de quinze a vinte dias entre eles. Assim, até maio de 2007, doze pacas fêmeas, adultas, não prenhes, foram separadas[1].

Para a realização do exame de ultrassom, a captura dos animais foi feita mediante utilização de puçá apropriado (constituído de corda de polipropileno); após a apreensão, o animal foi conduzido, no próprio puçá, para uma sala próxima às baias, onde a paca foi colocada em uma gaiola de barras de ferro com prensagem lateral, adequada para a contenção de pequenos felinos. O animal era mantido em posição quadrupedal, sendo realizada a ultrassonografia percutânea mediante utilização de transdutor eletrônico setorial bi-frequencial de 5,0 e 7,5 MHz, em modo B (Figura 1).

Não houve a necessidade da realização de procedimento de tranquilização por medicamentos nos animais, pois estes apresentavam-se calmos, e os exames foram realizados por meio de contenção física.

[1] Processo nº 008580-07 da Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV/ UNESP- Jaboticabal

Figura 1. Fotografias do procedimento da apreensão, contenção e realização de exame ultra-sonográfico das pacas fêmeas adultas. A) animal contido em puçá; B) paca em gaiola de ferro apropriada, com prensa lateral (seta); C) procedimento de ultra-sonagrafia; D) detalhe do transdutor (seta), utilizado no exame ultra-sonagráfico, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Considerando-se que no início do projeto foi proposto a colheita de fezes dos seguintes grupos de animais: G1 - quatro fêmeas não-prenhes que permaneceriam juntas em uma baia; G2 - quatro fêmeas mantidas alojadas com um macho vasectomizado; G3 - quatro fêmeas mantidas com um macho não-vasectomizado, na mesma baia, realizou-se, além da seleção das fêmeas por meio de exames ultrassonográficos, a vasectomia em dois machos (um deles para ser utilizado se necessário), viabilizando-se todos os grupos até maio de 2007.

Para a colheita das fezes, considerando-se o habitat solitário dessa espécie (FOWLER, 2003), achou-se por bem colocar os animais de G1 (constituído apenas por fêmeas), em baias individuais e dessa forma G1 passou a ser composto por quatro pacas isoladas (Figura 2).

Figura 2. Registro fotográfico das baias individuais das pacas do G1, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Nessas condições a colheita das fezes foi realizada no próprio recinto de cada animal, diariamente, entre 7 e 9 horas, período em que as fezes se encontravam mais frescas (Figura 3).

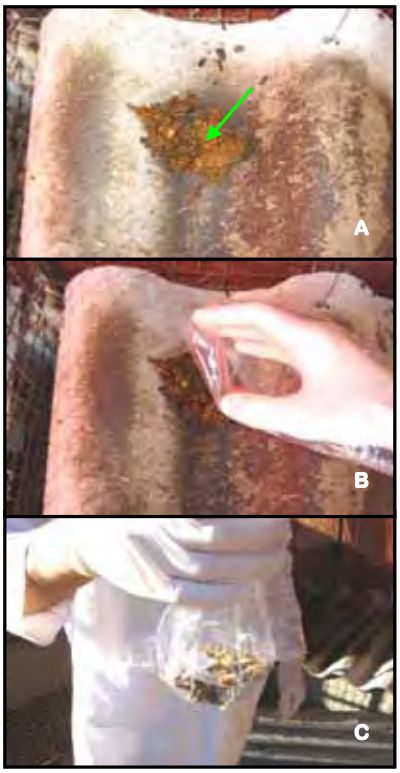

Figura 3. Fotografias da colheita das fezes no recinto das pacas do G1. A) fezes no recinto da paca (seta); B) colheita das fezes; C) armazenamento das fezes em saco plástico, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Quanto aos outros grupos, a colheita se iniciou diretamente do reto dos animais, conforme a proposta inicial. Entretanto, já no início da colheita, constatou-se a impossibilidade da realização deste procedimento, pois nem sempre havia fezes na ampola retal e ainda, tal processo causava estresse nas pacas, tanto em decorrência da contenção, quanto no desconforto que promovia nos animais, na tentativa de retirada de fezes.

Procurando solucionar este problema, quatro pequenas baias foram construídas dentro das baias maiores (Figura 4), a fim de fazer com que os animais defecassem separadamente, cada um em sua respectiva baia. Desta forma, as fêmeas eram colocadas nas baias durante o dia (das 9:00h até as 17:00h) e eram soltas para que tivessem seu comportamento natural durante a noite, visto que são animais de hábitos noturnos e acasalam durante este período. Porém, por este mesmo motivo, os animais não defecaram durante o dia, não se obtendo sucesso desta forma.

Figura 4. Registro fotográfico das baias auxiliares (seta) construídas dentro da baia onde as fêmeas foram agrupadas, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Vários tipos de manejo diferentes foram feitos no intuito de que os animais defecassem durante o dia. A alimentação foi fornecida pela manhã para que os animais fossem presos após se alimentarem, mas também somente algumas fêmeas saiam para se alimentar e mesmo assim não defecavam. Então resolveu-se colocar a alimentação dentro da baia individual, mas os animais também não defecaram.

Após tantas tentativas, mais uma opção foi avaliada e colocada em prática: corantes alimentícios de diferentes tonalidades (azul, vermelho, laranja, verde, rosa), diferentes texturas (líquido e em pó) e em diferentes quantidades foram incorporados aos alimentos oferecidos diariamente aos animais, na esperança de que defecassem em cores distintas e assim pudéssemos identificar as fezes de cada um. Embora vários testes tenham sido realizados, as fezes não apresentaram colorações diferentes, também se cogitou em fornecer tipos diferentes de frutas e legumes, mas não encontramos quatro alimentos que pudessem resultar em cores ou aspectos diferentes para a identificação das fezes.

Desta forma, não foi possível fazer a colheita das pacas dos grupos G2 e G3. Assim, decidiu-se por organizar outro delineamento, formando-se apenas um grupo, o G1 com cinco animais, pois só havia cinco baias individuais disponíveis e realizar, tanto a colheita das fezes, quanto, após o término desse procedimento, a colpocitologia, por 30 dias, a fim de obter outros parâmetros reprodutivos. A colpocitologia não foi realizada concomitantemente com a colheita das fezes para não causar estresse nos animais e assim não comprometer as análises hormonais fecais.

As fezes colhidas eram levadas até o Laboratório de Anatomia no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV, onde foram armazenadas em freezer a temperatura de -20ºC e posteriormente processadas para a obtenção do extrato fecal.

3.1 Obtenção do Extrato Fecal

As fezes retiradas do freezer -20ºC e após ficarem 24 horas na estufa, a uma temperatura de aproximadamente 95°C, foram moídas até ficarem em pó, e posteriormente acondicionadas em tubos plásticos com tampa e congelados,

novamente, a -20 ºC. Estas fezes em pó foram usadas no processo de extração hormonal.

Para a extração dos hormônios esteroidais das fezes, se usou 0,1g de fezes moídas, mensuradas em balança de precisão. A cada amostra, colocada em tubo de ensaio de vidro (de 8,5 cm de comprimento e capacidade total de 15 mL), foram adicionados 5 mL de álcool etílico 90%. Esses tubos foram tampados, agitados em vórtex (agitador de tubos – PHOENIX) durante 10 segundos e colocados em um homogeneizador de sangue (AP22 – PHOENIX) durante 30 minutos.

Após agitação, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga ALC, PK121R a 811,67 g durante 20 minutos).

O sobrenadante de cada tubo foi colocado em outro tubo maior, com 20 cm de altura e com capacidade para 80 mL, com a mesma identificação. Ao primeiro conjunto de tubos foi adicionado, novamente, 5 mL de álcool etílico 90%, agitado por 30 segundos no vórtex e colocado novamente na centrifuga com a mesma velocidade durante 20 minutos. O sobrenadante desta segunda etapa foi novamente colocado nos tubos maiores correspondentes, completando então 10 mL de solução por tubo. Cada tubo, contendo 10 mL de extrato, foi colocado em banho-maria, a uma temperatura de aproximadamente 90 ºC, até secar todo o conteúdo líquido.

Após seco, foram adicionados 5 mL de álcool absoluto a cada tubo e deixado durante 8 minutos em um banho de ultrassom para que despregasse todo o conteúdo ressecado da parede do tubo. Os tubos eram agitados em vórtex durante 20 segundos e colocados novamente em banho-maria para secarem. Depois de seco foi adicionado 1 (um) mL de metanol a cada tubo, colocado por mais 8 minutos no banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner – 740D) e agitados por 20 segundos no vórtex, obtendo-se o extrato final da fezes.

O extrato obtido foi colocado em “eppendorfs” devidamente identificados e armazenados em freezer – 20ºC, para a posterior realização das dosagens, que foram feitas no Laboratório de Endocrinologia, de responsabilidade do Prof. Dr. Juan Carlos Illera del Portal, no “Departamento de Fisiología (Fisiología Animal)” da “Universidad Complutense de Madrid”.

3.2 Dosagens Hormonais do Extrato Fecal

Para a determinação dos hormônios mediante utilização da técnica de EIE (Enzimaimunoensaio) de competição foram feitos, inicialmente, "pools" dos extratos fecais e, a partir destes, análises com diferentes quantidades (200µl, 100µl, 50µl e 25µl) de extrato para a determinação da quantidade de extrato a ser utilizada na realização do EIE para cada hormônio. Após análise destes resultados determinou-se o padrão conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Quantidades de extrato fecal utilizadas para a realização de enzimaimunoensaio dos respectivos hormônios e sua diluição em solução tampão (EIA *buffer*), Madri – 2009.

Hormônio	Quantidade extrato	EIA buffer
Cortisol	12,5 µl	150 µl
Corticosterona	10 µl	150 µl
Estrona (E_1)	100 µl	150 µl
Estradiol (E_2)	12,5 µl	150 µl
Progesterona (P_4)	12,5 µl	150 µl
Glucuronato de pregnanediol (PdG)	10 µl	300 µl

Para a técnica de EIE se utilizou microplacas de poliestireno com 96 cavidades de base reta e de baixa absorção, recobertas com fitas adesivas de acetato.

O desenvolvimento da técnica compreendeu as seguintes etapas: o enzimaimunoensaio foi realizado com base no protocolo descrito por ILLERA et al. (2003). A técnica consiste na marcação de placas (NUNC® Maxisorb) de 96 poços com 100µl de uma solução de anticorpo purificado, diluído conforme a Tabela 2, em solução de coating (coating buffer; Na_2CO_3, $NaHCO_3$, H_2O, pH9,6), exceto o primeiro poço que foi utilizado como branco (B). As placas foram cobertas com selador plástico (SARSTEDT) e incubadas a 4ºC por 16 horas. Os anticorpos não aderidos a placa foram removidos através de três lavagens em lavadora automática (Modelo: Fluido 96-2, Asys Hitech- Anthos®) com solução de lavagem (NaCl 1,5M, 0,05% Tween 20). A placa foi coberta com os padrões e amostra (Figura 5). As soluções padrões foram mantidas dissolvidas em etanol a -20ºC. Foram utilizados os padrões nas diluições: 0,1;1;10;100;1000 e 10000 pg/poço. O etanol foi evaporado em fluxo de ar comprimido

e os padrões ressuspendidos em uma solução de conjugado (concentrações conforme Tabela 2) com solução de ensaio (EIA Buffer, Na_2HPO_4 0,1M; NaH_2PO_4 0,1M; NaCl 0,15M cm 0,1% BSA, pH7,0).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	10	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
B	B_O	100	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
C	B_O	100	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
D	0,1	1000	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
E	0,1	1000	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
F	1	10.000	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
G	1	10.000	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
H	10	B_{OE}	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40

Figura 5. Representação esquemática da microplaca, utilizada no auxílio da análise hormonal, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

B = Branco
B_O = Ponto zero
B_{OE} = Controle final
1 a 40 = Amostras experimentais
0,1 a 10.000 = Diferentes concentrações das soluçãoamostras padrão

As amostras finais foram preparadas com diferentes quantidades de extrato fecal para cada hormônio dosado (Tabela 1) e os tubos deixados para secagem em capela “overnight” e ressuspendidos em solução do conjugado (Tabela 2). Padrões e amostras experimentais foram analisados em duplicata. Os poços da primeira coluna foram denominados Bo (máxima ligação entre o anticorpo e o conjugado). Para a curva padrão, 100µl de EIA buffer seguido de 50µl de cada padrão foram pipetados nos poços das colunas 1 e 2. Para as amostras de extratos fecais, 100µl de EIA buffer seguido de 50µl de amostra foram pipetados no poços das colunas 3 a 12 (Figura 5).

Tabela 2. Registro do valor das concentrações padronizadas referentes ao conjugado e anticorpo utilizados na determinação da quantidade hormonal no extrato fecal, Madri – 2009.

Hormônios	Conjugado	Anticorpo
Cortisol	1/40.000	1/4.000
Corticosterona	1/40.000	1/4.000
Estrona (E_1 Gluc.)	1/20.000	1/4.000
Estradiol (E_2)	1/160.000	1/4.000
Progesterona (P_4)	1/40.000	1/2.000
PdG	1/80.000	1/20.000

Após incubação em temperatura ambiente por 2 horas, as placas foram lavadas novamente e 100µl de solução de substrato (Enhanced K-Blue® TMB Substrate, Neogen Corporation) foi adicionada a cada poço. Uma vez passado o tempo de reação do substrato, a reação foi parada com 100µl de solução de 10% de H_2SO_4 e se se procedeu a leitura da densidade óptica da cor desenvolvida. Esta leitura se realiza em um leitor automático ELISA (Eurogenetics), de leitura bicromática que elimina a cor produzida por uma possível reação de fundo inespecífico. Os filtros utilizados são de 450 e 600 nm.

O processamento dos resultados obtidos da análise hormonal se realiza com o auxílio de um "software" desenvolvido, especialmente para este fim, no Departamento de Informática da Universidade da Califórnia, Davis - EUA.

O computador calcula as concentrações das amostras experimentais tomando como referência as curvas-padrão. Para expressar estas concentrações nas unidades corretas é necessária a introdução de um fator de correção, já que as amostras sofrem distintas diluições.

Para a determinação dos valores basais foi realizado um processo matemático para cada fêmea, onde os valores que excederam a média acrescida de 1,5 desvios-padrão foram excluídos. Com os valores restantes uma nova média foi calculada e o processo repetido sucessivamente até o momento em que nenhum valor excedeu o critério adotado (MOREIRA et al., 2001).

Para as progestinas foi utilizado o mesmo critério descrito acima, exceto pelo fato da utilização de 2,0 desvios-padrão. Para caracterizar uma ovulação, os valores altos de progestinas deveriam permanecer elevados por no mínimo uma semana após um pico de metabólitos de estradiol.

Os valores dos perfis hormonais entre as progestinas, entre os estrógenos e entre os corticosteróides foram analisados estatisticamente através do teste de Correlação de Pearson.

3.3 Avaliação Colpocitológica

No intuito de complementar as análises hormonais, após o término das colheitas hormonais, realizou-se avaliação colpocitológica nas cinco fêmeas adultas não prenhes, mantidas em baias individuais. O material para este exame foi colhido diariamente, durante 30 dias. O animal foi contido com puçá e antes de efetuar a colheita a limpeza da região perineal foi efetuada, um “swab” esterilizado inserido cuidadosamente até terço médio da vagina. A haste do “swab” foi movimentada no sentido da direita para a esquerda e retirada com o mesmo movimento.

O material coletado foi gentilmente colocado sobre a superfície de uma lâmina de microscopia e fixado com solução de álcool-eter (1:1) por aproximadamente 60 minutos, em seguida as lâminas foram coradas pelo corante Panótico.

Posteriormente as lâminas foram analisadas quanto aos tipos celulares em microscópio de luz Leica DM 5000 B (ocular de 10x e objetiva de 20X e 40x), sendo as preparações documentadas. O estudo colpocitológico se baseou na dinâmica e morfologia das células epiteliais da mucosa vaginal (basais, parabasais, intermediárias, superficiais).

IV. RESULTADOS

Os resultados referentes às análises do extrato hormonal fecal das pacas obtidos por meio da técnica de enzimaimunoensaio não estão registrados nesta dissertação mediante a solicitação da Professora Josefina Maria Illera de Portal, do Departamento de Fisiologia (Fisiologia Animal) da Faculdade de Veterinária da Universidade Complutense de Madri (Apêndice).

Colpocitologia

No estudo microscópico do material do epitélio vaginal de pacas verificou-se, para a paca B7 nos dias 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 27, 28, 29 e 30 de colheita, presença das seguintes células: parabasais, intermediárias, poucas células parcialmente queratinizadas e neutrófilos, com predominância de células intermediárias, caracterizando período de proestro.

Ainda para a paca B7, nas amostras relativas aos dias 10, 11, 21, 22, 23, 24 e 26 verificou-se presença de poucas células intermediárias, células parcialmente queratinizadas e células queratinizadas em maior quantidade, sugerindo período de estro.

Também em B7 no dia 25 de colheita, constatou-se a presença de muitos neutrófilos, células parabasais e células intermediárias, caracterizando período de diestro.

As características da colpocitologia da paca B7, em 30 dias, estão registradas nas Figuras 6, 7 e 8.

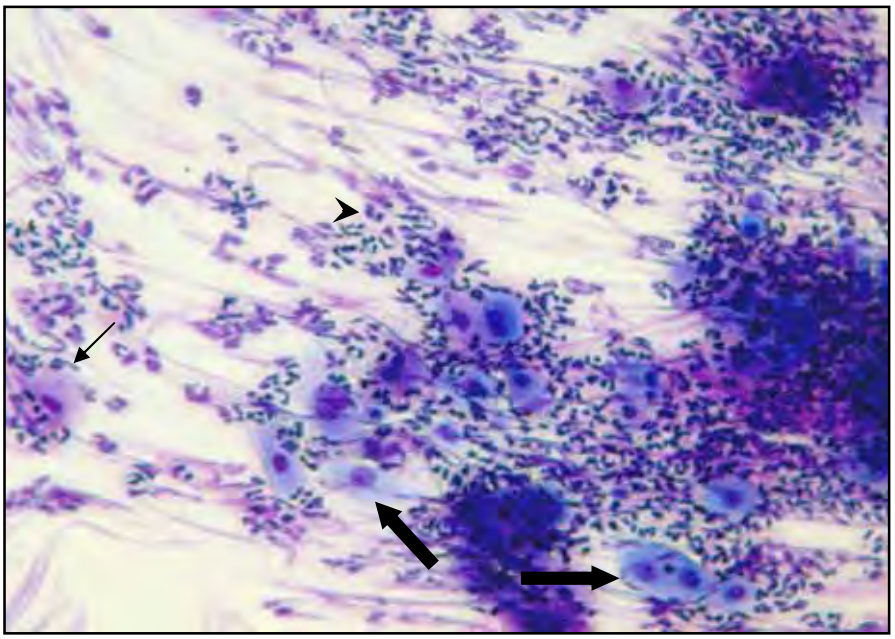

Figura 6. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B7 no dia 15/11/2008 (2^0 dia de colheita), sugerindo período de proestro. Observa-se a presença de células intermediárias (setas largas) que variam em tamanho. Também pode ser observada a presença de polimorfonucleares - neutrófilo (ponta de seta) e de células parcialmente queratinizadas (seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

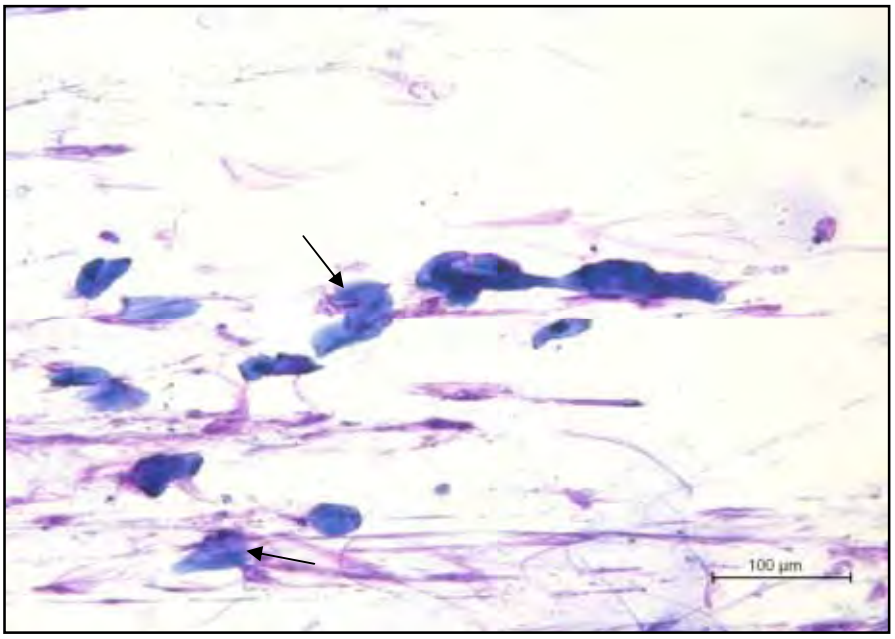

Figura 7. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B7 no dia 5/12/2008 (22^0 dia de colheita). Observa-se a presença de células superficiais queratinizadas, grandes, mortas e irregulares correspondendo ao período de estro (seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

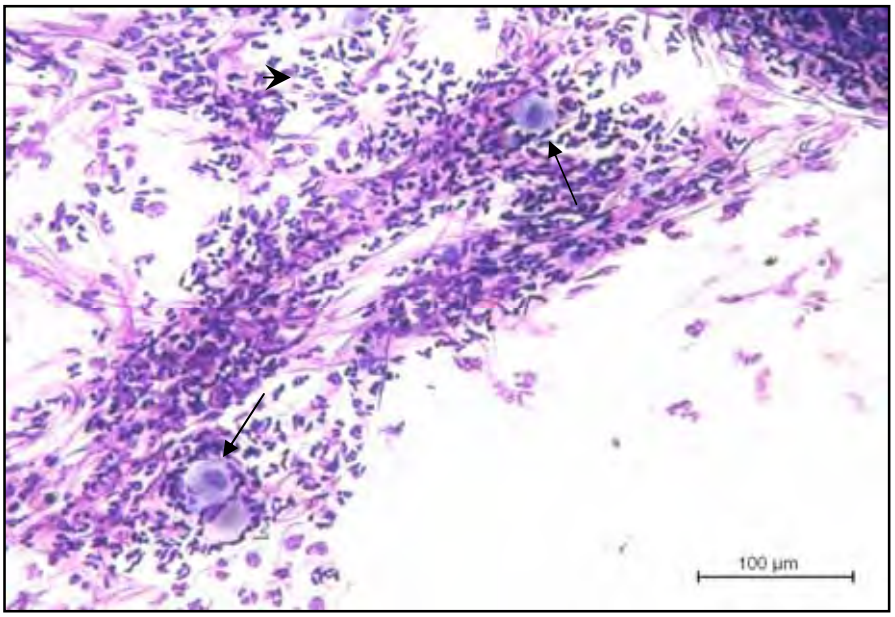

Figura 8. Fotomicrografias de citologia vaginal da paca B7 no dia 25/11/2008 (12^0), sugerindo período de diestro. Observa-se a presença de células intermediárias (seta) e muitos neutrófilos (ponta de seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Para o animal B8, nos dias 1, 2, 4, 5, 6, 16, 17, 29 e 30 verificou-se nas amostras analisadas presença de células parabasais e intermediárias, além de poucas células parcialmente queratinizadas e neutrófilos, com predominância de células intermediárias, caracterizando período de proestro.

Nos dias 9, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24, também para B8 verificou-se presença de poucas células intermediárias, células parcialmente queratinizadas e em maior quantidade, ocorrência de células queratinizadas, sugerindo período de estro.

Neste mesmo animal nos dias 13, 14, 15, 25, 26, 27 e 28 verificou-se a presença raras células queratinizadas, neutrófilos, células parabasais e células intermediárias, caracterizando período de diestro.

As características das células encontradas na citologia vaginal esfoliativa da paca B8 estão representadas nas Figuras 9, 10, 11.

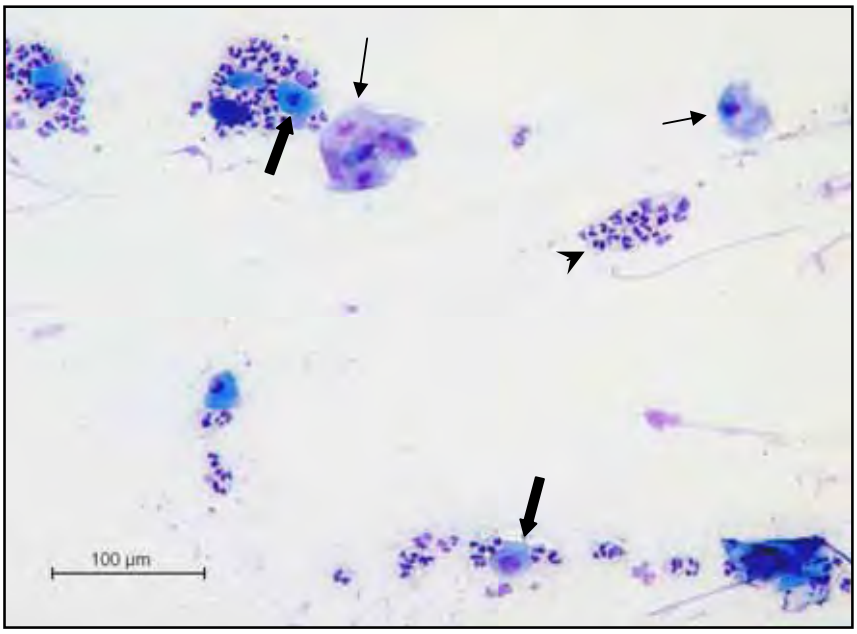

Figura 9. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B8 no dia 18/11/2008 (5^0 dia), sugerindo período de proestro. Observa-se a presença de células intermediárias (setas largas). Também pode ser observada a presença de polimorfonucleares - neutrófilo (ponta de seta) e de células parcialmente queratinizadas (seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

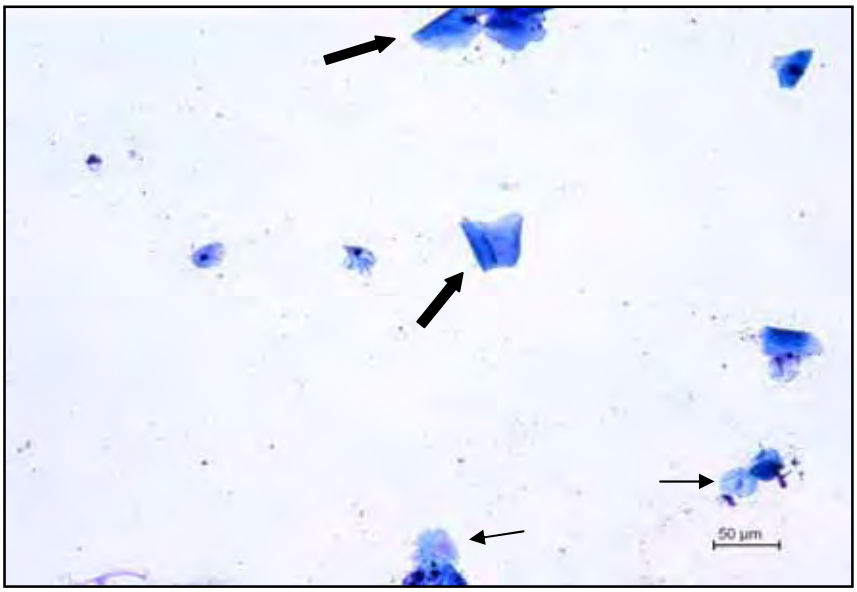

Figura 10. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B8 no dia 6/12/2008 (23^0dia). Observam-se células superficiais queratinizadas, grandes, mortas e irregulares correspondendo ao período de estro (seta larga) e ainda a presença de células parcialmente queratinizadas (seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

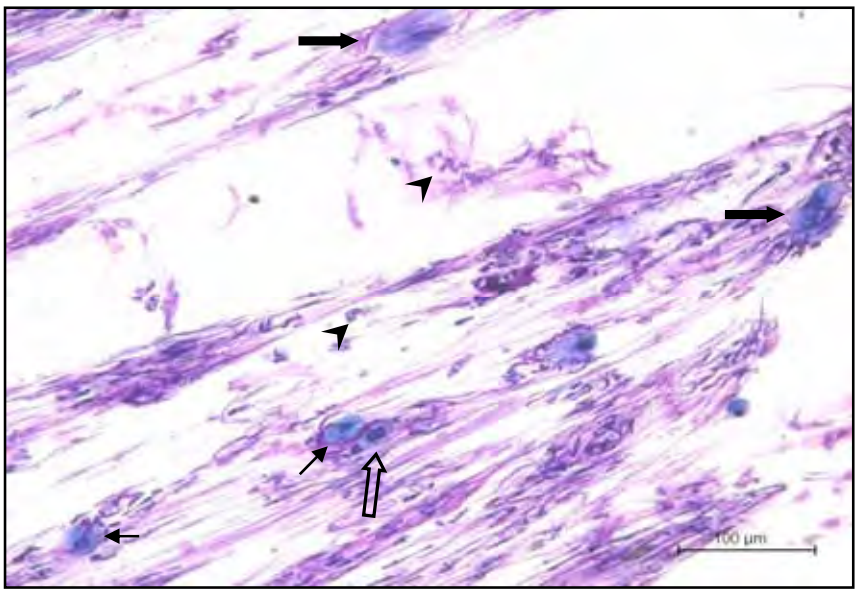

Figura 11. Fotomicrografias de citologia vaginal da paca B8 no dia 11/12/2008 (28^0), sugerindo período de diestro. Observa-se a presença de células intermediárias (seta), células parabasais (seta vazada), células queratinizadas (seta larga) e neutrófilos (ponta de seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Nos esfregaços vaginais do animal B9 verificou-se nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 15 e 19 a presença de células parabasais, células intermediárias, poucas células parcialmente queratinizadas e neutrófilos, predominando as células parabasais e intermediárias, caracterizando período de proestro.

Já, nos dias 8, 9 e 10, verificou-se presença de poucas células intermediárias, células parcialmente queratinizadas e células queratinizadas em maior quantidade, sugerindo período de estro.

Para este mesmo animal raras células queratinizadas, muitos neutrófilos e células intermediárias foram observados nos dias 11, 12, 13, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, caracterizando período de diestro.

As características da colpocitologia de B9, em 30 dias de observações, estão registradas nas Figuras 12, 13 e 14.

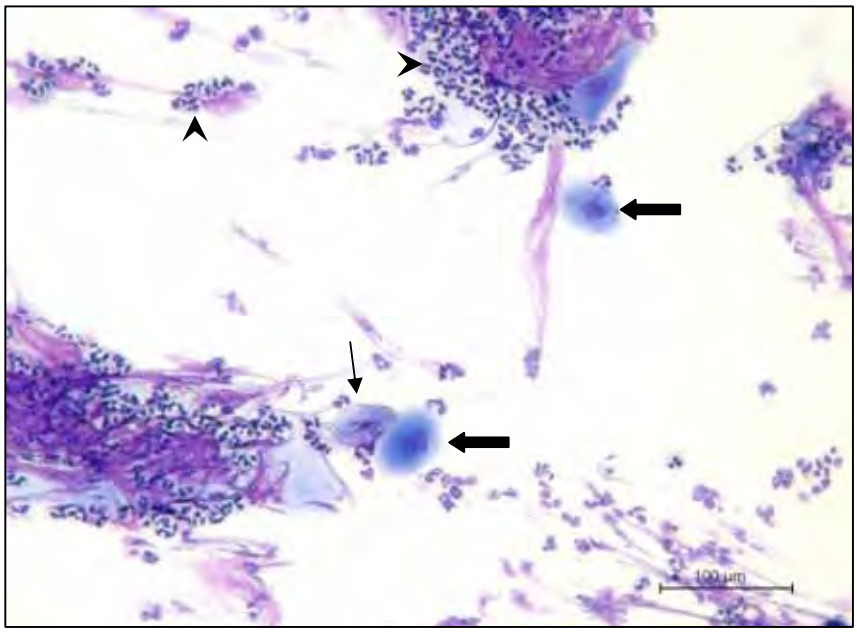

Figura 12. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B9 no dia 17/11/2008 (4^0 dia de colheita), sugerindo período de proestro. Observa-se a presença de células intermediárias (setas largas). Também podem ser verificados polimorfonucleares - neutrófilo (ponta de seta) e células parcialmente queratinizadas (seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

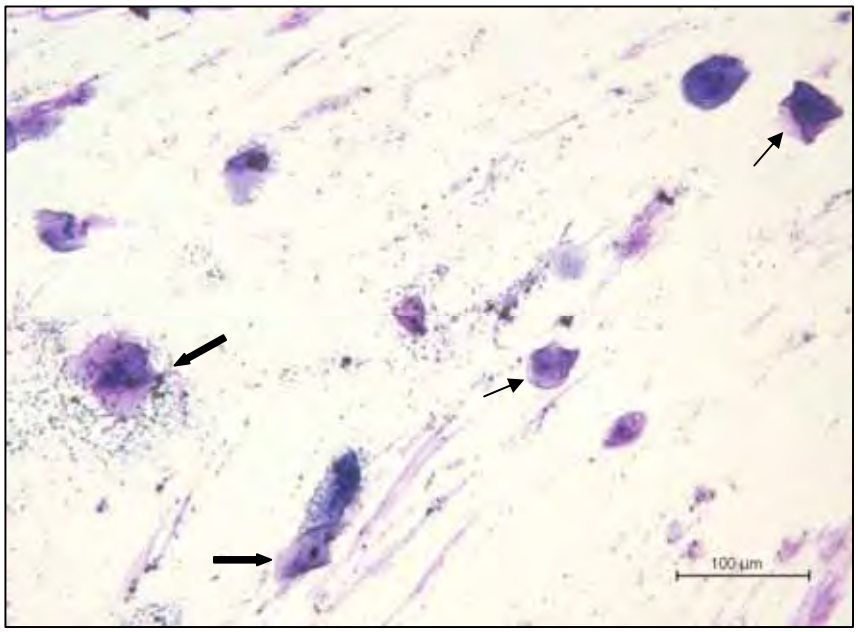

Figura 13. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B9 no dia 21/11/2008 (8^0 dia). Verificar células superficiais queratinizadas, grandes, mortas e irregulares (seta), correspondendo ao período de estro. Observar também células parcialmente queratinizadas (seta larga) que também podem estar presentes no estro. Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

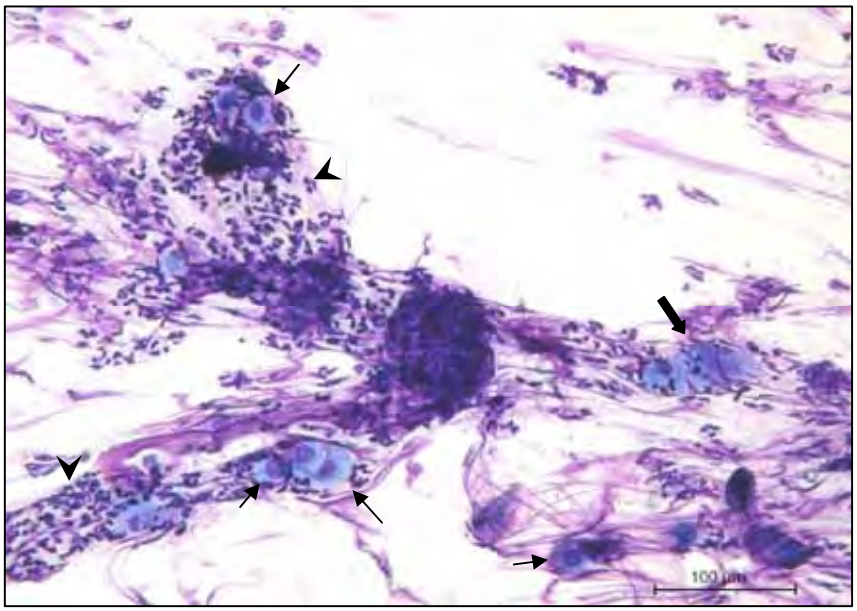

Figura 14. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B9 no dia 25/11/2008 (12^0 dia), sugerindo período de diestro. Observa-se a presença de células intermediárias (seta), células queratinizadas (seta larga) e neutrófilos (ponta de seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Na fêmea B10 foi também observada a presença de células parabasais, células intermediárias, poucas células parcialmente queratinizadas e neutrófilos, com predominância de células parabasais e intermediárias nos dias 10, 11, 12, 14, 15, 16, 29 e 30, caracterizando para estes dias período de proestro.

Nos dias 18, 19, 20, 21, 23, 26 e 27 verificou-se, nas amostras destes animais, presença de poucas células intermediárias, células parcialmente queratinizadas e células queratinizadas em maior quantidade, sugerindo período de estro.

Não se constataram para esta fêmea, no período de análise, características exclusivas da fase de diestro, observando-se nos dias 24 e 25 a presença de grande quantidade de células queratinizadas, muitos neutrófilos e raras células intermediárias, sugerindo para este período uma fase intermediária entre estro e diestro.

Salienta-se que este animal apresentava a membrana vaginal completamente fechada durante os primeiros nove dias de colheita, fato que não pemitiu a realização de observações neste período.

As características das células encontradas na citologia vaginal esfoliativa da paca B10, correspondentes ao período de 23/11/2008 a 13/12/2008 estão representadas nas Figuras 15, 16 e 17.

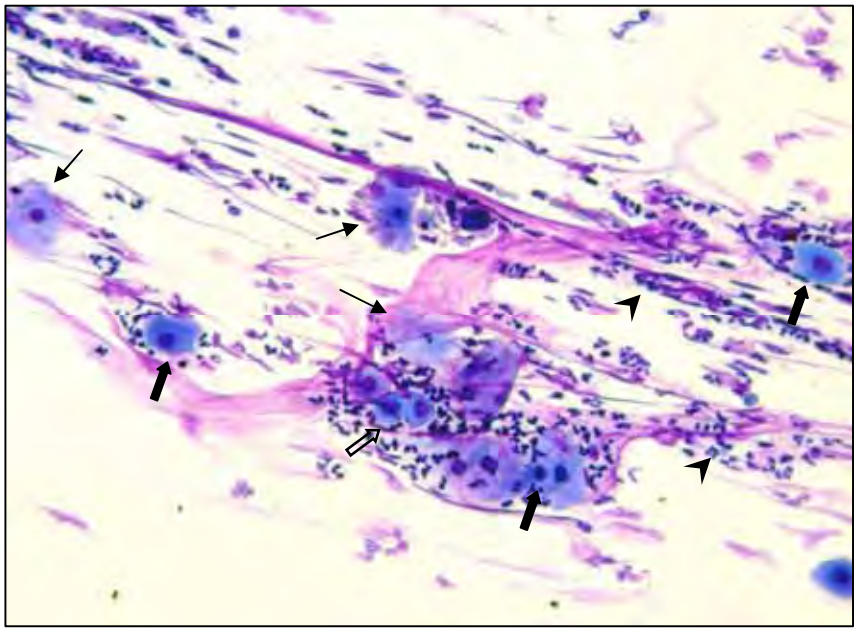

Figura 15. Fotomicrografia da citologia vaginal da paca B10 no dia 28/11/2008 (15^0 de colheita), sugerindo período de proestro. Observa-se a presença de células intermediárias (setas largas). Também pode ser observada a presença de polimorfonucleares - neutrófilo (ponta de seta), células parcialmente queratinizadas (seta) e células parabasais (seta vazada). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

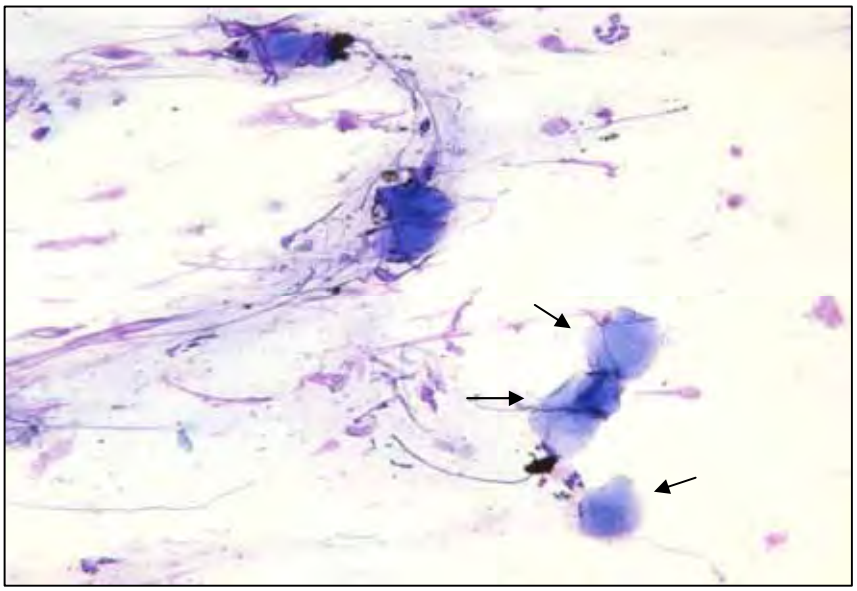

Figura 16. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B10 no dia 3/12/2008. Observar a presença de células superficiais queratinizadas, grandes, mortas e irregulares correspondendo ao período de estro (seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

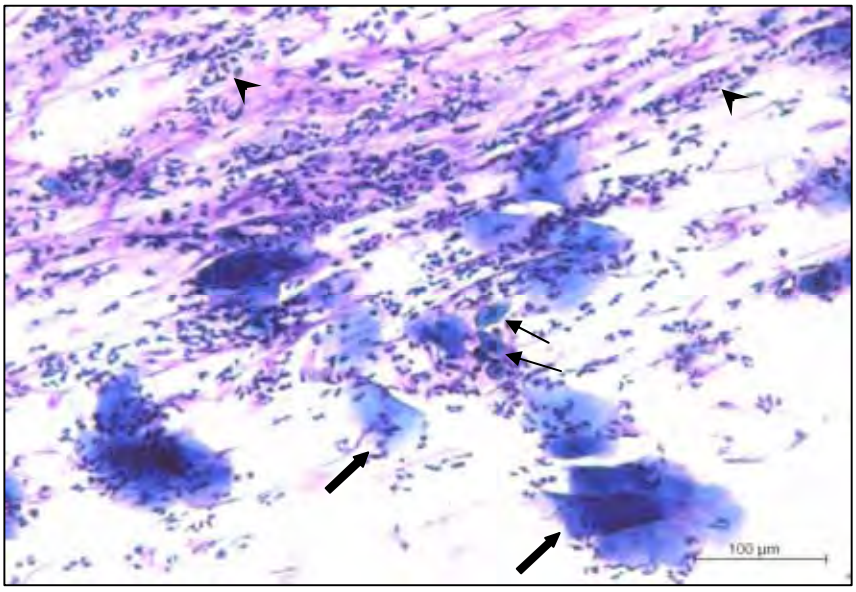

Figura 17. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B10 no dia 8/12/2008 (25^0). Observa-se a presença de células intermediárias (seta), células queratinizadas (seta larga) e neutrófilos (ponta de seta), sugerindo período de transição entre estro e diestro dada a presença de grande quantidade de neutrófilos e células queratinizadas. Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Para a paca B11 nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16,17, 18 e 19 verificou-se a presença de células parabasais, células intermediárias, poucas células parcialmente queratinizadas e neutrófilos, com predominância de células parabasais e intermediárias, caracterizando para estes dias, período de proestro.

Nos dias 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30 observou-se também para B11 ocorrência de células parcialmente queratinizadas e células queratinizadas em abundância, caracterizando período de estro.

Ainda em B11, nos dias 11, 12 e 22 verificou-se presença de muitos neutrófilos e células intermediárias, o que sugere para estes dias, período de diestro.

Nas Figuras 18, 19 e 20 está registrada a colpocitologia de B11.

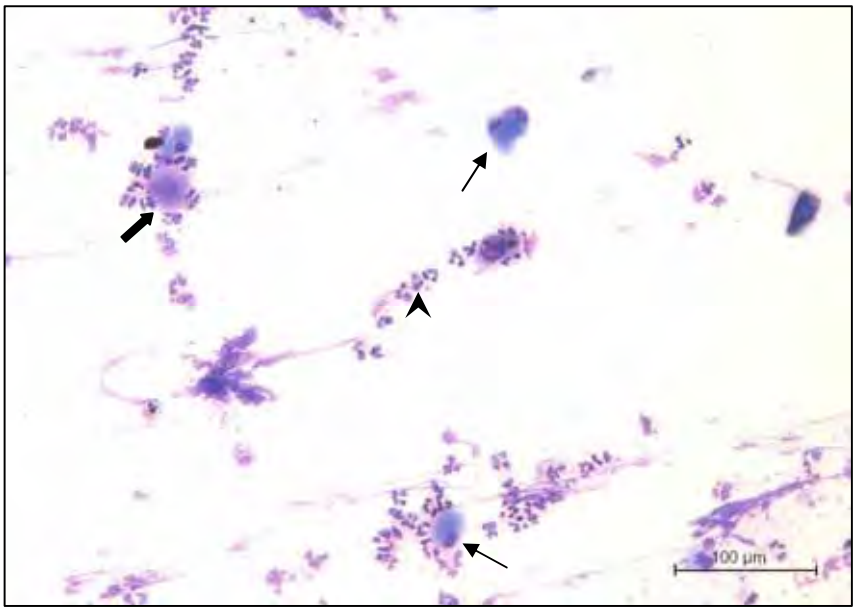

Figura 18. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B11 no dia 15/11/2008 (2^0 dia de colheita), onde se verifica presença de células intermediárias (setas), células parcialmente queratinizadas (seta larga) e polimorfonucleares - neutrófilo (ponta de seta), sugerindo período de proestro. Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

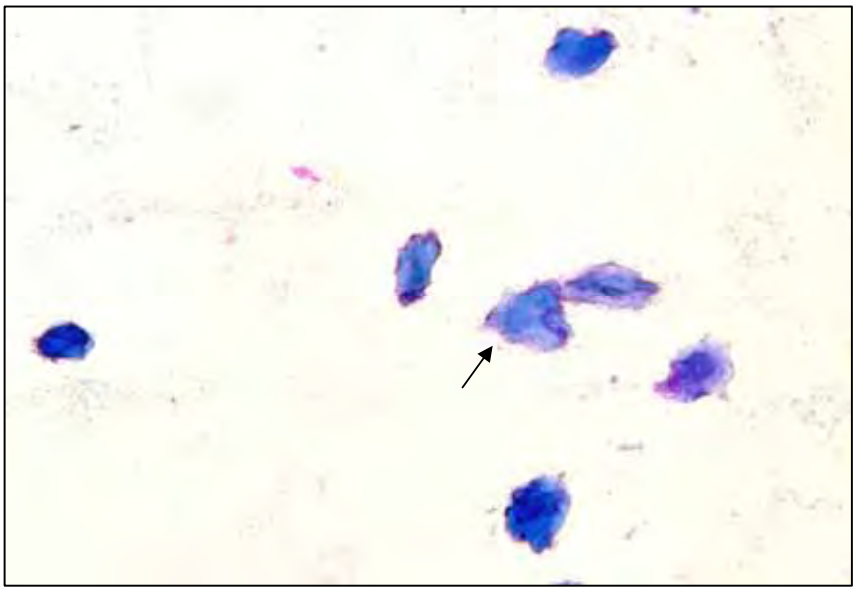

Figura 19. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B11 no dia 8/12/2008 (25^0dia). Observar a presença de células superficiais queratinizadas, grandes, mortas e irregulares (seta) correspondendo ao período de estro. Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

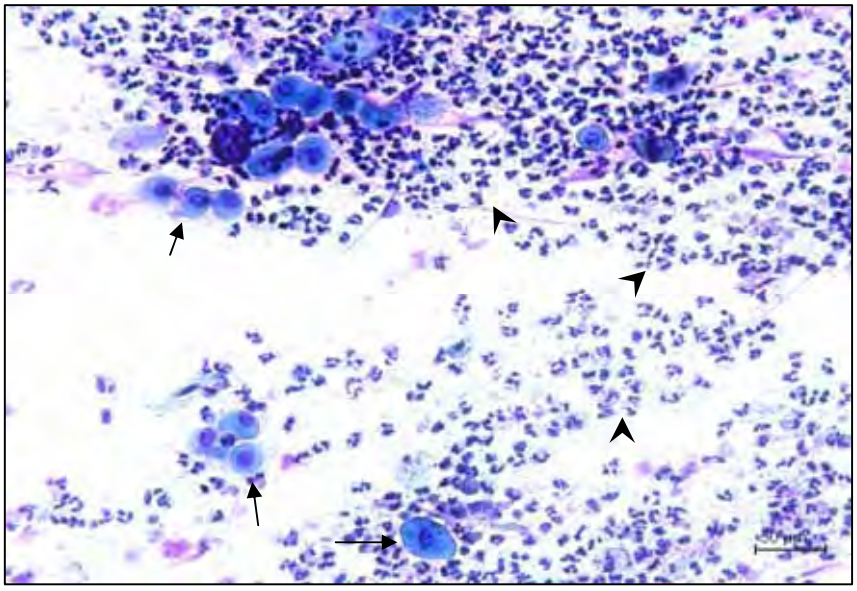

Figura 20. Fotomicrografia de citologia vaginal da paca B11 no dia 25/11/2008, sugerindo período de diestro. Observam-se a presença de células intermediárias (setas) e neutrófilos (ponta de seta). Aumento de 20x, coloração Panótico®, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Diariamente, no ato da colheita verificava-se para cada animal, o comportamento da membrana vaginal, ou seja se esta estrutura apresentava-se totalmente fechada, parcialmente aberta ou totalmente aberta.

Vale salientar que as fêmeas ficaram alojadas em baias individuais e completamente isoladas do macho. No entanto, ao final do período de colheita, no dia 05/12/2008 (correspondente ao dia 22 da colheita), foi necessário alojar uma paca macho na baia ao lado da baia da fêmea B11, estabelecendo-se assim, o contato visual e olfativo entre eles.

Para todos os animais pertencentes ao estudo pôde-se verificar, quanto ao comportamento da membrana vaginal, que em certos dias ela permanecia parcialmente aberta e, em outros, conservava-se fechada. Apenas na fêmea B11, foi observada maior abertura vaginal, com presença de muco na região, a partir do dia seguinte da introdução do macho, na baia ao seu lado, permanecendo dessa forma até o final da colheita (Figura 21 e Tabela 3).

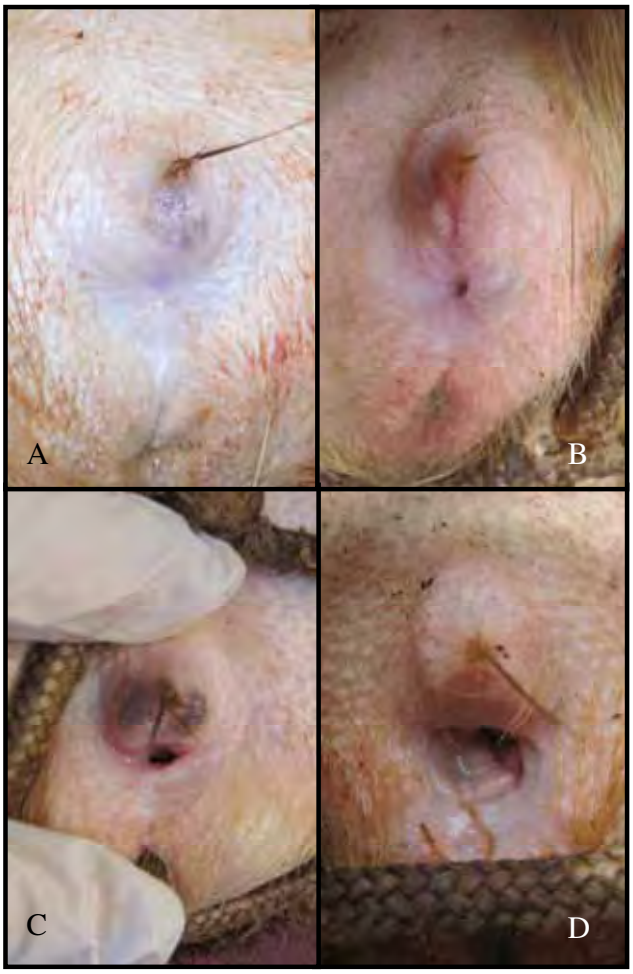

Figura 21. Registro fotográfico das diferentes apresentações da membrana vaginal em pacas adultas. Em A, membrana completamente fechada. Em B, incio da abertura da membrana. Em C, membrana pouco aberta. Em D, membrana totalmente aberta. Verifica-se ainda presença de muco na região, característica apresentada após contato visual e olfativo entre macho e fêmea, FCAV-UNESP, Jaboticabal – 2009.

Tabela 3. Registro dos dias e datas de colheita do material para a colpocitologia das fêmeas alojadas individualmente nas baias sete, oito, nove, dez e doze; da fase do ciclo estral correspondente às células do epitélio vaginal e da característica da membrana vaginal, para cada fêmea, diariamente. Jaboticabal - 2008.

DIA	DATA	B7	B8	B9	B10	B11
1	14/11/08	DIESTRO/ PROESTRO - M3	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3	M1	PROESTRO - M3
2	15/11/08	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3	M1	PROESTRO - M3
3	16/11/08	PROESTRO - M3	PROESTRO/ ESTRO - M3	PROESTRO - M3	M1	PROESTRO - M3
4	17/11/08	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3	M1	PROESTRO - M3
5	18/11/08	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3	PROESTRO - M2	M1	PROESTRO/ ESTRO - M3
6	19/11/08	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3	PROESTRO - M2	M1	PROESTRO/ ESTRO - M3
7	20/11/08	PROESTRO - M3	PROESTRO/ ESTRO - M3	PROESTRO - M2	M1	PROESTRO - M3
8	21/11/08	PROESTRO - M3	PROESTRO/ ESTRO - M3	ESTRO - M2	M1	PROESTRO/ ESTRO - M3
9	22/11/08	PROESTRO - M2	ESTRO - M3	ESTRO - M2	M1	PROESTRO - M3
10	23/11/08	ESTRO - M2	ESTRO - M2	ESTRO - M2	PROESTRO - M2	PROESTRO - M3
11	24/11/08	ESTRO - M2	ESTRO - M3	DIESTRO - M2	PROESTRO - M2	DIESTRO - M3
12	25/11/08	PROESTRO/ ESTRO - M2	ESTRO - M3	DIESTRO - M2	PROESTRO - M2	DIESTRO - M3
13	26/11/08	PROESTRO - M3	DIESTRO - M3	DIESTRO - M2	PROESTRO - M2	PROESTRO - M3
14	27/11/08	PROESTRO - M3	DIESTRO - M3	PROESTRO - M2	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3
15	28/11/08	PROESTRO - M3	DIESTRO - M3	PROESTRO - M2	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3
16	29/11/08	PROESTRO - M3	PROESTRO - M3	PROESTRO/ ESTRO - M2	PROESTRO - M3	PROESTRO - M2
17	30/11/08	PROESTRO - M2	PROESTRO - M3	PROESTRO/ ESTRO - M2	PROESTRO/ ESTRO - M2	PROESTRO - M2
18	1/12/08	PROESTRO/ ESTRO - M2	ESTRO - M3	PROESTRO/ ESTRO - M2	ESTRO - M2	PROESTRO - M2
19	2/12/08	PROESTRO - M3	ESTRO - M3	PROESTRO - M2	ESTRO - M2	PROESTRO - M3
20	3/12/08	PROESTRO/ ESTRO - M3	ESTRO - M3	PROESTRO/ ESTRO - M2	ESTRO - M2	PROESTRO/ ESTRO - M3
21	4/12/08	ESTRO - M2	ESTRO - M3	DIESTRO - M2	ESTRO - M2	ESTRO/ DIESTRO - M3
22	5/12/08	ESTRO - M2	ESTRO - M3	DIESTRO - M2	ESTRO - M2	DIESTRO - M3
23	6/12/08	ESTRO - M2	ESTRO - M3	DIESTRO - M2	ESTRO - M2	ESTRO - M4
24	7/12/08	ESTRO - M2	ESTRO - M3	DIESTRO - M2	ESTRO/ DIESTRO M2	ESTRO - M4
25	8/12/08	DIESTRO - M2	DIESTRO - M3	DIESTRO - M2	ESTRO/ DIESTRO M2	ESTRO - M4
26	9/12/08	ESTRO - M2	DIESTRO - M3	DIESTRO - M2	ESTRO - M2	ESTRO - M4
27	10/12/08	PROESTRO - M2	DIESTRO - M3	DIESTRO - M2	ESTRO - M2	ESTRO - M4
28	11/12/08	PROESTRO - M2	DIESTRO - M3	DIESTRO - M2	PROESTRO - M2	ESTRO - M4
29	12/12/08	PROESTRO - M2	PROESTRO - M3	DIESTRO - M3	PROESTRO - M2	ESTRO - M4
30	13/12/08	PROESTRO - M2	PROESTRO - M3	DIESTRO - M3	PROESTRO - M2	ESTRO - M4

M1 – Membrana totalmente fechada
M2 – Membrana com abertura infima
M3 – Membrana parcialmete aberta
M4 – Membrana completamente aberta

B7 – Fêmea da baia 7
B8 – Fêmea da baia 8
B9 – Fêmea da baia 9
B10 – Fêmea da baia 10
B11 – Fêmea da baia 12

V. DISCUSSÃO

Sabe-se que as fases do ciclo estral, nos mamíferos em geral, podem ser determinadas com base na resposta do epitélio vaginal ao estímulo hormonal, principalmente estrogênios e progesterona e esta observação é considerada um meio indireto de avaliação da função ovariana e do estado hormonal do indivíduo (FARIA, 2000; LUSTOSA et al, 2002), já que o estudo da citologia vaginal possibilita a observação da variação dos tipos celulares vaginais, coincidentes com a fase hormonal correspondente, sofrendo modificações ao longo do ciclo estral (SCHUTTE, 1967).

Diante das observações microscópicas do material do epitélio vaginal das pacas B7, B8, B9, B10 e B11, pode-se caracterizar a ocorrência de período de proestro, estro e diestro, não se verificando sinais de anestro; as outras fases foram identificadas ao se observar a presença de células do epitélio vaginal que correspondem a estas fases, ou seja, células intermediárias polimorfonucleares e células parcialmente queratinizadas que caracterizam o proestro; células superficiais queratinizadas, grandes, que assinalam o estro, além de células intermediárias e muitos neutrófilos que indicam o diestro (ROSZEL, 1975; MATTHEWS & KENYON, 1984; POST, 1985; FELDMAN & NELSON, 1987; FREEMAN, 1994; GUIMARÃES et al., 1997; MARCONDES et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Considerou-se para a paca que a fase de metaestro é uma parte da fase de diestro, conforme os registros de FREEMAN (1994), ao descrever o ciclo estral do rato, dessa forma utilizou-se apenas a denominação de diestro neste trabalho.

Mesmo constatando-se a ocorrência de células características de todas as fases do ciclo estral, supra citadas, para a paca, não foi possível definir o período exato de cada uma delas, determinando seu ciclo estral, diferentemente do que descreveram GUIMARÃES et al. (1997) para a cutia, MARCONDES et al. (2002) para o rato; NOGUEIRA et al. (2005) e GUIMARÃES et al. (2008), para a paca.

Atribuí-se a não definição do período exato do ciclo estral de cada uma das fêmeas avaliadas, ao manejo dos animais no decorrer desta pesquisa, pois as pacas foram alojadas individualmente para que apresentassem as mesmas condições quando da colheita de material para a análise homonal fecal. Entretanto, é imprescindível considerar que uma das características dos fenômenos da reprodução dos mamíferos é que alguns ovulam espontânea e ciclicamente, independentemente da presença do parceiro, enquanto outros apresentam ovulação reflexa, dependente do coito ou da estimulação genital. Esta ritmicidade sexual depende fundamentalmente das alterações funcionais, cíclicas, que ocorrem no sistema hipotálamo–hipofisário-gonadal, sistema este muito sensível às modificações ambientais: ritmo de claro e escuro, temperatura, odores provenientes do animal do sexo oposto ou a qualquer outro tipo de estresse (ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO, 1999). Estes fatores deveriam ser melhor caracterizados para cada um dos animais avaliados, mediante protocolo específico para tal.

Finalmente, embora não fizesse parte das propostas dessa pesquisa, cabe registrar que, diariamente, no ato da colheita do material para a colpocitologia, verificava-se o comportamento da membrana vaginal para cada animal, a qual se apresentava, ora totalmente fechada, em outras oportunidades, parcialmente aberta ou ainda, em certas ocasiões totalmente aberta, pois segundo KLEIMAN et al. (1980) e ROWLANDS & WEIR (1984) há clara indicação de que todos os caviomorfos, exceto o *Myocastor coypus*, possuam uma membrana vaginal oclusa, a qual, para ROWLANDS & WEIR (1984) e FOWLER (2003) é formada em função da hiperplasia de células epiteliais e que se abre somente durante o estro e o parto; além disso, MATAMOROS & PASHOV (1984) consideram a duração do ciclo estral da paca como sendo o período compreendido entre o primeiro dia de abertura da membrana vaginal e o dia anterior à abertura seguinte, situação esta, que nesta oportunidade, não se conseguiu estabelecer.

Maior evidência deu-se ao fato de que, no decorrer das colheitas as fêmeas ficaram alojadas em baias individuais e completamente isoladas de machos e, no 22º dia de colheita, por uma questão de manejo geral do criatório, houve a necessidade de

se alojar uma paca macho, na baia ao lado da baia da fêmea B11, estabelecendo assim, o contato visual e olfativo entre eles. A partir daí, foi constatada para essa fêmea, maior abertura vaginal, com presença de muco na região, situação que permaneceu até o final da colheita e que coincidiu com as seguintes observações à colpocitologia: presença de células superficiais queratinizadas, grandes, mortas e irregulares que caracterizam período de estro.

Mediante análise colpocitológica realizada nesta pesquisa não foi possível se constatar, neste período, o episódio de um ciclo estral completo. Dessa forma, para que se possa obter resultados mais consistentes, experimentos com delineamentos mais elaborados devem ser realizados.

Enfim, é imperioso se considerar que entre os roedores, a subordem histricomorfa, na qual se insere a paca, os modelos reprodutivos apresentados parecem ser mais diversificados, do que em qualquer outro grupo de mamíferos (WEIR & ROWLANDS, 1973).

VI. CONCLUSÕES

Nas condições e exigências em que o experimento foi conduzido pode-se concluir que:

1. Verificaram-se alterações na morfologia das células da mucosa vaginal, das pacas estudadas.

2. Tipos celulares característicos das fases de proestro, estro e diestro foram verificados na colplcitologia das pacas estudadas.

3. Mediante as análises colpocitológicas das pacas, não se observou fase de anestro.

4. A presença do macho interfere claramente na análise colpocitológica.

VII. REFERÊNCIAS

ADAMS, C. E. Observations on the induction of ovulation and expulsion of uterine eggs in the mink, *Mustela vision*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oklahoma, v. 63, p. 241-248, 1981.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema Reprodutor. In:_____ AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999. p. 877-917.

BAKKER, J.; BAUM, M. J. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. **Frontier in Neuroendocrinology**, San Diego, v. 21, p. 220-260, 2000.

BANKS, D. R. Physiology and endocrinology of the feline estrous cycle. *In*: Morrow DA (Ed.). **Current therapy in Theriogenology.** Philadelphia: WB Saunders. 1986. p. 795-800.

BAUER, B.; PALME, R.; MACHATSCHKE, I. H.; DITTAMI, J.; HUBER, S. Non-invasive measurement of adrenocortical and gonadal activity in male and female guinea pigs (*Cavea aperea f. porcellus*). **General and comparative endocrinology**, Oxford, v. 156, p. 482-489, 2008.

BENTTI, S. B. Roedores da américa tropical. **Natura**, Caracas, n.70-1, p.40-4, 1981.

BERGALLO, H. G. Comparative life-history characteristics of two species of rats, *Proechimys iheringi* and *Oryzomys intermedius*, in an Atlantic Forest of Brazil. **Mammalia**, Paris, v. 59, n. 1, p. 51-64, 1995.

BJÖRKMAN, N.; DANTZER, V.; LEISER, R. Comparative placentation in laboratory animals-a review. **Scandinavian Journal of Animal Science**, Copenhagen, v.16, n.4, p.129-158, 1989.

BLAND, K. P. Biphasic follicular growth in the guinea-pig estrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility,** Oklahoma, v. 60, p. 73–76, 1980.

BOUCHIE, L.; BENNETT, N. C.; JACKSON, T.; WATERMAN, J. M. Are cape groud squirrels (*Xenus inauris*) induced or spontaneous ovulators?. **Journal of mammalogy**, Lawrence, v. 87, n. 1, p. 60-66, 2006.

BRAMBELL, F. W. R. Ovarian changes. In:_____ **Marshall's Physiology of Reproduction**. Vol. 1, Part 1. London: Longmans, Green and Co. 1956. pp. 397-542.

BRONNER, G.; RAUTENBACH, I.L.; MEESTER, J. Environmental influence on reproduction in the Natal multimammate mouse *Mastomys natalensis*. **Soutern Africa Tydskr. Natuurnav.**, v. 18, n. 4, p.142-148, 1988.

BRONSON, F. H. **Mammalian reproductive biology**. Chicago: The University of Chicago Press, 1989.

BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; WIELEBNOWSKI, N; GOODROWE, K. L.; GRAHAM, L. H.; WELLS, S.; HOWARD, J. G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by fecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oklahoma, v. 106, p. 337-46, 1996.

BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, Geneva, v. 66, p. 25-36, 2006.

BUSSO, J. M.; PONZIO, M. F.; CUNEO, M.F.; RUIZ, R. D. Noninvasive monitoring of ovarian endocrine activity in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **General and Comparative Endocrinology**, Oxford, v. 150, p. 288–297, 2007.

CHELINI, M. O. M.; SOUZA, N. L.; ROCHA, A. M.; FELIPPE, E. C. G.; OLIVEIRA, C. A. Quantification of fecal metabolites in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 1711-1717, 2005.

CHRISTIANSEN, I. J. **Reprodução no cão e no gato.** São Paulo: Manole, 1988. 362p.

CONAWAY, C. H. Ecological adaptation and mammalian reproduction. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 4, p. 239-247, 1971.

COSTANZO, L. S. Fisiologia da Reprodução. In:_____ **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 361-378. 1999.

CZEKALA, N. M.; DURRANT, B. S.; CALLISON, L.; WILLIAMS, M.; MILLARD, S. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. **Zoo Biology**, New York, v. 13, p. 119-128, 1994.

CZEKALA, N. M; LASLEY, B. L. A technical note on sex determination in monomorphic birds using fecal steroid analysis. **International Zoo Yearbook,** London, v. 17, p. 209-211, 1977.

DEVLIN, T. M. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations.** 5ed. San Francisco: John Wiley & Sons. 2005. 1208p.

DIRSCHERL, W.; MOSEBACH, K. O. The initial distribution of radiocarbon in mice and rats after administration of testoterone-4-C14. **Acta Endocrinology**, Bucharest, v. 36, p. 115-25, 1961.

DUBOST, G.; HENRY, O.; COMIZZOLI, P. Seasonality of reproduction in the three largest terrestrial rodents of French Guiana forest. **Mammalian Biology**, Madison, v. 70, n. 2, p. 93–109, 2005.

ECKERT, R.; RANDALL, D.; AUGUSTINE, G. Animal Physiology. In:_____ **Mechanisms and adaptations**. New York: W.H. Freeman and Company. 2ª ed. 1988.

EISENBERG, J. F. Order rodentia: A preliminary analysis of neotropical mammal fauna. In_____ **Mammals of the neotropics: the northern neotropics**. Chicago: University of Chicago, 1989.

ENDERS, R. K. Reproduction in the mink (*Mustela vision*). **Proceedings of the American Philosophical Society**, Philadelphia, v. 96, p. 691-755, 1952.

FARIA, C. A. Efeitos do tamoxifeno sobre as citologias vaginal e urinária e a dopplervelocimetria dos vasos peri–uretrais de mulheres na pós–menopausa. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2000.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Canine female reproduction. In:_____ **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1987. p. 399-418.

FIERRO, S. M.; MORALES, L. M. S. Caracterización del ciclo estral en el tepezcuintle (*Agouti paca*) por medio de frotis vaginales. **Tesis de licenciatura**. Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México, 1995.

FLOWERDEW, J. R. **Mammals: their reproductive biology and population ecology**. London: Edward Arnold Publishers Ltd., 1987. 241 p.

FOWLER, M. E. Rodents (rodentia). In:_____ **Zoo and wild animal medicine**. 5ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 2003. 782p.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In:_____ KNOBIL, E.; NEIL, J. **The Physiology of Reproduction**. 2º ed. New York: Raven Press. 1994. 3250 p.

GERBASI, S. H. B.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, T. C.; CAPALBO, A. C.; BARBOSA, R. R. Estudo histológico da vagina e vulva da paca (Agouti paca, Linnaeus, 1766). In: XXII Congresso Brasileiro de Anatomia, XXVII Congresso Chileno de Anatomia e VII Congresso de Anatomia del Cono Sur, 2006, Florianópolis. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Anatomia, XXVII Congresso Chileno de Anatomia e VII Congresso de Anatomia del Cono Sur, 2006**. v. 1, p. 205.

GRECO, D.; STABENFELDT, G. H. Glândulas endócrinas e suas funções. In:_____ CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1999. p. 324-350.

GUIMARÃES, D. A.; MOREIRA, D.; VALE, W. G. Determinação do ciclo reprodutivo da cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) através do diagnóstico colpocitológico. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 27, n. 1, p. 55-64, 1997.

GUIMARÃES, D. A.; LAMEIRA, A. P.; OHASHI, O. Perfil hormonal de progesterona no ciclo estral da *Agouti paca* - estudo preliminar. **IV Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre en Amazonia y Latinoamérica**, Asunción, p. 117-118, 1999.

GUIMARÃES, D. A.; BASTOS, L. V.; FERREIRA, A. C. S.; LUZ-RAMOS, R. S., OHASHI, O. M., RIBEIRO, A. L. Características reprodutivas da paca fêmea (Agouti paca) criada em cativeiro, **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 3, p. 531-538, 2008.

HADLEY, M. E. **Endocrinology.** 6º ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1996.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. Ciclos Reprodutivos. In:_____ **Reprodução Animal**. 7ª ed. Barueri: Manole, 2004. p. 55-67.

HAMASAKI, S.; YAMAUCHI, K.; OHKI, T.; MURAKAMI, M.; TAKAHARA, Y.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Comparison of various reproductive status in sika deer (*Cervus nippon*) using fecal steroid analysis. **Theriogenology,** Geneva, p. 195-198, 2001.

HAN, A.; MARANDICI, A.; MONDER, C. Metabolism of Corticosterone in the Mouse. Identification of 11 beta, 20 alpha-dihydroxy-3-oxo-4-pregnen-21-oic acid as a major metabolite, **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 258, p. 13703-13707, 1983.

HEISTERMANN, M.; TARI, S.; HODGES, J.K. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae. **Journal of Reproduction and Fertility,** Oklahoma, v. 99, p. 243–251, 1993.

HELLGREN, E. C.; LOCHMILLER, R. L.; AMOSS, M. S.; GRANT, W. E. Endocrine and metabolic responses of the collared peccary (*Tayassu tajacu*) to inmobilization with ketamine hydrochloride. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 21, n. 4, p. 417-425, 1985.

HERZIG-STRASCHIL, B. On the biology of xenus inauris (Zimmerman, 1780) (Rodentia: Sciuridae), **Zeitschrift für Säugetierkunde,** v. 43, p. 262- 278, 1978.

HUBER, S.; PALME, R.; ZENKER, W.; MÖSTL, E. Non-invasive monitoring of the adrenocortical response in red deer. **Journal of Wildlife Management,** Bethesda, v. 67, p. 258–266, 2003.

HUTZ, R. J.; BEJVAN, S. M.; DURNING, M.; DIERSCHKE, D. J.; FISHER, C. L.; ZACHOW, R. J. Changes in follicular populations, in serum estrogen and progesterone, and in ovarian steroid secretion in vitro during the guinea pig estrous cycle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 42, p. 266–272, 1990.

ILLERA, J. C. S.; MUNRO, C. J.; LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; LIU, I. K. M.; ILLERA, M. Amplified androstenedione enzymeimmunoassay for the diagnosis of cryptorchidism in the male horse:comparison with testosterone and estrone sulphate methods. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 84, p. 377-382, 2003.

ISOBE, N.; NAKAO, T.; YAMISHIRO, H.; SHIMADA, M. Enzyme immunoassay of progesterone in the feces from beef cattle to monitor the ovarian cycle. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.110-114, 2005.

JÖCHLE, W. Current research in coitus-induced ovulation: A review. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, Oklahoma, v. 22, p. 165-207, 1975.

JOHANNSSON, A. **Principles and practice of immunoassay**. New York: Ed. Macmillan, 1991. 300p.

JUNQUEIRA, L. C. U; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In:_____ **Histologia Básica**. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KIRBY, V. L.; RIDGWAY, S. H. Hormonal evidence of spontaneous ovulation in captive dolphins, *Tursiops truncatus* and *Delphinus delphis*. **Reports of the International Whaling Commission Special Issue**, v. 6, p. 459-464, 1984.

KLEIMAN, D. G.; EISENBERG, J. F.; MALINIAK, E. Reproductive parameters and productivity of Caviomorph Rodents. In:_____ EISENBERG, J. F. **Vertebrate ecology in the northern neotropics**. Washington: Smithsonian Institution. 1980. p. 173-183.

KORNDÔRFER, C. M. Hormônios sexuais nas fezes: opção para estudos reprodutivos e etológicos de animais silvestres. **Anais de Etologia**. v. 14, p. 151-158, 1996.

LASLEY, B. L.; TOEDSSON, M.; BRAVO, W.; HAGGERTY, M. A. Estrogen conjugate measurements to monitor ovarian activity. **Theriogenology**, Geneva, v. 31, n. 1, p. 127-139, 1989.

LASLEY, B. L.; KIRKPATRIC, J. F. Monitoring ovarian function in captive and freeranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine,** Lawrence**,** v. 22, p. 23-31, 1991.

LOWY, J.; ALBEPART, T.; PASQUALINI, J. R. 3H-Corticosterone metabolism in the rat. **Acta Endocrinology**, Bucharest, v. 61, p. 483-493, 1969.

LUSTOSA, A. B.; GIRÃO, M. J. B. C.; SARTORI, M. G. F.; BARACAT, E. C.; LIMA, G. R. Citologia Hormonal do Trato Urinário Baixo e da Vagina de Mulheres na Pós-menopausa, antes e durante Estrogenioterapia Oral e Transdérmica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 9, p. 573-77, 2002.

MACHADO, M. R. F.; BORGES, E. M.; MIGLINO, M. A.; CRUZ, C.; GERBASI, S. H. B. Morfologia do Pênis e do Prepúcio da Paca (Agouti paca L.1766). In: X Congresso Luso-Brasileiro de Anatomia, 2004, Porto - Portugal. **Anais: X Congresso Luso-Brasileiro de Anatomia**. Portugal : Universidade do Porto, p. 55-55, 2004.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 4a, 2002.

MATAMOROS, Y. Notas sobre la biologia del Tepezcuinte, Cuniculus paca, Brisson (Rodentia, Dasyproctidae) en cautiverio. **Brenesia,** San Jose, p. 19–82, 1982.

MATAMOROS, Y.; PASHOV, B. Ciclo estral del tapezcuinte (*Cuniculus paca*) en cautiverio. **Brenesia,** San Jose, n. 22, p. 249-60, 1984.

MATTHEWS, M. K.; KENYON, R. Four-versus five-day estrous cycles in rats: vaginal cycling and pregnancy. **Physiology and Behavior**, Amsterdã, v. 33, p. 65-67, 1984.

McCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis, A. Neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 79, p. 263-324, 1999.

MILLIGAN, S. R. Induced ovulation in mammals. In:_____ FINN C. A., **Oxford Reviews of Reproductive Biology.** London: Clarendon Press, v. 4, p. 1-46, 1982.

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, Oxford, v. 138, p. 189-199, 2004.

MONDOLFI, E. La lapa o paca. **Defensa de la naturaleza**, v. 5, n. 2, p. 4-16, 1972.

MOREIRA, N. Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus*. **Tese de Doutorado**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2001

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

MÖSTL, E.; NÖBAUER, H.; CHOI, H. S.; WURM, W.; BAMBERG, E. Trächtigkitdiagnose bei der Stute mittels Ostrogenbestimmung. **Kot. Prakt. Tierarzit**, v. 64, p. 491- 492, 1983.

MÖSTL, E.; CHOI, H. S.; WURM, W.; ISMAIL, M. N.; BAMBERG, E. Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17α in faeces. **British Veterinary Journal**, London, v. 140, p. 287-291, 1984.

MUNRO**,** C. J.; STABENFELDT, G. H.; CRAGUN, J. R.; ADDIEGO, L. A.; OVERSTREET, J. W.; LASLEY**,** B. L. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 6, p. 838-844, 1991.

NOGUEIRA, T. M. R.; TONIOLLO, G. H.; GIANNONI, M. L. Estrous cycle colpocytology in captive pacas (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766). **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, p. 209-214, 2005.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M.N. Excretion of infused 14C steroid hormones via feces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, p. 43–63, 1996.

PALME, R. Measuring Fecal Steroids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, 1046: 75-80, 2005.

PEREIRA, R. J. G.; POLEGATO, B. F.; SOUZA, S; NEGRÃO, J. A.; DUARTE, J. M. B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (Mazama gouazoubira)

by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, Geneva, v. 65, n. 2006, p. 387-399, 2006.

PEREZ, L. E; CZEKALA, N. M; WEISENSEEL, K. A; LASLEY, B. L. Excretion of radiolabeled estradiol metabolites in the slow loris (Nycticebus coucang). **American Journal of Primatology**, v. 16, p. 321–330, 1988.

PÉREZ, R. C. M.; BAZ, E. A. C. Actividad ovárica del tepezcuintle *Agouti paca* (Rodentia: Agoutidae) en cautiverio. **Revista de Biología Tropical (International Journal of Tropical Biology and Conservation)**, San José, v. 54, n. 3, p. 903-912, 2006.

PERRY, J. S.; ROWLANDS, I. W. Early pregnancy in the pig. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oklahoma, v. 4, p. 175, 1962.

PERRY, J. S. **The Ovarian Cycle of Mammals**. 1ª ed. Edinburgh: Oliver and Boyd. 1971. 219 p.

POST, K. Canine Vaginal cytology during the estrous cycle. **Canine Veterinary Journal**, n. 26, p. 101-104, 1985.

RAZDAN, P.; MWANZA, A. M.; KINDAHL, H.; HULTÉN, F.; EINARSSON, S. Effects of repeated ACTH-stimulation on early embryonic development and hormonal profiles in sows. **Animal Reproduction Science**, v. 70, p. 127-137, 2002.

ROSZEL, J.F. Genital cytology of the bitch. **Veterinary Scopy XIX**, v.19, n.1, p.3-15, 1975.

ROWLANDS, I. W.; WEIR, B. J. Mammals: non-primates eutherians. In:_____ LAMMING, G.E., **Marshall's physiology of reproduction**. 4ª ed. London. 1984, p.455-542.

SACHSER, N. Sozialphysiologische Untersuchungen an Hausmeerschweinchen. **Paul Parey**, Berlin, p. 21–23, 1994.

SCHROEDER, J. P.; KELLER, K. V. Seasonality of testosterone and sperm density in *Tursiops truncatus*. **Journal of Experimental Zoology**, New Haven, v. 249, p. 316-326, 1989.

SCHUTTE, A. P. Canine vaginal cytology ll- Cyclic changes. **Journal of Small Animal Practice**, Gloucester, v. 8, p. 307-311, 1967.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R.; BAMBERG, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 515-526, 1996.

SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, London, v. 41, p. 51-74, 2007.

SHIDELER, S. E.; ORTUNO, A. M.; MORAN, F. M.; MOORMAN, E. A.; LASLEY, B. L. Simple extraction and enzyme immunoassays for estrogen and progesterone metabolites in the feces of Macaca fascicularis during nonreceptive and conceptive ovarian cycles. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 48, p. 1290-1298, 1993.

SHILLE, V. W.; HAGGERTY, M. A.; SHACKLETON, C.; LASLEY, B. L. Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cats (Felis catus). **Theriogenology**, Geneva, v. 34, p. 779-794, 1990.

SILVA, F. **Ordem Rodentia: mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 1984. p.171-209.

SILVA, T. F. P. Terapias para indução de estro em gatas. **Revista Brasileira de Reprodrodução Animal,** Belo Horizonte, v.31, n.1, p. 84-91, 2007.

SINGER, L. A.; KUMAR, M. S. A.; GAVIN, W.; AYRES, S. L. Predicting the onset of parturition in the goat by determining progesterone levels by enzyme immunoassay. **Small Ruminant Research**, v. 52, p. 203-209, 2004.

SMYTHE, N.; BROWN DE GUANTI, O. La domesticación y cría de la paca (*Agouti paca*). **Guía de conservación No. 26.**, Roma, 1995. 91 p.

STEPHENS, D. B. Stress and its measurement in domestic animals: a review of behavioral and physiological studies under field and laboratory situation. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 24, p. 179-210, 1980.

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

TERKEL, J. Neuroendocrine processes in the establishment of pregnancy and pseudopregnancy in rats. **Psychoneuroendocrinology**; v. 1, p. 5-28, 1988.

THOREL, J. B.; LARSON, S. M. **Radioimunoassay and related techniques.** Saint Louis: Mosby Company, 1978. 289 p.

TOBIN, M. E.; KOEHLER, A. E.; SUGIHARA, R. T. Seasonal patterns of fecundity and diet of roof rats in a hawaiian macadamia orchard. **Wildlife Research,** v. 21, p. 519-526, 1994.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoids metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1046, p. 54-4, 2005.

TSUJI, A.; MAEDA, M.; ARAKAWA, H.; **Analytical Sciences**, Bedforshire, p. 497, 1989.

TSUTSUI, T.; STABENFELDT, G. H. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl,** Oklahoma, n. 47, p. 29-35, 1993.

Van AARDE, R. J. Circulating progesterone and oestradiol-17β concentrations in cyclic Cape porcupines, *Hystrix africaeaustralis*, **Journal of Reproduction and Fertility**, Oklahoma, v. 75, p. 583-591, 1985.

VARLEY, M. Stress and reproduction. **Pig News and Inform.**, v. 12, p. 567-571, 1991.

WASSER, S. K.; MONFORT S. L.; SOUTHERS J.; WILDT, D. E. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (Papio cynocephalus cynocephalus) faeces. **Journal of Reproduction and Fertility,** Oklahoma, v. 101, p. 213–220, 1994.

WATERMAN, J. M. The social organization of the cape groud squirrel (xenus inauris; Rodentia: Sciuridae). **Ethology**, v. 101, p. 130-147, 1995.

WEIR, B. J.; ROWLANDS, I. W. Reproductive strategies of mammals. **Annual Review of Ecology and Systematics,** v. 4, p. 139-163, 1973.

WEIR, B. J.; ROWLANDS, I. W. Functional anatomy of histricomorph ovary**. Symposium of Zoological Society of London**, London, v. 34, p. 303-332, 1974.

WILDT, D. E.; SEAGER, S. W. J.; CHAKRABORTY, P. K. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and serum luteinizing hormone in the cat. **Endocrinology Society**, Chevy Chase, p.1212-1217, 1980.

WILDT, D. E.; CHAN, S. Y. W.; SEAGER, S. W. J.; CHAKRABORTY, P. K. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I- Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 25, p.15-28, 1981.

WRIGHT, T. C; COX, J. T; MASSAD, S.; TWIGGS, L. B.; WILKINSON, E. J. Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Cytological Abnormalities. **Journal of the American Medical Association**, v. 287, p. 2120-2129, 2002.

ZIEGLER, T. E.; SHOLL, S. A.; SCHEFFLER, G.; HAGGERTY, M. A.; LASLEY, B. L. Excretion of estrone, estradiol, and progesterone in urine and feces of the female cottontop tamarin (Saguinus oedipus oedipus). **American Journal of Primatology**, New York, v. 17, p. 185-195, 1989.

ZIEGLER, T. E.; WITTWER, D. J. Fecal steroid research in the field and laboratory: Improved methods for storage, transport, processing and analysis. **American Journal of Primatology**, New York, v. 67, p. 159-174, 2005.

APÊNDICE

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2009

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Raul José da Silva Girio
Digníssimo Diretor da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP.
Prezado Professor

Cumpre-nos informar a Vossa Senhoria que a solicitação da Profa. Josefina Maria Illera del Portal colocada ao item 7 da segunda estância da correspondência expedida ao digníssimo Reitor da UNESP, Professor Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald; ao Digníssimo Diretor Científico da FAPESP, Senhor Carlos Henrique de Brito Cruz; ao Digníssimo Coordenador do Curso de Pós Graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV-UNESP, Professor Dr. Newton Nunes; bem como a Vossa Senhoria, todas em anexo, foi cumprida e pode ser verificada na Dissertação de Mestrado de nossa orientada Ana Carolina Gonçalves dos Reis, que ao ser depositada na biblioteca da FCAV-UNESP, passa a ser de domínio público e pode ser consultada por quem possa interessar.

Nesta oportunidade, solicitamos a Vossa Senhoria se digne dirigir nossos sinceros pedidos de desculpas ao Professor Dr. Joaquin Goyache Goñi, Digníssimo Decano da Faculdade de Veterinária da Universidade Complutense de Madri e ao Professor Dr. Juan Carlos Illera Del Portal, Digníssimo Diretor do Departamento de Fisiologia (Fisiologia Animal) da Universidade Complutense de Madri, informando-os de que em nenhum momento em que estivemos na Universidade Complutense de Madri, tanto nossa orientada Ana Carolina Gonçalves dos Reis, quanto eu, Professora Dra. Márcia Rita Fernandes Machado, tivemos qualquer intenção de ofender, desacatar ou afrontar qualquer pessoa desta Instituição, principalmente a Profa. Gema Silván Granado e Profa. Josefina Maria Illera Del Portal. Solicitamos também que este ato, o qual consideramos um triste episódio de mal-entendido, não prejudique nenhum colega ou aluno da nossa Universidade.

Dessa forma, solicitamos que seja comunicado à Profa. Josefina Maria Illera Del Portal, por intermédio do Professor Dr. Joaquin Goyache Goñi, Digníssimo Decano da Faculdade de Veterinária da Universidade Complutense de Madri e do Professor Dr. Juan Carlos Illera Del Portal, Digníssimo Diretor do Departamento de Fisiologia (Fisiologia Animal) da Universidade Complutense de Madrid, que para evitar qualquer problema futuro, aborrecimento ou prejuízo financeiro, a partir deste momento eu, Professora Dr. Márcia Rita Fernandes Machado, me desvinculo e desligo de qualquer trabalho ou pesquisa em conjunto com a Digníssima

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

Professora Josefina Maria Illera Del Portal, inclusive os relacionados com os animais do plantel de pacas (*Agouti paca*, L. 1966) da FCAV-UNESP, ato este que também se estende à Profa. Dr. Maria Angélica Miglino, da FMVZ – USP, que intermediou nosso vinculo com os Docentes Departamento de Fisiologia (Fisiologia Animal) da Universidade Complutense de Madrid (vide correspondencias anexas) no intutuito de se evitar qualquer problema e complicaçãoes à referida docente, pela qual temos grande apreço.

Solicitamos ainda que todo e qualquer material que deixamos no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia (Fisiologia Animal) da Universidade Complutense de Madri seja destruído, uma vez que a propria Professora Maria Illera descreve no item 5 da segundo estancia de sua correspondencia (em anexo) que não se obtiveram resultados adequados.

Finalmente, diante de todas as providencias tomadas, principalmente sobre a não apresentação a não utilização de qualquer resultado proveniente do Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia (Fisiologia Animal) da Universidade Complutense de Madri, na dissertação de mestrado de nossa orientada Ana Carolina Gonçalves dos Reis, reiteramos nossos pedidos de desculpas à esta Instituição e entendemos que esse desagradavel assunto esteja definitivamente encerrado.

Atenciosamente

Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado

Prof. Dr. Josefina María Illera
Departamento de Fisiología
Telf. 34-91-394-3863
Fax. 34-91-394-3864
correo electrónico:millerd@vet.ucm.es

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Ciudad Universitaria
28040 Madrid

Excelentisimo y Magnífico Sr. Rector Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald –

Me dirijo a Vd. para explicarle los motivos por los que nos hemos visto obligados a interrumpir la estancia de investigación de Ana Carolina Gonzalves Reis, estudiante de postgrado de la (FCAV-UNESP), estancia que se encontraba realizando en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Ana Carolina Gonzalves Reis fue invitada a realizar dos estancias de investigación en nuestro Departamento con el fin de completar la parte experimental de su Tesina de Maestrazgo. Esta invitación se curso gracias a la relación que mantenemos con la Profesora María Angelica Miglino del Departamento de Medicina y Cirugía de la Universidad de Sao Paulo, con la que llevamos colaborando varios años. La Profesora Miglino nos presento a la tutora de Ana Carolina, la Profesora Marcia Rita Fernandes, en una visita que hicimos los profesores Illera (Juan Carlos, Director de nuestro departamento, y yo misma Josefina, Profesora Titular del Departamento de Fisiologia)a la FCAV-UNESP. En esa visita se planteo una colaboración entre la Profesora Marcia Rita Fernandes y nuestro Departamento, con el fin de que Ana Carolina Gonzalves Reis pudiera completar su Tesina de Maestrazgo.

Pasamos a continuación a resumir los hechos acontecidos durante las dos estancias:

1ª Estancia. Tuvo lugar durante el mes de septiembre de 2007.

1. Ana Carolina vino a Madrid el 31 de agosto de 2007, (10 días antes de lo acordado), sin tener noticias nosotros de ello e intento incorporarse al departamento una semana antes de lo acordado. No habiendo nadie para recibirla en ese momento.

2. Incumplió el protocolo de recogida de muestras que se le había propuesto en Brasil, trayendo a Madrid muestras con las que era imposible poder obtener resultados coherentes, por lo que estas muestras no valían para nada, y por tanto, su estancia en el Departamento deberia haber finalizado en ese momento.

3. El protocolo decía que debía recoger muestras de heces todos los días y una vez a la semana sangre en un grupo de hembras de Agouti Paca, durante dos ciclos estrales completos. A Madrid debería traer las muestras solo de dos hembras durante los dos ciclos estrales, con el fin de validar la técnica de análisis hormonal y determinar los perfiles hormonales en esta animal. A España trajo muestras de varios animales al azar ningún ciclo completo y ni una muestra de sangre.

4. Al preguntarle por qué no había seguido el protocolo, dijo que "alguien de su Universidad le había aconsejado no traer muestras de las que se pudieran sacar resultados, por si estos resultados fueran publicados posteriormente sin incluirla a ella entre los autores de la publicación".

5. Como Vds pueden entender, esa ofensa jamás la habíamos escuchado y la Directora del Laboratorio de Endocrinología la Prof. Gema Silvan, propuso interrumpir la estancia en ese momento, poniendo yo conocimiento de su Tutora los hechos que habían acontecido.

6. En una reunión entre la Directora del Laboratorio, el Director del Departamento y yo misma, se acordó no expulsarla en ese momento, debido a los compromisos y a la amistad que nos une a la Prof. Maria Angelica Miglino de

la USP. Por ello, Ana Carolina completo el mes de estancia en el Laboratorio de Endocrinología, en el cual se le proporciono la formación suficiente para que ella, posteriormente en Brasil, pudiese realizar las determinaciones hormonales.

7. Para evitar disparidad en los resultados, fue rediseñado el protocolo de experimentación y fue invitada de nuevo a realizar una segunda estancia de investigación en el año 2008, una vez completado el periodo de recogida de muestras.

2ª Estancia. Iniciada durante el mes de octubre de 2008. Durante esta estancia Ana Carolina vino acompañada por su tutora la Prof. Marcia Rita Fernades FCAV-de la UNESP.

1. Aparentemente las muestras de heces estaban bien tomadas, y por lo tanto se podía completar la parte experimental de la Tesina.
2. Se comenzó realizando el trabajo que se debía haber hecho el año anterior. Sin embargo los resultados no parecían ser concluyentes.
3. Nuevamente descubrimos que, sin conocimiento de nadie (ni de su Tutora ni nuestro), había incumplido el protocolo experimental, entre otras cosas, no traía ninguna muestra de sangre y había retirado los machos de la proximidad de las hembras. Por lo tanto, nuevamente, se había invertido bastante tiempo y mucho dinero para no obtener absolutamente nada.
4. Al no obtenerse resultados y comprobarse de nuevo el incumplimiento del protocolo experimental, se le recordó a Ana Carolina los acontecimientos que habían sucedido en la primera estancia y ella, no sólo no se disculpó, sino que negó ser ella la causante, dando a entender que la Directora del Laboratorio había mentido y que, probablemente, todo era debido a un problema de idioma, es decir un simple malentendido. Esta discusión tuvo lugar en presencia de su Tutora, de la Directora del Laboratorio y de mi misma, pero fue escuchada por el resto del personal del Departamento.
5. A la vista de la actitud inaceptable de esta estudiante, la Directora del Laboratorio exigió la expulsión del mismo, por haberla calificado de "Mentirosa" delante de todo el personal del Departamento.
6. La Tutora intercedió por ella y prometió que al llegar a Brasil hablaría con ella, aquí simplemente le indicó que no volviera al Laboratorio.
7. Se adquirió con la Tutora el compromiso de analizar las muestras que faltaban, siempre y cuando, estos resultados no fuesen utilizados para la Tesina de esta estudiante.

Como puede Vd comprender, el comportamiento de Ana Carolina Gonzalves Reis, estudiante de su Universidad, ha sido completamente inadmisible. Nosotros llevamos recibiendo y formando estudiantes, profesores e investigadores de todo el mundo y **nunca** nos había pasado una cosa semejante, por lo que en el futuro nos pensaremos mucho, volver a admitir en nuestro Departamento a ningún estudiante de la FCAV-de la UNESP, por no mencionar la pérdida de tiempo en la formación de esta estudiante, más los gastos que las estancias han originado (1.548 muestras total= 8.000,00 Euros), que han sido financiados a cargo de los presupuestos de nuestro Departamento (compromiso que adquirimos en nuestra visita a FCAV-UNESP).

Por último queremos añadir, que nosotros no hemos firmado ningún documento que acredite la estancia de Ana Carolina Gonzalves Reis durante el mes de octubre de 2008.

Atentamente

Fdo: Josefina María Illera del Portal

Encaminhe-se a AREX.
10/02/09

Carlos Antonio Gamero
Chefe de Gabinete

UNESP - AREX
Recebido em 10/2/09
As RG

Informamos que a UNESP não possui Acordo de Cooperação com a Universidade Complutense de Madrid

Encaminhe-se à Diretoria da FCAVJ para conhecimento e eventuais providências

São Paulo 12/02/09
Izabel Cristina Takitane

Izabel Cristina Takitane
Assessora
Assessoria de Relações Externas

Diretoria

Tendo em vista a informação apresentada pela AREX, temos a relatar:
1) Oficialmente a FCAV não deve ser envolvida em um problema meramente interpessoal e não institucional.
2) As questões levantadas pela Profª Josefina Bortoli, devem ser resolvidas pelas de forma mais sensata possível.
3) O Programa de Pós-Graduação da qual a aluna Ana Carolina está vinculada, também recebeu tal documento, e devido a isso a coordenação deve ser comunicada oficialmente, como está sendo resolvido os conduzidos os problemas levantados.
4) Esta Diretoria lamenta o ocorrido e se coloca à disposição para ajudar.

Pelo exposto, encaminhe-se a Profª Márcia Rita Fernandes, Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal, p/a ciência e providências apontadas.

16.02.09

RECEBI DA Diretoria
Encaminhe-se a Profª Márcia R. Fernandes
16 FEV 2009
UNESP - CAMPUS DE JABOTICABAL
Seção de Comunicações

Neusa A. Severa
Supervisor de Seção

Proc. 2006/59247-1

Prof. Dr. Josefina María Illera
Departamento de Fisiología
Telf. 34-91-394-3863
Fax. 34-91-394-3864
correo electrónico:mjillera@vet.ucm.es

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Ciudad Universitaria
28040 Madrid

MS

Fapesp
Gabinete do Diretor Científico
Recebido em 02/02/09
Marcia
Visto

Excelentisimo Sr. Diretor Científico da Fapesp -

Me dirijo a Vd. para explicarle los motivos por los que nos hemos visto obligados a interrumpir la estancia de investigación de Ana Carolina Gonzalves Reis, estudiante de postgrado de la (FCAV-UNESP), estancia que se encontraba realizando en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Ana Carolina Gonzalves Reis fue invitada a realizar dos estancias de investigación en nuestro Departamento con el fin de completar la parte experimental de su Tesina de Maestrazgo. Esta invitación se curso gracias a la relación que mantenemos con la Profesora María Angelica Miglino del Departamento de Medicina y Cirugía de la Universidad de Sao Paulo, con la que llevamos colaborando varios años. La Profesora Miglino nos presento a la tutora de Ana Carolina, la Profesora Marcia Rita Fernandes, en una visita que hicimos los profesores Illera (Juan Carlos, Director de nuestro departamento, y yo misma Josefina, Profesora Titular del Departamento de Fisiologia)a la FCAV-UNESP. En esa visita se planteo una colaboración entre la Profesora Marcia Rita Fernandes y nuestro Departamento, con el fin de que Ana Carolina Gonzalves Reis pudiera completar su Tesina de Maestrazgo.

Pasamos a continuación a resumir los hechos acontecidos durante las dos estancias:

1ª Estancia. Tuvo lugar durante el mes de septiembre de 2007.

1. Ana Carolina vino a Madrid el 31 de agosto de 2007, (10 días antes de lo acordado), sin tener noticias nosotros de ello e intento incorporarse al departamento una semana antes de lo acordado. No habiendo nadie para recibirla en ese momento.

2. Incumplió el protocolo de recogida de muestras que se le había propuesto en Brasil, trayendo a Madrid muestras con las que era imposible poder obtener resultados coherentes, por lo que estas muestras no valían para nada, y por tanto, su estancia en el Departamento debería haber finalizado en ese momento.

3. El protocolo decía que debía recoger muestras de heces todos los días y una vez a la semana sangre en un grupo de hembras de Agouti Paca, durante dos ciclos estrales completos. A Madrid debería traer las muestras solo de dos hembras durante los dos ciclos estrales, con el fin de validar la técnica de análisis hormonal y determinar los perfiles hormonales en esta animal. A España trajo muestras de varios animales al azar ningún ciclo completo y ni una muestra de sangre.

4. Al preguntarle por qué no había seguido el protocolo, dijo que "alguien de su Universidad le había aconsejado no traer muestras de las que se pudieran sacar resultados, por si estos resultados fueran publicados posteriormente sin incluirla a ella entre los autores de la publicación".

5. Como Vds pueden entender, esa ofensa jamás la habíamos escuchado y la Directora del Laboratorio de Endocrinología la Prof. Gema Silvan, propuso interrumpir la estancia en ese momento, poniendo yo conocimiento de su Tutora los hechos que habían acontecido.

6. En una reunión entre la Directora del Laboratorio, el Director del Departamento y yo misma, se acordó no expulsarla en ese momento, debido a los compromisos y a la amistad que nos une a la Prof. Maria Angelica Miglino de la USP. Por ello, Ana Carolina completo el mes de estancia en el Laboratorio de Endocrinología, en el cual se le proporciono la formación suficiente para que ella, posteriormente en Brasil, pudiese realizar las determinaciones hormonales.

7. Para evitar disparidad en los resultados, fue rediseñado el protocolo de experimentación y fue invitada de nuevo a realizar una segunda estancia de investigación en el año 2008, una vez completado el periodo de recogida de muestras.

2ª Estancia. Iniciada durante el mes de octubre de 2008. Durante esta estancia Ana Carolina vino acompañada por su Tutora la Prof. Marcia Rita Fernades FCAV-de la UNESP.

1. Aparentemente las muestras de heces estaban bien tomadas, y por lo tanto se podía completar la parte experimental de la Tesina.
2. Se comenzó realizando el trabajo que se debía haber hecho el año anterior. Sin embargo los resultados no parecían ser concluyentes.
3. Nuevamente descubrimos que, sin conocimiento de nadie (ni de su Tutora ni nuestro), había incumplido el protocolo experimental, entre otras cosas, no traía ninguna muestra de sangre y había retirado los machos de la proximidad de las hembras. Por lo tanto, nuevamente, se había invertido bastante tiempo y mucho dinero para no obtener absolutamente nada.
4. Al no obtenerse resultados y comprobarse de nuevo el incumplimiento del protocolo experimental, se le recordó a Ana Carolina los acontecimientos que habían sucedido en la primera estancia y ella, no sólo no se disculpó, sino que negó ser ella la causante, dando a entender que la Directora del Laboratorio había mentido y que, probablemente, todo era debido a un problema de idioma, es decir un simple malentendido. Esta discusión tuvo lugar en presencia de su Tutora, de la Directora del Laboratorio y de mi misma, pero fue escuchada por el resto del personal del Departamento.
5. A la vista de la actitud inaceptable de esta estudiante, la Directora del Laboratorio exigió la expulsión del mismo, por haberla calificado de "Mentirosa" delante de todo el personal del Departamento.
6. La Tutora intercedió por ella y prometió que al llegar a Brasil hablaría con ella, aquí simplemente le indicó que no volviera al Laboratorio.
7. Se adquirió con la Tutora el compromiso de analizar las muestras que faltaban, siempre y cuando, estos resultados no fuesen utilizados para la Tesina de esta estudiante.

Como puede Vd comprender, el comportamiento de Ana Carolina Gonzalves Reis, estudiante de su Universidad, ha sido completamente inadmisible. Nosotros llevamos recibiendo y formando estudiantes, profesores e investigadores de todo el mundo y **nunca** nos había pasado una cosa semejante, por lo que en el futuro nos pensaremos mucho, volver a admitir en nuestro Departamento a ningún estudiante de la FCAV-de la UNESP, por no mencionar la pérdida de tiempo en la formación de esta estudiante, más los gastos que las estancias han originado (1.548 muestras total= 8.000,00 Euros), que han sido financiados a cargo de los presupuestos de nuestro Departamento (compromiso que adquirimos en nuestra visita a FCAV-UNESP).

Por último queremos añadir, que nosotros no hemos firmado ningún documento que acredite la estancia de Ana Carolina Gonzalves Reis durante el mes de octubre de 2008.

Atentamente

Fdo: Josefina Maria Illera del Portal

Prof. Dr. Josefina María Illera
Departamento de Fisiología
Telf. 34-91-394-3863
Fax. 34-91-394-3864
correo electrónico:mjillera@vet.ucm.es

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Ciudad Universitaria
28040 Madrid

Encaminhe-se a Profª Marcia Fernandes, Depto Morfologia e Fisiologia Animal, p/a conhecimento 03.02.09

Excelentisimo Sr. Prof. Dr. Raul José Silva Girino

Me dirijo a Vd. para explicarle los motivos por los que nos hemos visto obligados a interrumpir la estancia de investigación de Ana Carolina Gonzalves Reis, estudiante de postgrado de la (FCAV-UNESP), estancia que se encontraba realizando en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Ana Carolina Gonzalves Reis fue invitada a realizar dos estancias de investigación en nuestro Departamento con el fin de completar la parte experimental de su Tesina de Maestrazgo. Esta invitación se curso gracias a la relación que mantenemos con la Profesora Maria Angelica Miglino del Departamento de Medicina y Cirugia de la Universidad de Sao Paulo, con la que llevamos colaborando varios años. La Profesora Miglino nos presento a la tutora de Ana Carolina, la Profesora Marcia Rita Fernandes, en una visita que hicimos los profesores Illera (Juan Carlos, Director de nuestro departamento, y yo misma Josefina, Profesora Titular del Departamento de Fisiologia)a la FCAV-UNESP. En esa visita se planteo una colaboración entre la Profesora Marcia Rita Fernandes y nuestro Departamento, con el fin de que Ana Carolina Gonzalves Reis pudiera completar su Tesina de Maestrazgo.

Pasamos a continuación a resumir los hechos acontecidos durante las dos estancias:

1ª Estancia. Tuvo lugar durante el mes de septiembre de 2007.

1. Ana Carolina vino a Madrid el 31 de agosto de 2007, (10 días antes de lo acordado), sin tener noticias nosotros de ello e intento incorporarse al departamento una semana antes de lo acordado. No habiendo nadie para recibirla en ese momento.

2. Incumplió el protocolo de recogida de muestras que se le había propuesto en Brasil, trayendo a Madrid muestras con las que era imposible poder obtener resultados coherentes, por lo que estas muestras no valían para nada, y por tanto, su estancia en el Departamento debería haber finalizado en ese momento.

3. El protocolo decía que debía recoger muestras de heces todos los días y una vez a la semana sangre en un grupo de hembras de Agouti Paca, durante dos ciclos estrales completos. A Madrid debería traer las muestras solo de dos hembras durante los dos ciclos estrales, con el fin de validar la técnica de análisis hormonal y determinar los perfiles hormonales en esta animal. A España trajo muestras de varios animales al azar ningún ciclo completo y ni una muestra de sangre.

4. Al preguntarle por qué no había seguido el protocolo, dijo que "alguien de su Universidad le había aconsejado no traer muestras de las que se pudieran sacar resultados, por si estos resultados fueran publicados posteriormente sin incluirla a ella entre los autores de la publicación".

5. Como Vds pueden entender, esa ofensa jamás la habíamos escuchado y la Directora del Laboratorio de Endocrinología la Prof. Gema Silvan, propuso interrumpir la estancia en ese momento, poniendo yo conocimiento de su Tutora los hechos que habían acontecido.

6. En una reunión entre la Directora del Laboratorio, el Director del Departamento y yo misma, se acordó no expulsarla en ese momento, debido a los compromisos y a la amistad que nos une a la Prof. Maria Angelica Miglino de

la USP. Por ello, Ana Carolina completo el mes de estancia en el Laboratorio de Endocrinología, en el cual se le proporciono la formación suficiente para que ella, posteriormente en Brasil, pudiese realizar las determinaciones hormonales.

7. Para evitar disparidad en los resultados, fue rediseñado el protocolo de experimentación y fue invitada de nuevo a realizar una segunda estancia de investigación en el año 2008, una vez completado el periodo de recogida de muestras.

2ª Estancia. Iniciada durante el mes de octubre de 2008. Durante esta estancia Ana Carolina vino acompañada por su tutora la Prof. Marcia Rita Fernades FCAV-de la UNESP.

1. Aparentemente las muestras de heces estaban bien tomadas, y por lo tanto se podía completar la parte experimental de la Tesina.
2. Se comenzó realizando el trabajo que se debía haber hecho el año anterior. Sin embargo los resultados no parecían ser concluyentes.
3. Nuevamente descubrimos que, sin conocimiento de nadie (ni de su Tutora ni nuestro), había incumplido el protocolo experimental, entre otras cosas, no traía ninguna muestra de sangre y había retirado los machos de la proximidad de las hembras. Por lo tanto, nuevamente, se había invertido bastante tiempo y mucho dinero para no obtener absolutamente nada.
4. Al no obtenerse resultados y comprobarse de nuevo el incumplimiento del protocolo experimental, se le recordó a Ana Carolina los acontecimientos que habían sucedido en la primera estancia y ella, no sólo no se disculpó, sino que negó ser ella la causante, dando a entender que la Directora del Laboratorio había mentido y que, probablemente, todo era debido a un problema de idioma, es decir un simple malentendido. Esta discusión tuvo lugar en presencia de su Tutora, de la Directora del Laboratorio y de mi misma, pero fue escuchada por el resto del personal del Departamento.
5. A la vista de la actitud inaceptable de esta estudiante, la Directora del Laboratorio exigió la expulsión del mismo, por haberla calificado de "Mentirosa" delante de todo el personal del Departamento.
6. La Tutora intercedió por ella y prometió que al llegar a Brasil hablaría con ella, aquí simplemente le indicó que no volviera al Laboratorio.
7. Se adquirió con la Tutora el compromiso de analizar las muestras que faltaban, siempre y cuando, estos resultados no fuesen utilizados para la Tesina de esta estudiante.

Como puede Vd comprender, el comportamiento de Ana Carolina Gonzalves Reis, estudiante de su Universidad, ha sido completamente inadmisible. Nosotros llevamos recibiendo y formando estudiantes, profesores e investigadores de todo el mundo y **nunca** nos había pasado una cosa semejante, por lo que en el futuro nos pensaremos mucho, volver a admitir en nuestro Departamento a ningún estudiante de la FCAV-de la UNESP, por no mencionar la pérdida de tiempo en la formación de esta estudiante, más los gastos que las estancias han originado (1.548 muestras total= 8.000,00 Euros), que han sido financiados a cargo de los presupuestos de nuestro Departamento (compromiso que adquirimos en nuestra visita a FCAV-UNESP).

Por último queremos añadir, que nosotros no hemos firmado ningún documento que acredite la estancia de Ana Carolina Gonzalves Reis durante el mes de octubre de 2008.

Atentamente

Fdo: Josefina Maria Illera del Portal

Prof. Dr. Josefina María Illera
Departamento de Fisiología
Telf. 34-91-394-3863
Fax. 34-91-394-3864
correo electrónico:mjillerd@vet.ucm.es

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Ciudad Universitaria
28040 Madrid

Excelentisimo Prof . Newton Nunes, Coordinador do Curso de Pos Graduacao

Me dirijo a Vd. para explicarle los motivos por los que nos hemos visto obligados a interrumpir la estancia de investigación de Ana Carolina Gonzalves Reis, estudiante de postgrado de la (FCAV-UNESP), estancia que se encontraba realizando en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Ana Carolina Gonzalves Reis fue invitada a realizar dos estancias de investigación en nuestro Departamento con el fin de completar la parte experimental de su Tesina de Maestrazgo. Esta invitación se curso gracias a la relación que mantenemos con la Profesora Maria Angelica Miglino del Departamento de Medicina y Cirugía de la Universidad de Sao Paulo, con la que llevamos colaborando varios años. La Profesora Miglino nos presento a la tutora de Ana Carolina, la Profesora Marcia Rita Fernandes, en una visita que hicimos los profesores Illera (Juan Carlos, Director de nuestro departamento, y yo misma Josefina, Profesora Titular del Departamento de Fisiología)a la FCAV-UNESP. En esa visita se planteo una colaboración entre la Profesora Marcia Rita Fernandes y nuestro Departamento, con el fin de que Ana Carolina Gonzalves Reis pudiera completar su Tesina de Maestrazgo.

Pasamos a continuación a resumir los hechos acontecidos durante las dos estancias:

1ª Estancia. Tuvo lugar durante el mes de septiembre de 2007.

1. Ana Carolina vino a Madrid el 31 de agosto de 2007, (10 días antes de lo acordado), sin tener noticias nosotros de ello e intento incorporarse al departamento una semana antes de lo acordado. No habiendo nadie para recibirla en ese momento.

2. Incumplió el protocolo de recogida de muestras que se le había propuesto en Brasil, trayendo a Madrid muestras con las que era imposible poder obtener resultados coherentes, por lo que estas muestras no valían para nada, y por tanto, su estancia en el Departamento debería haber finalizado en ese momento.

3. El protocolo decía que debía recoger muestras de heces todos los días y una vez a la semana sangre en un grupo de hembras de Agouti Paca, durante dos ciclos estrales completos. A Madrid debería traer las muestras solo de dos hembras durante los dos ciclos estrales, con el fin de validar la técnica de análisis hormonal y determinar los perfiles hormonales en esta animal. A España trajo muestras de varios animales al azar ningún ciclo completo y ni una muestra de sangre.

4. Al preguntarle por qué no había seguido el protocolo, dijo que "alguien de su Universidad le había aconsejado no traer muestras de las que se pudieran sacar resultados, por si estos resultados fueran publicados posteriormente sin incluirla a ella entre los autores de la publicación".

5. Como Vds pueden entender, esa ofensa jamás la habíamos escuchado y la Directora del Laboratorio de Endocrinología la Prof. Gema Silvan, propuso interrumpir la estancia en ese momento, poniendo yo conocimiento de su Tutora los hechos que habían acontecido.

6. En una reunión entre la Directora del Laboratorio, el Director del Departamento y yo misma, se acordó no expulsarla en ese momento, debido a los compromisos y a la amistad que nos une a la Prof. Maria Angelica Miglino de la USP. Por ello, Ana Carolina completo el mes de estancia en el Laboratorio de Endocrinología, en el cual se le proporciono la formación suficiente para que ella, posteriormente en Brasil, pudiese realizar las determinaciones hormonales.

7. Para evitar disparidad en los resultados, fue rediseñado el protocolo de experimentación y fue invitada de nuevo a realizar una segunda estancia de investigación en el año 2008, una vez completado el periodo de recogida de muestras.

2ª Estancia. Iniciada durante el mes de octubre de 2008. Durante esta estancia Ana Carolina vino acompañada por su Tutora la Prof. Marcia Rita Fernades FCAV-de la UNESP.

1. Aparentemente las muestras de heces estaban bien tomadas, y por lo tanto se podía completar la parte experimental de la Tesina.
2. Se comenzó realizando el trabajo que se debía haber hecho el año anterior. Sin embargo los resultados no parecian ser concluyentes.
3. Nuevamente descubrimos que, sin conocimiento de nadie (ni de su Tutora ni nuestro), había incumplido el protocolo experimental, entre otras cosas, no traía ninguna muestra de sangre y había retirado los machos de la proximidad de las hembras. Por lo tanto, nuevamente, se había invertido bastante tiempo y mucho dinero para no obtener absolutamente nada.
4. Al no obtenerse resultados y comprobarse de nuevo el incumplimiento del protocolo experimental, se le recordó a Ana Carolina los acontecimientos que habían sucedido en la primera estancia y ella, no sólo no se disculpó, sino que negó ser ella la causante, dando a entender que la Directora del Laboratorio había mentido y que, probablemente, todo era debido a un problema de idioma, es decir un simple malentendido. Esta discusión tuvo lugar en presencia de su Tutora, de la Directora del Laboratorio y de mi misma, pero fue escuchada por el resto del personal del Departamento.
5. A la vista de la actitud inaceptable de esta estudiante, la Directora del Laboratorio exigió la expulsión del mismo, por haberla calificado de "Mentirosa" delante de todo el personal del Departamento.
6. La Tutora intercedió por ella y prometió que al llegar a Brasil hablaría con ella, aquí simplemente le indicó que no volviera al Laboratorio.
7. Se adquirió con la Tutora el compromiso de analizar las muestras que faltaban, siempre y cuando, estos resultados no fuesen utilizados para la Tesina de esta estudiante.

Como puede Vd comprender, el comportamiento de Ana Carolina Reis dos Santos, estudiante de su Universidad, ha sido completamente inadmisible. Nosotros llevamos recibiendo y formando estudiantes, profesores e investigadores de todo el mundo y **nunca** nos había pasado una cosa semejante, por lo que en el futuro nos pensaremos mucho, volver a admitir en nuestro Departamento a ningún estudiante de la FCAV-de la UNESP, por no mencionar la pérdida de tiempo en la formación de esta estudiante, más los gastos que las estancias han originado (1.548 muestras total= 8.000,00 Euros), que han sido financiados a cargo de los presupuestos de nuestro Departamento (compromiso que adquirimos en nuestra visita a FCAV-UNESP).

Por último queremos añadir, que nosotros no hemos firmado ningún documento que acredite la estancia de Ana Carolina Gonzalves Reis durante el mes de octubre de 2008.

Atentamente

Fdo: Josefina Maria Illera del Portal