

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

**PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM VEADO-
CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)**

Eveline dos Santos Zanetti
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2009

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

**PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM VEADO-
CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)**

Eveline dos Santos Zanetti

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2009

Zanetti, Eveline dos Santos
Z28p Protocolos de superovulação em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) / Eveline dos Santos Zanetti. – – Jaboticabal, 2009
 xxiii, 87 f. : il. ; 28 cm

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
 Orientador: José Maurício Barbanti Duarte
 Banca examinadora: Pietro Sampaio Baruselli, Marcelo Alcindo
de Barros Vaz Guimarães, Ciro Moraes Barros, Paulo Henrique
Franceschini
 Bibliografia

 1. Superovulação. 2. *Mazama gouazoubira*. 3. Progesterona
fecal. 4. Veado-catingueiro. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

 CDU 619:612.6:639.111.1

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



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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*).

AUTORA: EVELINE DOS SANTOS ZANETTI

ORIENTADOR: Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

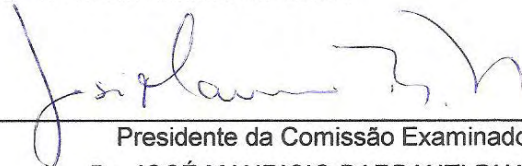

Dr. PIETRO SAMPAIO BARUSELLI

Dr. MARCELO ALCINDO DE BARROS VAZ GUIMARÃES


Dr. CIRO MORAES BARROS


Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI

Data da realização: 17 de novembro de 2009.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EVELINE DOS SANTOS ZANETTI – Nascida em 15 de julho de 1976, na cidade de Batatais, SP, Brasil, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Dr. Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, em março de 1996; foi bolsista do Programa Especial de Treinamento – Grupo PET / CAPES, de agosto de 1996 a março de 1998, tendo permanecido neste programa como voluntária até junho de 2000; obteve bolsa de iniciação científica do CNPq, junto ao Departamento de Patologia Veterinária, sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi, de abril de 1998 a março de 1999; concluindo o curso superior em Medicina Veterinária em janeiro de 2001. Em junho do mesmo ano ingressou no curso de especialização em Homeopatia Veterinária, no Instituto François Lamasson, em Ribeirão Preto, concluindo-o em junho de 2004. Trabalhou com atendimento clínico e cirúrgico de pequenos animais e animais selvagens, de março de 2001 a março de 2004; quando ingressou no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Universidade Estadual Paulista “Dr. Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Concluiu a dissertação de mestrado, com o tema “Comparação entre dois protocolos para a sincronização do estro em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)”, no ano de 2006. Neste mesmo ano, ingressou no curso de doutorado, no mesmo programa e na mesma unidade, sob a orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte.

“...Agora o que desejo é que você aprenda a dançar. Lição de Zaratustra, que dizia que para se aprender a pensar é preciso primeiro aprender a dançar. Quem dança com as idéias descobre que pensar é alegria. Se pensar lhe dá tristeza e porque você só sabe marchar, como soldados em ordem unida. Saltar sobre o vazio, pular de pico em pico. Não ter medo da queda. Foi assim que se construiu a ciência: não pela prudência dos que marcham, mas pela ousadia dos que sonham. Todo conhecimento começa com o sonho. O conhecimento nada mais é que a aventura pelo mar desconhecido, em busca da terra sonhada. Mas sonhar é coisa que não se ensina. Brota das profundezas do corpo, como a água brota das profundezas da terra. Como Mestre só posso então lhe dizer uma coisa: “Conte-me os seus sonhos, para que sonhemos juntos!”

‘A alegria de ensinar’ – Rubem Alves

*D*edico

*Aos meus pais,
José Henrique e Estela Marina,
e às minhas irmãs,
Aline, Nara e Thais,
por todo o apoio, amor incondicional,
dedicação, incentivo, exemplos de retidão diante da vida
e estrutura que sempre me permitiu sonhar...*

e

*À duas pessoas amadas que
deixaram marcas especiais em minha vida:
minha avó Odila,
pelos exemplos de amor e serenidade;
meu avô Basileu,
pelos exemplos de amor e respeito aos animais e à natureza.*

Ofereço

*Ao amigo e namorado César,
pelo companheirismo nas horas de trabalho e lazer,
pelo exemplo de dedicação e
por saber compreender a minha ausência em diversos momentos.*

e

*Aos animais,
que sem nenhuma escolha,
'oferecem' suas vidas aos nossos estudos.*

AGRADECIMENTOS

*“Devemos agradecer às pessoas que nos fazem felizes...
São elas os jardineiros encantadores que fazem nossas almas florescerem.”*
Marcel Proust

Ao **Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte**, pelos ensinamentos e orientação, por todas as oportunidades durante estes anos, pela confiança, pela permanente disponibilidade em auxiliar, pelo idealismo que nos incentiva, pelos exemplos de talento e competência em tudo o que se propõe a fazer.

Ao **Prof. Dr. Ciro Moraes de Barros**, pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos na fase inicial do projeto.

Ao **Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira**, pela disponibilidade e auxílio estatístico.

Aos professores **Dr. César Roberto Éssper**, **Dr. Joaquim Mansano Garcia** e **Dr. Paulo Henrique Franceschini**, pelo início da minha formação na reprodução animal, ‘conselhos de vida’ e contribuições para a melhoria deste trabalho no exame geral de qualificação.

À **Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego**, pela participação na banca examinadora do exame geral de qualificação e pelas sugestões para a melhoria deste trabalho.

À médica veterinária **Marina Salles Munerato (K-stanha)**, pela indispensável ajuda durante as anestésias do experimento, por sua competência e preocupação em sempre fazer o melhor, pelo entusiasmo, troca de conhecimentos, companheirismo, convívio e amizade.

Às médicas veterinárias **Bruna Furlan Polegato (Longa)** e **Marina Suzuki Cursino (Pici)**, pelo indispensável auxílio durante as cirurgias laparoscópicas do experimento, pela disponibilidade, competência, companheirismo, convívio e amizade.

Aos médicos veterinários **Maurício Barbosa Salviano** e **Maurício Durante Christofolletti** e aos biólogos **Pedro Henrique de Farias Peres** e **Ana Maria Nievas** pelos inúmeros auxílios durante o período experimental, pela disponibilidade, companheirismo, amizade e bom-humor que torna tudo mais fácil.

Aos funcionários do Setor de Animais Silvestres, **Christina Regina Capalbo (Chris)**, **Antônio Carlos Lima de Andrade (Beterraba)** e **José Roberto Turco (Turquinho)**, pela dedicação aos animais, inúmeras contenções, auxílios durante o experimento e momentos de descontração (mesmo nas horas difíceis), pelo intenso convívio tão especial.

Ao **Prof. Dr. Antônio de Queiroz Neto** e à assistente técnica **Maria Isabel Mataqueiro** pelo uso do Laboratório de Farmacologia desta unidade para a realização das dosagens hormonais.

À **Ana Paula de Oliveira Sader** pelo uso do Laboratório de Nutrição Animal e ao **Prof. Dr. Gabriel Maurício Peruca de Melo** pelo uso do Laboratório de Biogeoquímica, ambos desta unidade, para a secagem das amostras fecais.

Aos médicos veterinários **Franco M. Poggiani** e **Pedro Paulo** e ao **Prof. Dr. Wilter Ricardo R. Vicente** pelos empréstimos dos materiais de laparoscopia nas 'horas de apuro'.

Ao médico veterinário **Dr. Gustave Decuadro-Hansen**, por todas as informações e auxílio com a técnica de colheita de embriões por laparoscopia e a médica veterinária **Dra. Érika S. C. Morani**, pelo o empréstimo dos animais para o treinamento da técnica.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de Doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro.

Ao Hospital Veterinário da FCAVJ, em especial aos funcionários da esterilização, **Sr. Isaías** e **José Carlos**, pela disponibilidade e auxílio no preparo dos instrumentais cirúrgicos.

À **Vanessa Veltrini Abril**, pela amizade construída durante todos estes anos de convivência, pelos sonhos, felicidades e angústias compartilhadas, pelo companheirismo incondicional, incentivo e almoços com assuntos ‘intermináveis’.

A **todos** os integrantes ou ex-NUPECCE, em especial ao **Alexandre Vogliotti, Alexssandro Chimello, Aline M. Bonfim, Allyson D. K. Azevedo, Ana Elisa P. Rosa, André F. Gualberto, Bruno Ferreto, Cinthia I. Aquino, Elias A. G. Carnelossi, Fernando P. Rodrigues, Francisco, Gastón Giné, Guilherme, Hermógenes A. Torres, Jacqueline C. Ferreira, Javier A. S. Perea, Juliana Pinho, Kena Ferrari, Márcio L. Oliveira, Marco Aurélio A. Perin, Natália Versiani, Natália Rossi, Paula R. Soares, Raoni T. Mirandola, Ricardo José G. Pereira, Roberta M. Crivelaro, Taína Menegasso, Tatiana D. S. Silva, Victor Krepschi, Vinícius Antunes** pelo convívio diário e alegre na ‘salinha’, amizade, incentivo, idealismo, auxílio e apoio nos momentos alegres e desafiadores.

Às minhas primeiras orientadas de iniciação científica **Samantha Mesquita Favoretto e Luciana Diniz Rola**, com quem muito aprendi sobre a desafiante tarefa de orientar, pela confiança, respeito e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia (Genética e Melhoramento Animal), **Paulo Tosta, João Boer, Carlos e Íris**, pela convivência agradável, amizade e por todo o auxílio que sempre faz uma grande diferença.

Aos amigos especiais, irmãos prá toda a vida e ‘compadres’ **Gisela Cristiane Ferraro e Mauro Henrique Bueno de Camargo**, pela solidariedade incondicional, amizade, apoio, incentivo à vida acadêmica, idealismo e por propiciarem os momentos alegres, deliciosos e inesquecíveis ao lado da pequena **Letícia**.

À pequenina **Letícia** que trouxe mais alegria e inspiração para a vida e fez com que tudo parecesse mais ameno e tranquilo.

Aos demais professores, **Profa. Dra. Vera Fernanda M. H. de Lima, Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite, Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo** e funcionários, **Roberta Vantini, Isabel Aparecida P. Ntarelli, Ivo**

Luiz A. Júnior, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pelos ensinamentos e apoio sempre que necessário.

Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, **Aracelle, Christina, Clara, Eliana, Felipe, Juliana, Mabel, Maria Emília, Marcelo, Maricy, Max, Michelly, Naiara, Rúbia, Simone, Tatiane**, pelo convívio, amizade, incentivo e troca de informações.

Aos amigos “melhoradores”, **Márcio e Leonardo**, pela alegria e convívio que torna a vida mais leve.

À **TODOS os amigos**, em especial à **Cláudia, Ana Paula, Cássia, Celso, Daniela, Daniel, Golda Meier, Joana, Júlia, Neto, Patrícia, Rafael, Renan, Samira, Taís**, pela amizade em todos os momentos, pelas alegrias, pelo companheirismo, interesse, incentivo e convívio inesquecível.

À **TODA minha família**, em especial, à **Alice, Caio, Cauê, Ester, Sérgio, Matheus, Júnior, Vanessa, Rosângela, Jackson, Diego, Jorginho, Virgínia, Júlia, Marina, André, Shaiane, Isabel, Zenriki, Margarida, Vó Beatriz, Amaury e Luzia** pelo convívio, afeto, momentos felizes, apoio indispensável e compreensão pelos momentos ausentes.

À **D. Vera e ao Sr. Júlio** pela torcida, pelo incentivo, afeto e interesse.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal**, em especial ao **Departamento de Zootecnia (Genética e Melhoramento Animal)**, ao **Setor de Animais Silvestres** e à **Pós-graduação**, pelas instalações, condições de trabalho, acolhimento e oportunidade.

APOIO FINANCEIRO

Esse projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, sob processo nº. 06/56389-0, no período de janeiro de 2007 a agosto de 2008.

O presente trabalho foi avaliado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA) desta unidade de ensino, que certificou sua conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
RESUMO.....	xx
ABSTRACT.....	xxii
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. HIPÓTESE.....	03
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
Ciclo estral e dinâmica folicular.....	06
Superovulação.....	11
Manipulação da onda folicular e sincronização do estro.....	15
Hormônios gonadotróficos exógenos.....	18
Monitoramento da ovulação e colheita de embriões.....	25
IV. MATERIAL E MÉTODO.....	28
Animais.....	28
Local e período de estudo.....	29
Período de adaptação e monitoramento do ciclo estral.....	29
Sincronização do estro e tratamento de superovulação.....	31
Identificação do estro e fertilização.....	32
Avaliação da taxa de ovulação e colheita de embriões.....	34
Colheita de fezes.....	37
Processamento das fezes.....	37
Medidas dos corpos lúteos.....	40
Tratamento de prostaglandina.....	40
Análise estatística	41
V. RESULTADOS.....	43

VI. DISCUSSÃO.....	52
VII. CONCLUSÕES.....	62
VIII. REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	Benzoato de estradiol
<i>C. elaphus</i>	<i>Cervus elaphus</i>
CIDR[®]	‘Controlled internal drug release’
CL	Corpo lúteo
<i>D. dama</i>	<i>Dama dama</i>
DP	Desvio padrão
DIP	Dispositivo intra-vaginal de progesterona
<i>E. davidianus</i>	<i>Elaphurus davidianus</i>
EN	‘Endangered’=ameaçado
EIA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
eCG	Gonadotrofina coriônica eqüina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hMG	Gonadotrofina da menopausa humana
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
LH	Hormônio luteinizante
IA	Inseminação artificial
IAIU SC	Inseminação artificial intra-uterina com sêmen congelado
IAIU sf	Inseminação artificial intra-vaginal com sêmen fresco
IAIV sc	Inseminação artificial intra-vaginal com sêmen congelado
IATF	Inseminação artificial com tempo-fixado
I.M.	Intra-muscular
LC	‘Least concern’= não sofre ameaça imediata a
<i>M. gouazoubira</i>	<i>Mazama gouazoubira</i>
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
NS	Não significativo
<i>O. virginianus</i>	<i>Odocoileus virginianus</i>

PVP	Polivinilpirrolidona
PGF_{2α}	Prostaglandina
PBS	Solução salina em tampão fosfato
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SOV	Superovulação
TE	Transferência de embriões

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolos de superovulação utilizados em cervídeos de diferentes espécies.....	12
 Tabela 2. Dados relativos ao estro e a resposta superovulatória de seis fêmeas da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> submetidas a três diferentes Tratamentos hormonais: A (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 600IU eCG D-4 + cloprostenol D0); B (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 300IU eCG D-4 + cloprostenol D0) e C (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 250IU FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0). Dados apresentados como média ($\pm$ EPM).....	44
 Tabela 3. Sequência da realização dos Tratamentos A (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 600IU eCG D-4 + cloprostenol D0); B (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 300IU eCG D-4 + cloprostenol D0) e C (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 250IU FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0) em cada uma das seis fêmeas da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> , dia do ciclo estral (dia 0 = comportamento de estro) de cada animal no dia de início dos Tratamentos e ocorrência de estro comportamental após a administração de benzoato de estradiol (BE).....	45

Tabela 4. Concentrações médias ($\pm$ EPM) de progestágenos fecais [P4] de seis fêmeas da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> , em diferentes fases de três tratamentos hormonais: A (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 600IU eCG D-4 + cloprostenol D0); B (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 300IU eCG D-4 + cloprostenol D0) e C (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 250IU FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0).....	47
--	-----------

Tabela 5. Dados relativos ao estro e a resposta superovulatória de seis fêmeas da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> submetidas a dois diferentes Tratamentos hormonais: D (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 700IU eCG D-4 + cloprostenol D0) e E (CIDR [®] por 7,5 dias + BE D-7,5 + 130mg FSH D-3 / D0,5 + cloprostenol D0). Dados apresentados como média ($\pm$ EPM).....	49
--	-----------

Tabela 6. Sequência da realização dos Tratamentos D (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 700IU eCG D-4 + cloprostenol (D0) e E (CIDR [®] por 7,5 dias + BE D-7,5 + 130mg FSH D-3 / D0,5 + cloprostenol D0) em cada uma das seis fêmeas da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> , dia do ciclo estral (dia 0 = comportamento de estro) de cada animal no dia de início dos Tratamentos e ocorrência de estro comportamental após a administração de benzoato de estradiol (BE).....	50
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar fêmea de <i>Mazama gouazoubira</i>	05
Figura 2. Cópula na espécie <i>Mazama gouazoubira</i>	30
Figura 3. Caixa de contenção onde os fármacos foram administrados na espécie <i>Mazama gouazoubira</i>	31
Figura 4. Esquema dos Tratamentos A (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 600IU eCG D-4 + cloprostenol D0), B (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 300IU eCG D-4 + cloprostenol D0) e C (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 250IU FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0), realizados no Experimento 1; e dos Tratamento D (CIDR [®] por 8 dias + BE D-8 + 700IU eCG D-4 + cloprostenol D0) e E (CIDR [®] por 7,5 dias + BE D-7,5 + 130mg FSH D-3 / D0,5 + cloprostenol D0), realizados no Experimento 2, com a espécie <i>Mazama gouazoubira</i>	33
Figura 5. (1) - Coleta de embriões por laparoscopia na espécie <i>Mazama gouazoubira</i> . Animal com membros posteriores elevados a 45°. (2) - Posicionamento das bainhas: (A) – ótica, incisão na linha média, 10cm da glândula mamária; (B) - sonda de três vias, incisão na linha média, 2cm posterior a ótica; (C) – pinça, incisão lateral a ótica.....	36
Figura 6. Procedimento laparoscópico para coleta de embriões da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> : (A/B) - Apreensão do corno uterino próximo a bifurcação do útero e perfuração em direção ao lúmen, (C/D) - Introdução da sonda de três vias no lúmen uterino, (E) - Sonda posicionada e balão inflado, (F) - fim da lavagem do corno e retirada da sonda de três vias.....	36

- Figura 7.** Teste de paralelismo da dosagem de progestágenos fecais na espécie *Mazama gouazoubira*. O paralelismo existente entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada de extratos fecais mostra que os progestágenos presentes nas fezes desta espécie se ligam ao anticorpo utilizado no ensaio de forma similar ao que se ligam os progestágenos presentes na curva padrão. As diluições 1/250 e 1/500 foram utilizadas para os extratos fecais..... **39**
- Figura 8.** Representação esquemática da mensuração dos corpos lúteos da espécie *Mazama gouazoubira*, obtidos após os tratamentos de superovulação. **40**
- Figura 9.** Aspectos morfológicos dos corpos lúteos de ovários da espécie *Mazama gouazoubira* nos Tratamentos A, B e C..... **45**
- Figura 10.** Perfis endócrinos das concentrações médias ($\pm$ EPM) diárias de progestágenos fecais de cinco fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* nos Tratamentos A (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 600IU eCG D-4 + cloprostenol D0) – *linha contínua*; B (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 300IU eCG D-4 + cloprostenol D0) – *linha pontilhada* e C (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 250IU FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0) – *linha tracejada*. *Média $\pm$ EPM excluindo dados da fêmea 3 dos Tratamentos A e C, devido a repetição do comportamento de estro após o Tratamento A e a duração do comportamento de estro maior de 150 horas após o Tratamento C. O Tratamento B teve apenas cinco fêmeas tratadas, devido ao óbito da fêmea 1 durante o período experimental..... **46**

PROTÓCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)

RESUMO – O conhecimento das técnicas de reprodução assistida nas espécies selvagens pode ser importante para futuros programas de conservação *in situ* e *ex situ*. Nosso objetivo foi estabelecer um protocolo de superovulação para o veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). Para tanto, foram realizados dois experimentos: **(1)** No ano de 2007, seis fêmeas da espécie *M. gouazoubira* receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®]) por 8 dias seguido por uma aplicação i.m. de 0,5mg de BE no momento da inserção (D-8) e de 265µg de cloprostenol (PGF_{2α}) no momento da retirada (D0). Posteriormente foram divididas em três grupos (n=2): no primeiro os animais receberam 600UI de eCG (**Tratamento A**), no segundo 300UI de eCG (**Tratamento B**) e no terceiro 250UI de FSH+PVP. (**Tratamento C**), todos administrados no dia 4 (D-4). O segundo experimento **(2)** foi desenvolvido no ano de 2009 e utilizou outras seis fêmeas da mesma espécie, divididas em dois grupos (n=3): o primeiro recebeu CIDR[®] por 8 dias, seguido por uma aplicação i.m. de 0,25mg de BE no D-8, 700UI eCG no D-4 e 265µg PGF_{2α} no D0 (**Tratamento D**) e o segundo recebeu CIDR[®] por 7,5 dias seguido por uma aplicação i.m. de 0,25mg de BE no D-7,5; 130mg de FSH em oito doses iguais (iniciando em D-3 e finalizando em D-0,5) e 265µg de PGF_{2α} no D0 (**Tratamento E**). Em cada experimento os tratamentos foram delineados no esquema “cross-over”, com um intervalo de 44 dias após a remoção do CIDR[®]. Todas as fêmeas receberam uma aplicação i.m. de PGF_{2α} 14 dias após a retirada do CIDR[®]. Um macho fértil foi utilizado para a detecção do estro e fertilização. A eficácia dos Tratamentos foi avaliada pelo comportamento reprodutivo, contagem de CLs e folículos (maiores que 3mm) e colheita de embriões por laparoscopia, sete dias após a primeira cópula. No Experimento 1, ainda foram coletadas fezes para dosagem de progestágenos fecais. O número de ovulações (Tratamento A = 3,40±0,68 vs. Tratamento B = 1,40±0,24 vs. Tratamento C = 0,80±0,49); estímulo ovariano total (Tratamento A = 4,80±1,02 vs. Tratamento B = 1,80±0,37 vs. Tratamento C = 1,40±0,60) e diâmetro do CL (Tratamento A = 7,33±0,76mm vs. Tratamento B = 3,94±0,19mm vs. Tratamento C = 2,18±0,49mm)

no Tratamento A foram significativamente maiores do que no Tratamento B e C. Entretanto, a resposta superovulatória não diferiu entre os Tratamentos (5/6 fêmeas; 2/5 fêmeas; e 2/6 fêmeas; em A, B e C, respectivamente). A concentração média de progesterona fecal na fase luteal do Tratamento A ($6277,94 \pm 2232,47$ ng/g fezes) foi significativamente diferente do Tratamento C ($1374,82 \pm 401,77$ ng/g fezes), mas não diferente do Tratamento B ($2970,15 \pm 564,38$ ng/g fezes). A taxa média de ovulação do Tratamento D ($6,0 \pm 1,7$) foi superior ($P \leq 0,05$) ao Tratamento E ($2,0 \pm 0,3$), mas a resposta superovulatória (6/6 fêmeas; 4/6 fêmeas; em D e E, respectivamente) e o estímulo folicular total ($13,2 \pm 2,6$; $10,4 \pm 1,1$; em D e E, respectivamente) não diferiram entre os Tratamentos. Assim, embora os Tratamentos A e D tenham induzido resposta superovulatória significativa dentro dos Experimentos 1 e 2, com a presença de CLs funcionantes, não é possível dizer que foi estabelecido um protocolo adequado para a indução da SOV e colheita de embriões por laparoscopia na espécie *M. gouazoubira*, pois nenhum embrião foi colhido durante os experimentos.

Palavras-chave: superovulação, *Mazama gouazoubira*, progestinas fecais, veado-catingueiro.

PROTOCOLS FOR SUPEROVULATION OF BROWN BROCKET DEER (*Mazama gouazoubira*)

ABSTRACT - Knowledge of assisted reproduction techniques for wild animals is useful for future *in situ* and *ex situ* conservation programs. The present study aimed to establish a superovulation protocol for brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by evaluating the ovulation rate, the presence of functional corpora lutea (CL), the number of embryos and their development stages after superovulation using different treatments. For this, two experiments were realized: **(1)** in 2007, six female *Mazama gouazoubira* received an intravaginal device (CIDR[®]) for 8 days, followed by 0.5mg i.m. injection of OB at the time of insertion (D-8) and 265µg of cloprostenol (PGF_{2α}) at the time of removal (D0). Next, the hinds were divided into 3 groups (n=2): group 1 received an i.m. injection of 600IU eCG (**Treatment A**), group 2 300IU of eCG (**Treatment B**) and group 3 250IU of FSH+PVP (**Treatment C**), all on D4 (D-4). The second Experiment **(2)** was developed in 2009 and also used six hinds from the same species divided into 2 groups (n=3): the first received CIDR[®] for 8 days, followed by 0.25mg i.m. injection of OB on D-8, 700IU of eCG on D-4 and 265µg of PGF_{2α} on D0 (**Treatment D**) and the second received CIDR[®] for 7.5 days followed by 0.25mg i.m. injection of OB on D-7.5, 130mg of FSH divided into eight equal doses [beginning on D-3 and ending D-0.5] and 265µg of PGF_{2α} on D0 (**Treatment E**). In each experiment, the treatments were 'crossed over' with 44 day intervals after CIDR[®] removal. All the hinds received an i.m. injection of PGF_{2α} 14 days after CIDR[®] removal. A fertile male was used for estrus detection and fertilization. Treatment efficacy was evaluated by reproductive behavior, observation of CL, unruptured follicles (over 3mm) and embryo collection via laparoscopy 7 days after the first copulation. In Experiment 1, feces were collected and later analyzed for fecal progesterone concentration. The mean ovulation rate (Treatment A = 3.40±0.68 vs. Treatment B = 1.40±0.24 vs. Treatment C = 0.80±0.49); total ovarian stimulation (Treatment A = 4.80±1.02 vs. Treatment B = 1.80±0.37 vs. Treatment C = 1.40±0.60) and mean CL diameter (Treatment A = 7.33±0.76mm vs. Treatment B = 3.94±0.19mm vs. Treatment C = 2.18±0.49mm) in Treatment A were significantly higher than the mean

ovulation rates, total ovarian stimulation and mean CL diameter in Treatments B and C. However, the superovulation response was not significantly different between treatment groups (5/6 hinds, 2/5 hinds, and 2/6 hinds, in A, B and C, respectively). The mean fecal progesterone concentration at the luteal phase in Treatment A (6277.94 ± 2232.47 ng/g feces) was significantly different from Treatment C (1374.82 ± 401.77 ng/g feces), but not from Treatment B (2970.15 ± 564.38 ng/g feces). The mean ovulation rate in Treatment D (6.0 ± 1.7) was higher than ($P \leq 0.05$) the mean ovulation rates for Treatment E (2.0 ± 0.3), but the superovulation response (6/6 hinds and 4/6 hinds, in D and E, respectively) and the total ovarian stimulation (13.2 ± 2.6 and 10.4 ± 1.1 , in D and E, respectively) were not significantly different between treatments. Thus, although Treatments A and D presented significantly superovulatory response in Experiments 1 and 2, with functional CL, it cannot be said that an appropriate protocol was established for superovulation induction and laparoscopy embryo sampling of *Mazama gouazoubira*, because no embryo was collected during the experiments.

Key words: superovulation, *Mazama gouazoubira*, fecal progesterone, brown brocket deer.

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

A região neotropical passa por um período crítico em termos de perda de biodiversidade (DUARTE, 2005). Dentro deste contexto, há um crescente aumento do número de espécies de cervídeos neotropicais sofrendo redução em seu tamanho populacional (BERG & ASHER, 2003; IUCN, 2008). A redução das populações e a ausência de fluxo gênico podem levar à diminuição da variabilidade genética e à endogamia, afetando o desempenho reprodutivo e aumentando o risco de extinção (ROLDAN et al., 2006).

Certamente a melhor forma de preservar estas populações seria através da preservação do habitat (DUARTE, 2005), da contenção do crescimento da população humana (WILDT & WEMMER, 1999) e da educação ambiental (COMIZZOLI et al., 2000). Entretanto, como estes fatores são dependentes de políticas governamentais, nem sempre é possível esperar que eles se concretizem, sem que algumas populações estejam ameaçadas.

O uso das biotecnologias da reprodução não deve ser considerado a solução exclusiva para a preservação das espécies, mas não há dúvidas de que a criopreservação dos gametas, por meio dos bancos de germoplasma, é uma boa alternativa para a manutenção da diversidade genética das populações selvagens por tempo indeterminado (PUKAZHENTHI & WILDT, 2004); além de auxiliar na redução do número de indivíduos necessários para a manutenção da variabilidade em cativeiro (BALLOU, 1992). Por estas razões, os bancos genômicos, aliados às técnicas de reprodução assistida são considerados ferramentas importantes na manutenção dos programas de conservação *in situ* e *ex situ* (HOLT & PICKARD, 1999).

A transferência de embriões (**TE**) é considerada uma das biotecnologias mais promissoras para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, pois permite explorar simultaneamente o material genético do macho e da fêmea (BAINBRIDGE et al., 1999). As transferências embrionárias poderão ocorrer entre as mesmas espécies (TE intraespecífica) ou entre espécies diferentes (TE interespecífica), sendo esta última

forma a de maior importância para a conservação de espécies selvagens, pois possibilita gerar vários animais de uma determinada espécie ameaçada implantando seus embriões em espécies não ameaçadas (COMIZZOLI et al., 2000). A superovulação (**SOV**) é parte essencial dos programas de TE e fertilização *in vitro* (**FIV**), pois é a técnica responsável por aumentar o número de embriões e oócitos coletados por ciclo de tratamento em cada fêmea (BAINBRIDGE et al., 1998).

No entanto, uma série de fatores limita o sucesso destas biotecnologias (ROLDAN et al., 2006), entre eles a falta de conhecimento da fisiologia reprodutiva de grande parte das espécies (ANDRABI & MAXWELL, 2007). Nos últimos 25 anos, o desenvolvimento de técnicas não-invasivas de monitoramento endócrino aumentou o sucesso da reprodução assistida nos animais selvagens (HOLT & PICKARD, 1999), mas os protocolos continuam sendo adaptados “por tentativa e erro” (FENESEY et al., 1994), de outros desenvolvidos para ruminantes domésticos e cervídeos criados comercialmente, mesmo que ainda existam problemas a serem solucionados nestas espécies (COMIZZOLI et al., 2000). Além disso, os protocolos devem ser delineados minimizando a manipulação (BAINBRIDGE e JABBOUR, 1998), uma vez que os cervídeos são animais de difícil manejo e conhecidamente sensíveis ao estresse (DIAS, 1997). Como cada espécie é evolutivamente distinta, tendo desenvolvido adaptações reprodutivas altamente especializadas (WILDT & WEMMER, 1999), raramente os protocolos são diretamente transferidos entre as espécies.

Por esta razão, a obtenção de informações mais detalhadas a respeito da SOV em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) é interessante, pois existem poucas informações a respeito do assunto e os dados obtidos são importantes para avanços nas técnicas de reprodução assistida nos cervídeos neotropicais. Assim, nosso objetivo foi estabelecer um protocolo de SOV para o veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), avaliando a taxa de ovulação, a presença de corpos lúteos funcionais, o número de embriões e seus estádios de desenvolvimento após a SOV por diferentes protocolos.

II. HIPÓTESE

- Os cinco protocolos de SOV descritos na literatura para ruminantes domésticos (Tratamentos A, B e C, no Experimento 1; Tratamentos D e E, no Experimento 2) podem ser utilizados para a indução da SOV na espécie *M. gouazoubira*.

III. REVISÃO DE LITERATURA

No mundo há 17 gêneros e 45 espécies de cervídeos distribuídos por América, Europa, Ásia e norte da África, além de outras regiões nas quais não ocorreriam naturalmente, mas tiveram suas populações estabelecidas por introdução humana (WALKER, 1991). Aproximadamente um terço destas espécies é considerado ameaçado ou extinto (LOCATELLI et al., 2006). Na América Latina estão descritas 17 espécies de cervídeos neotropicais e a maior parte delas (10 espécies) está classificada na IUCN Red List (2009) como **EN** ('endangered' = ameaçada).

No Brasil existem pelo menos oito espécies da família Cervidae, sendo elas: *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-pantanal), *Odocoileus virginianus* (veado-galheiro), *Ozotocerus bezoarticus* (veado-campeiro), *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro), *Mazama americana* (veado-mateiro), *Mazama nana* (veado-bororó), *Mazama rondoni* (veado-roxo) e *Mazama bororo* (bororó-do-sul) (DUARTE, 1996).

Juntamente com os gêneros *Hippocamelus*, *Blastoceros*, *Ozotoceros*, *Odocoileus* e *Pudu*, os *Mazama* são pertencentes à ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, infra-ordem Pecora, superfamília Cervoidea, família Cervidae, subfamília Odocoileinae, compondo a tribo Odocoileini (ROSSI, 2000).

O veado-catingueiro é o cervídeo brasileiro mais abundante (DUARTE, 1996) e está classificado na IUCN Red List (2009) como **LC** ('least concern' = não sofre ameaça imediata a sobrevivência). Entretanto, no Brasil, a classificação regional é variável, sendo considerada espécie vulnerável no Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2002) e ameaçada no Rio de Janeiro (BERGALLO et al., 2000).

O veado-catingueiro (Figura 1) é uma espécie considerada de pequeno a médio porte, com peso entre 11-25 quilos e altura média de 0,50 m (ROSSI, 2000). A coloração geral dos indivíduos é variável, podendo ir do cinza escuro até o marrom avermelhado (PINDER & LEEUWENBERG, 1997). A região ventral é baia, com áreas brancas na parte inferior da cauda e face interna da orelha. As regiões submandibulares e perioftálmicas são mais claras, mas dificilmente chegam a ser

brancas. A maioria dos indivíduos (dependendo da subespécie) tem uma pinta branca acima dos olhos, que é inexistente nas outras espécies. A orelha é grande e arredondada e os chifres não ramificados, que é uma característica de todos os animais do gênero *Mazama* (DUARTE, 1996).

É uma espécie facilmente encontrada, ocupando o cerrado ao Sul do rio Amazonas até o Norte da Argentina (ÁVILA-PIRES, 1959; JUNGIUS, 1976; DUARTE, 1996). Na região amazônica, é provavelmente substituída por *Mazama nemorivaga*, apesar dessa possibilidade ainda não ter sido completamente comprovada (DUARTE, 1996; ROSSI, 2000).



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

Sabe-se que o veado-catingueiro ocupa ambientes desde florestas densas contínuas até savanas abertas com poucas e pequenas manchas de mata. Esta diversidade de ecossistemas e regimes estacionais pode influir em aspectos de sua ecologia (seleção, habitat, dieta, densidade e reprodução) e comportamento social, causando certas variações intra e inter populacionais. A espécie se adapta facilmente a

terras cultivadas, bastando que estejam disponíveis, para seu abrigo, pequenas áreas florestadas (PINDER & LEEUWENBERG, 1997).

A disponibilidade alimentar e nutricional ao longo do ano afeta diretamente a reprodução dos cervídeos, mas no caso do veado-catingueiro, a falta de um período criticamente pobre em termos de recursos alimentares permite a reprodução em todos os meses do ano, tanto nas savanas quanto nas florestas pluviais (FRÄDRICH, 1987; PINDER & LEEUWENBERG, 1997; SANTOS et al., 2001; BARROZO et al., 2001).

Assim como a maior parte das espécies de cervídeos, *M. gouazoubira* é unípara (PINDER & LEEUWENBERG, 1997), embora a ocorrência de gêmeos tenha sido descrita por Sadleir (1987) e Whitehead (1993). O período de gestação é de 208 a 215 dias, com ocorrência de estro pós-parto, refletindo a falta de sazonalidade reprodutiva (POLEGATO & DUARTE, 2003; PEREIRA et al., 2006).

Por ser uma espécie relativamente comum e com alguns parâmetros reprodutivos conhecidos, a espécie *M. gouazoubira* pode ser considerada um modelo experimental para avaliar e validar técnicas reprodutivas que poderão ser utilizadas como ferramenta na conservação dos cervídeos neotropicais.

Ciclo estral e dinâmica folicular

Não há muitas informações sobre o ciclo reprodutivo do veado-catingueiro, mas em geral, as fêmeas de cervídeos atingem a maturidade sexual por volta dos 18 meses, dependendo da disponibilidade de alimentos (PUTMAN, 1988). Com base em estudos comportamentais, a duração média do ciclo estral e do estro foi descrita entre 21 e 24 dias e entre 12 a 51 horas, respectivamente (DUARTE & GARCIA, 1995; SANTOS et al., 2001). Recentemente, Pereira et al. (2006) analisaram dados comportamentais associados ao monitoramento endócrino não-invasivo e relataram uma duração média do ciclo estral de $26,9 \pm 1,7$ dias (variando entre 21–37 dias) e uma duração média do estro de $2,3 \pm 0,2$ dias (variando entre 1–4 dias), divididos, em média, em $24,6 \pm 1,4$ dias de fase luteínica (correspondente ao início da ovulação até a regressão do corpo lúteo – LOCATELLI & MERMILLOD, 2005) e $1,7 \pm 0,1$ dias de fase inter-luteal (correspondente ao final do recrutamento e ovulação - LOCATELLI & MERMILLOD, 2005).

Nos ruminantes domésticos em geral, o ciclo de maturação folicular e luteinização são a base do ciclo estral e são controlados por uma complexa interação hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. O hipotálamo sintetiza e secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (**GnRH**), que estimula a hipófise a produzir e secretar o hormônio folículo estimulante (**FSH**) e o hormônio luteinizante (**LH**). O desenvolvimento inicial do folículo no ovário é independente da ação gonadotrófica, mas após a proliferação celular da granulosa e a aquisição dos receptores para as gonadotrofinas na granulosa (FSH) e na teca (LH) o desenvolvimento do folículo dominante depende de um sinergismo entre FSH, LH, estradiol e andrógenos. Resumidamente, o LH estimula as células da teca a produzirem andrógenos (testosterona e androstenediona) que se difunde no líquido folicular, enquanto o FSH estimula as células da granulosa a sintetizarem uma enzima aromatizante que transforma testosterona em estradiol. O aumento da atividade desta enzima dentro do folículo aumenta as concentrações de estradiol e o número de receptores para FSH, tornando o folículo antral cada vez mais sensível ao FSH. No final da fase de desenvolvimento do folículo antral, o FSH e o estradiol iniciam a formação de receptores para o LH na granulosa, enquanto os receptores para o FSH começam a diminuir. O aumento da secreção de estrogênio pelo folículo antral resulta no pico de LH no final do crescimento folicular (indução da ovulação). Posteriormente, o LH auxilia na formação do corpo lúteo (**CL**), que secreta progesterona sob a sua influência. Em caso de fertilização, o CL produz a progesterona necessária para sustentar a prenhes. Caso a fertilização não ocorra, o útero secreta prostaglandina (**PGF_{2α}**) que provoca a regressão luteal e o recomeço do ciclo ovariano (BROWN et al., 2004; CUNNINGHAM, 2004).

A luteólise natural, nas espécies de cervídeos *Dama dama* e *Cervus elaphus*, é realizada pela associação de pulsos de ocitocina (de origem ovariana ou hipofisária) e PGF_{2α} (secretada pelo endométrio uterino) entre os dias 16 e 20 do ciclo estral (ASHER et al., 1988; BAINBRIDGE et al., 1996). Esse retro-controle positivo acontece no final do ciclo devido à elevação das concentrações de estradiol, responsável por aumentar a sensibilidade do endométrio uterino à ocitocina quando não ocorre a implantação do

embrião e secreção de trofoblastina (interferon τ) (BAINBRIDGE, et al., 1996). É importante ressaltar que, nos ciclos estrais em geral, a progesterona e o estradiol atuam simultaneamente para regular a secreção das gonadotrofinas no hipotálamo e na hipófise, uma vez que o estradiol reduz a amplitude dos pulsos de gonadotrofinas e a progesterona reduz a frequência destes pulsos (CUNNINGHAM, 2004). A secreção de FSH está sob controle de 'feedback' negativo de dois hormônios gonadais, o estradiol e inibina, exibindo variações cíclicas durante o ciclo estral que estão relacionadas com o desenvolvimento e involução dos folículos dominantes. Já a regulação da secreção de LH ocorre devido à ação da progesterona e estradiol e a importância de cada hormônio depende da fase do ciclo estral. Sob altas concentrações de progesterona, o estradiol faz um 'feedback' negativo com o LH, enquanto sob baixas concentrações de progesterona; o estradiol faz uma retroalimentação positiva com o LH (MORAES et al., 2002).

Nos ruminantes domésticos o crescimento folicular exibe padrão contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos em ondas de crescimento folicular. A dinâmica folicular é um processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais que permite o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório; enquanto o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (LUCY et al., 1992). Cada onda folicular é composta por 3 fases: recrutamento ou emergência, seleção e dominância (FORTUNE, 1994).

Os poucos estudos sobre a dinâmica folicular nos cervídeos foram realizados na espécie *C. elaphus*. O primeiro deles (ASHER et al., 1997) utilizou a ultrassonografia em animais cirurgicamente modificados (os ovários foram fixados na parede vaginal, para que fosse possível a visualização das estruturas ovarianas) e relatou que o número total de folículos maiores que 3mm não variou significativamente dentro do ciclo e que a presença de um folículo maior ou igual a 6mm foi comum durante todo o período, exceto imediatamente após a ovulação (dia 0). Entretanto, o surgimento de novos folículos (maior ou igual a 3mm) foi significativamente diferente no 1º e no 14º dia após a regressão ou ovulação do folículo maior, sugerindo um efeito de dominância, com a ocorrência de ondas foliculares com padrões irregulares de emergência e

regressão do maior folículo (que apresentou alta longevidade). No entanto, a modificação anatômica dos animais pode ter levado a alterações nos resultados (ASHER et al., 1997). Quatro anos mais tarde (McLEOD et al., 2001), um estudo mais detalhado acompanhou a dinâmica utilizando a avaliação *in vitro* de folículos de animais ovariectomizados, após diferentes momentos da retirada dos implantes intra-vaginais de progesterona (**CIDR**[®]-*Controlled Internal Drug Releasing*) e afirmou que a dinâmica folicular desta espécie é similar à dos outros ruminantes monovulares. Foi relatada a correlação entre o tamanho do folículo e sua população de células da granulosa, sendo que os folículos antrais apresentavam diâmetro de $8,3 \pm 0,38$ mm, altas concentrações de AMPc ($9,3 \pm 6,76$ pmol $(10^6$ células)⁻¹ h⁻¹), estradiol ($106 \pm 25,8$ ng mL⁻¹) e aromatase ($4,2 \pm 2,86$ ng estradiol $(10^6$ células)⁻¹ h⁻¹) (McLEOD et al., 2001).

Recentemente, com os avanços das técnicas ultrassonográficas na espécie *C. elaphus*, foi confirmado que os folículos ovarianos se desenvolvem em padrão de ondas foliculares durante o anestro (McCORKELL et al., 2004) e a estação reprodutiva (McCORKELL et al., 2006; McCORKELL et al., 2007; McCORKELL et al., 2007a; McCORKELL et al., 2008), assim como já demonstrado em outros ruminantes domésticos (bovinos – GINTHER et al., 1989; cabras - GINTHER et al., 1994 e ovelhas – GINTHER et al., 1995). Nestas espécies domésticas, a primeira etapa de crescimento folicular ocorre desde a fase de folículos primordiais, até a fase de folículo responsivo às gonadotrofinas (folículo pré-antral), e pode ser reconhecida pela proliferação celular na granulosa e aparecimento de receptores para o FSH e o LH na granulosa e na teca, respectivamente. A segunda fase é caracterizada pela intensa proliferação e diferenciação celular e pela aquisição da capacidade esteroideogênica, dando lugar a folículos que dependem absolutamente do aporte gonadotrófico. Também chamada de recrutamento folicular, essa segunda fase, permite a passagem para o estágio de seleção folicular, ao final da qual emerge um folículo dominante destinado à ovulação, que secreta hormônios como o estradiol e a inibina, suprimindo a secreção de FSH a níveis abaixo do requerido para ativar o desenvolvimento de mais folículos, bloqueando o crescimento e provocando atresia dos outros folículos da mesma onda (HUNTER et al., 1992). O folículo dominante presente no momento da regressão do CL será o

folículo ovulatório. A maior parte dos ciclos estrais em *C. elaphus* é formado por 2 a 3 ondas de desenvolvimento folicular enquanto poucos são formados por 4 ondas foliculares (McCORKELL et al., 2007).

Semelhante aos outros ruminantes domésticos, na espécie *C. elaphus*, a concentração sérica de FSH começa a aumentar 2 dias antes da emergência da onda. Após o pico de LH todos os folículos que não ovularam se tornam atrésicos e a secreção de hormônios ovarianos esteróides e protéicos se torna mínima. Assim, devido às baixas concentrações de estradiol e inibina, o pico periovulatório de FSH que precede a primeira onda ocorre no dia ou 1 dia antes da ovulação e é o maior pico do ciclo. Por outro lado, a mínima concentração de FSH ocorre no dia ou 1 dia antes do novo folículo dominante atingir o maior diâmetro. A partir deste momento, as concentrações de FSH começam a aumentar, sugerindo que o primeiro folículo dominante perdeu a habilidade de suprimir o FSH, no momento em que o próximo folículo dominante atinge diâmetro de vantagem em relação aos outros. O folículo dominante da primeira onda atinge o maior diâmetro quando comparado aos outros folículos dominantes, pois emerge sob concentrações mínimas de progesterona e continua a se desenvolver sob baixas concentrações por 1-2 dias, até que a progesterona comece a aumentar. Este é um momento privilegiado para o desenvolvimento folicular, pois a progesterona continua baixa por vários dias após a ovulação. As outras ondas irão emergir sob altas concentrações de progesterona e os seus folículos dominantes irão atingir tamanhos menores. O menor diâmetro atingido pelo folículo ovulatório está associado com o curto intervalo entre emergência, regressão luteal e ovulação, pois a emergência do folículo ovulatório ocorre antes da luteólise (McCORKELL et al., 2006).

Diversos estudos em ruminantes domésticos têm demonstrado que qualquer folículo saudável ou em crescimento é capaz de se tornar dominante. O aumento da concentração sérica de FSH, decorrente da destruição do folículo dominante após a divergência, resulta na dominância do maior folículo subordinado. Da mesma forma, um folículo aleatoriamente escolhido dentre um grupo de folículos de 5mm, no início da onda folicular, pode ser direcionado para a dominância após a retirada (aspiração) de

todos os outros da onda (KO et al., 1991; GINTHER et al., 2000). Sendo assim, um aporte exógeno de hormônios gonadotróficos pode eliminar a dominância folicular e estimular o crescimento de um maior número de folículos (ADAMS, 1994), sendo a base dos protocolos de SOV.

Superovulação

A SOV permite aumentar o número de folículos que uma fêmea pode produzir em um único ciclo e aumentar o número de crias produzidas ao longo de sua vida. A eficiência da SOV é um dos fatores que irá determinar o sucesso da obtenção de oócitos para a fertilização *in vitro* ou da colheita de embriões após a lavagem uterina. Sendo assim, o objetivo desta técnica é explorar o potencial reprodutivo das fêmeas sem a necessidade de inúmeras intervenções (PTAK et al. 2002).

Embora a SOV já tenha sido realizada com sucesso em diversas espécies de cervídeos (Tabela 1), a variabilidade da resposta superovulatória e as baixas taxas de fertilização e recolhimento de embriões têm sido fatores limitantes a sua utilização nestas espécies (FENESSY et al., 1989), assim como em outras espécies domésticas (BLANCO et al., 2003; BÓ et al., 2008). A variabilidade de resposta interindividual também pode ser observada durante tratamentos realizados em diferentes momentos (BINDON et al., 1986).

Esta variabilidade pode ser observada nos bovinos, onde geralmente um terço das doadoras tratadas não respondem à SOV, um terço produz em média 3 embriões e somente o terço restante produz embriões de qualidade para a transferência (GALLI et al., 2003). Em cervídeos, os índices também não são promissores, sendo apresentadas a seguir algumas das médias encontradas para o número de ovulações: *E. davidianus* (3,8 CL - ARGO et al., 1994), *O. virginianus* (3,1 CL - WALDHALM et al., 1989) e *C. elaphus* não selecionados para um programa de TE (1,8-3,7 CL – ASHER et al., 2000), *D. dama* (6 a 10 CL – FENESSY et al., 1994; MORROW et al., 1994; ASHER et al., 1995) e *C. elaphus*, em geral, já selecionados para os programas de TE (média de 5 a 11 CL - FENESSY et al., 1989, 1994; ASHER et al., 1992, 1995, 2000; ARGO et al., 1994; BAINBRIDGE et al., 1995; SOLER et al., 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolos de superovulação utilizados em cervídeos de diferentes espécies.

Espécies	Protocolos superovulação	Ovulação (CL)	Estímulo total	Método fertilização	Método colheita e/ou contagem CL	Taxa colheita	Referência
<i>Mazama gouazoubira</i>	Esponja MPA 13 ou 14 d (troca dia 7) + 700 UI eCG (dia 13 ou 14) + hCG dia 16 , 17 ou no momento da IA	-	-	Cópula natural	Laparotomia Dia 7 ou 8 ^a	-	DUARTE & GARCIA 1995
<i>Odocoileus virginianus</i>	Esponja MPA 10 ou 14 d ou PGF _{2α} (14 d após estro) + 1000UI eCG	3,1	-	Cópula natural	Laparotomia	68%	WALDHAM et al., 1989
<i>Elaphurus davidianus</i>	CIDR® 14 d (troca dia 7) + PGF _{2α} dia 5 + 200UI eCG (dia 11) + 8 doses iguais FSH (0,5 UI - início dia 11)	3,8 ±1,2	4,83 ± 1,30	IAIU sc 36h	Laparotomia Dia 5, 6 ou 7	29,3%	ARGO et al., 1994
<i>Cervus elaphus</i>	CIDR® 11 d (troca D8) + 8 doses iguais FSH (0,14 UI / dia - início dia 8)	11	-	Cópula natural	Laparotomia Dia 8	29,5%	FENESSY et al., 1989
	CIDR® 11 d (troca D8) + dispositivo de liberação lenta de FSH inserido dia 8	3	-	-	-	41,6%	-
	CIDR® 14 d (troca dia 10) + 8 doses iguais FSH (0,5 UI - início dia 11) + 200UI eCG (dia 11)	8,3 ± 1,5	-	-	Laparoscopia Dia 15 após retirar CIDR®	-	ASHER et al., 1992
	CIDR® 14 d (troca dia 10) + 200UI eCG (dia 11) + 8 doses iguais FSH (0,5 UI - início dia 11) + GnRH 18h após retirar CIDR®	9,4 ± 1,8	-	-	-	-	-
<i>Cervus elaphus</i>	CIDR® 14 d (troca dia 7) + PGF _{2α} dia 5 + 200UI eCG (dia 11) + 8 doses iguais FSH (0,5 UI - início dia 11)	10,8 ± 3,7	13,6 ± 4,3	IAIU sc 36h	Laparotomia Dia 5, 6 ou 7	43,1%	ARGO et al., 1994
	CIDR® 14 d (troca dia 10) + 200UI eCG (dia 11) + 8 doses iguais FSH (0,5 UI - início dia 11)	9,5 ± 2,1	13,5 ± 1,9	Cópula natural + 4 IAIV sc 12h intervalo	Laparotomia Dia 7	32,7%	ASHER et al., 1995

Espécies	Protocolos superovulação	Ovulação (CL)	Estímulo total	Método fertilização	Método colheita e/ou contagem CL	Taxa colheita	Referência
<i>Cervus elaphus</i>	CIDR® 12 d (troca dia 8 + PGF _{2α}) + 8 doses iguais de FSH (0,4UI – início dia 9) + 200UI eCG dia 9	5,3 ± 2,4	15,0 ± 3,6	Cópula natural	Laparotomia 63h	87%	BERG et al., 1995
	CIDR® 12 d (troca dia 8 + PGF _{2α}) + 8 doses iguais de FSH (0,4UI – início dia 9) + 200UI eCG dia 1	11,2 ± 2,4	13,4±2,4		63h	75%	
	CIDR® 12 d (troca dia 8) + 1200 UI eCG dia 9	12,1 ± 2,5	13,1 ± 2,2	-	Laparoscopia Dia 14 após retirar CIDR®	-	BAINBRIDGE et al., 1996
	CIDR® 14 d (troca dia 8) + 1200 UI eCG dia 11	6,0 ± 1,5	8,9 ± 1,5	-	Laparoscopia Dia 14-15 após retirar CIDR®	-	BAINBRIDGE et al., 1998
	CIDR® 12 d (troca dia 8) + 8 doses iguais de FSH (72 UI – início dia 8,5) + 250UI eCG dia 12,5	2,15 ± 0,42	3,21 ± 0,51	-	Laparoscopia Dias 6-7 após retirar CIDR®	-	ASHER et al., 2000
<i>Dama dama</i>	CIDR® 12 d (troca dia 10) + 8 doses decrescente FSH (180mg – início dia 10) + 250UI eCG dia 12 + 0,008 mg buserelina 12 h após último FSH	8,1 ± 6,1	-	Cópula natural	Laparotomia Dia 9 após retirar CIDR®	84,1%	SOLER et al., 2007
	CIDR® 14 d + 8 doses iguais FSH (0,5 UI – início dia 10) + 100 UI eCG (dia 10 ou 14)	10,9 ± 2,5	13,4 ± 2,7	IAIU sf 36h	Laparotomia Dia 7	26,4%	MORROW et al., 1994
		8,6 ± 1,9	12,5 ± 2,0			31,9%	
	CIDR® 14 d (troca dia 10) + 200UI eCG (11° d) + 8 doses iguais FSH (0,5 UI - início dia 11)	9,6 ± 2,5	14,9 ± 2,7	Cópula natural + IA	Laparotomia Dia 7	30,6%	ASHER et al., 1995

CL = corpo lúteo, MPA = acetato de medroxiprogesterona, eCG = gonadotrofina coriônica eqüina, hCG = Gonadotrofina coriônica humana, PGF_{2α} = prostaglandina F₂ alfa, CIDR® = 'Controlled Internal Drug Release', FSH = hormônio folículo estimulante, GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas, IAIU SC = inseminação artificial intra-uterina com sêmen congelado, IAIU sc = inseminação artificial intra-vaginal com sêmen congelado, IAIU sf = inseminação artificial intra-vaginal com sêmen fresco, ^a número de dias após a inseminação artificial ou cópula natural.

As razões para as variações nas respostas superovulatórias não estão totalmente esclarecidas, mas podem ser decorrentes de fatores intrínsecos como a idade, a raça, a espécie (KUMAR et al., 2003), o histórico reprodutivo, o grau de habituação das doadoras (WENKOFF & BRINGANS, 1991) e a condição folicular no início do tratamento de SOV (NASSER et al., 1993; DE ROOVER et al., 2005); de fatores extrínsecos como o tipo de hormônio utilizado, o grau de sua pureza, a dose e protocolo de aplicação, o número de SOV repetidas (KUMAR et al., 2003), a estação do ano (ARGO et al., 1994), a qualidade do sêmen, o momento e a forma de fertilização, as condições de manejo, a nutrição, o estado sanitário e lactacional (STROUD & HASLER, 2006); ou ainda de uma junção de ambos os fatores (KAFI & MCGOWAN, 1997; MAPLETOFT et al., 2002). Entretanto, mesmo quando as fontes externas de variação são minimizadas ou eliminadas entre os animais, as respostas continuam variáveis, especialmente entre as espécies sazonais (BARTLEWSKI et al., 2008).

Isto sugere que as diferenças existentes no número e na qualidade de folículos de cada indivíduo podem ser responsáveis pela variação da resposta ao tratamento (McLEOD et al., 2001). Outro fator relevante para a eficiência das técnicas é a condição fisiológica dos folículos, como a produção de monofosfato de adenosina (AMPc) pelas células da granulosa (indicativa da capacidade do folículo em responder aos estímulos de LH e FSH), a concentração de estradiol no fluido folicular e atividade da aromatase (McNATTY et al., 1984). A correlação entre o tamanho do folículo e sua população de células da granulosa já foi descrita em *C. elaphus*; sendo que os folículos antrais apresentavam diâmetro de $8,3 \pm 0,38$ mm, altas concentrações de AMPc [$9,3 \pm 6,76$ pmol (10^6 células) $^{-1}$ h $^{-1}$], estradiol ($106 \pm 25,8$ ng mL $^{-1}$) e aromatase [$4,2 \pm 2,86$ ng estradiol (10^6 células) $^{-1}$ h $^{-1}$] (mensurados *in-vitro*) (McLEOD et al., 2001).

É importante ressaltar que a ovulação fisiológica é regulada por uma interação hormonal minuciosa, programada para manter a taxa ovulatória dentro dos limites da espécie; e que estas condições fisiológicas são alteradas pelos hormônios exógenos utilizados nos tratamentos de manipulação do ciclo estral e da ovulação (McLEOD et al., 2001). Sendo assim, a ocorrência de respostas variáveis aos tratamentos que buscam romper este controle hormonal minucioso não é completamente inesperada

(BINDON et al., 1986), fazendo da SOV a parte técnica mais imprevisível dentro da produção de embriões e limitando a sua aplicabilidade nas pesquisas (BARTLEWSKI et al., 2008).

Manipulação da onda folicular e sincronização do estro

Uma das principais linhas de pesquisa que tem sido desenvolvida nos ruminantes domésticos, na tentativa de diminuir a variabilidade e melhorar a resposta aos tratamentos de SOV, é o controle da emergência da onda folicular (ARMSTRONG et al., 1993; BÓ et al., 2008). Há evidências na literatura de que o início dos tratamentos na presença de um folículo dominante (isto é, após a seleção), resulta em menor número de ovulações e embriões (RUBIANES et al., 1995, 1997; BURKE et al., 1999); enquanto o início do protocolo de SOV no momento de emergência da primeira onda (grande número de folículos pequenos) geralmente apresenta melhores resultados (NASSER et al., 1993). Um estudo recente em ovinos demonstrou a correlação negativa entre as concentrações séricas de estradiol no momento das duas primeiras aplicações de FSH e a taxa de embriões viáveis (BARTLEWSKI et al., 2008).

Na tentativa de evitar o folículo dominante no início dos tratamentos em bovinos, foram desenvolvidas algumas estratégias mecânicas ou hormonais; como começar a SOV no primeiro dia do ciclo estral, aspirar o folículo dominante ou todos os folículos acima de 5mm de diâmetro antes da SOV e sincronizar o início das ondas foliculares (BÓ et al., 2006). No entanto, o método mais prático, comum e efetivo é a sincronização do início da onda com a administração de 2-5mg estradiol-17 β ou benzoato de estradiol no momento da inserção do dispositivo intra-vaginal de progesterona (**DIP**), promovendo a atresia folicular e originando uma nova onda 4-5 dias após o início dos tratamentos (BÓ et al., 1995).

Recentemente, um estudo avaliou diferentes protocolos para a indução da emergência da onda folicular no período de anestro da espécie *C. elaphus*, utilizando três tratamentos: aspiração do folículo dominante guiada por ultra-som, 5mg de estradiol-17 β e 5mg de estradiol-17 β associado a 100mg de progesterona intramuscular; sendo que a emergência da onda folicular ocorreu após $1,4 \pm 0,4$; $3,5 \pm 0,3$

e $5,2 \pm 0,2$ dias, respectivamente (McCORKELL et al., 2008). Nesta mesma espécie, também já foi relatada a emergência da onda apenas com o uso do DIP, devido às altas concentrações de progesterona (1,9g), que atingiram concentrações 6 vezes mais altas do que as de animais não tratados (McCORKELL et al., 2007).

Até o presente momento os tratamentos propostos para SOV em cervídeos, baseados em outros desenvolvidos para os ruminantes domésticos (FENESSY et al., 1994), utilizavam implantes de progesterona por 11-14 dias associados a gonadotrofina coriônica eqüina (**eCG**), FSH ou combinação de ambos, administrados alguns dias antes ou no momento da retirada do implante (*M. gouazoubira* – DUARTE & GARCIA, 1995; *O. virginianus* - WALDHAM et al., 1989; *C. elaphus* - ASHER et al., 1992; *D. dama* - MORROW et al., 1994) (Tabela 1). Entretanto, os protocolos não consideravam o desenvolvimento dos folículos ovarianos no início dos tratamentos de sincronização e tentavam atingir o início da segunda onda folicular (RUBIANES & MENCHACA, 2003; McCORKELL et al., 2008). Este fato foi apontado como uma possível razão para a grande variação nas respostas aos tratamentos de SOV nos cervídeos (BAINBRIDGE et al., 1995; McCORKELL et al., 2008), pois a variação individual no dia de emergência da segunda onda é maior quando comparada à primeira (MAPLETOFT et al., 2002).

O conhecimento da dinâmica folicular e o controle da onda folicular nos bovinos permitiram que os tratamentos de SOV fossem iniciados no momento ideal para o recrutamento folicular, independente do estágio do ciclo estral; eliminando a necessidade de determinar o estro e/ou esperar 8-12 dias para iniciar o tratamento de SOV (BÓ et al., 2006). Estes fatos também levaram a questionamentos sobre a possível utilização dos protocolos de curta duração para a sincronização do estro (isto é, manutenção da fonte exógena de progesterona por 5-8 dias) nos tratamentos de SOV. Estudos realizados em ovinos sugeriram que o tempo de inserção do DIP não afeta diretamente a taxa de ovulação, mas pode atuar na qualidade dos embriões, tornando-a inversamente proporcional ao período de implantação (RUBIANES et al., 1999). No entanto, Samartzi et al. (1995) relataram a correlação negativa entre as concentrações de progesterona no início do estro e o número de CL observados.

Com o início das pesquisas sobre os protocolos de curta duração para sincronização do estro nos pequenos ruminantes domésticos, notou-se que a remoção do DIP realizada 6-8 dias após a sua inserção resultou na ovulação do folículo dominante da primeira onda pós-inserção e, conseqüentemente, em melhor sincronia e maiores índices de fertilidade (RUBIANES et al., 2003). Recentemente, um estudo com a espécie *M. gouazoubira* avaliou a sincronização do estro utilizando o CIDR® (0,33g) por 8 dias associado à administração de cloprostenol no momento da remoção do DIP e verificou que todos os animais (n=6) apresentaram estro comportamental $70,5 \pm 5,0$ horas após o fim do tratamento e 5/6 animais apresentaram 1 CL visível, com diâmetro médio de $4,85 \pm 0,74$ mm e produção média de progestinas fecais de $865,53 \pm 76,59$ ng/g fezes. O tempo médio de duração do estro foi de $34,7 \pm 4,50$ horas, sendo que as progestinas fecais atingiram concentrações inter-luteais em $3,2 \pm 0,73$ dias e a duração da fase inter-luteal foi de $4,6 \pm 1,57$ dias (ZANETTI et al., 2009). Sendo assim, é provável que os protocolos de curta duração para a sincronização do estro também sejam indicados para os tratamentos de SOV nos cervídeos (McCORKELL et al., 2007). Importante salientar que o tratamento para SOV deve ser finalizado na ausência de um corpo lúteo cíclico para que ocorram as ovulações (PINTADO et al., 1996), pois durante a luteólise há o aumento da secreção de estradiol, em resposta ao aumento na frequência dos pulsos de LH. O aumento do estradiol, por sua vez, aumenta a amplitude do pulso de LH, fazendo com que ocorra o comportamento de estro, o pico de LH e a ovulação (RUBIANES et al., 2003). A diminuição da secreção de progesterona consecutiva à luteólise, na espécie *D. dama*, ocorre dentro de 14 horas (ASHER & THOMPSON, 1989). A espécie *M. gouazoubira* manifestou o estro comportamental após, aproximadamente, 52 horas e as concentrações de progestágenos fecais atingiram concentrações inter-luteais após 2 dias, com o protocolo de sincronização do estro com duas aplicações de cloprostenol com 11 dias de intervalo (ZANETTI et al., 2009).

Um estudo comparativo entre a indução de ovulação e a indução da SOV, realizado em *C. elaphus*, mostrou que a manifestação do estro e o pico de LH são adiantados significativamente (aproximadamente 20 horas) nas fêmeas superovuladas,

mas que a relação entre o início do estro e o pico de LH é similar nos dois tratamentos, com o estro ocorrendo no intervalo entre 8 horas antes até 8 horas após o pico de LH. No entanto, as fêmeas SOV apresentaram maior variação nos intervalos entre início do estro / pico de LH e primeira ovulação. As ovulações começaram ao redor de 20 horas após o pico de LH e, os exames laparoscópicos seriados mostraram que nas fêmeas superovuladas, as ovulações podem continuar ocorrendo com intervalos de 24 horas, inclusive no período luteal (ASHER et al., 1992). A dissociação entre a ovulação e pico de LH, também já foi relatada em *D. dama*, que ovularam sem apresentar o pico (JABBOUR et al. 1994). Da mesma forma, é comum que vacas leiteiras não apresentem sinais de estro, mas respondam à SOV (REICHENBACH et al., 2002).

Hormônios gonadotróficos exógenos

O procedimento de SOV em geral envolve a sincronização do ciclo estral com fonte exógena de progesterona e a estimulação do desenvolvimento folicular com hormônios gonadotróficos exógenos: eCG administrada isoladamente ou associada ao soro anti-eCG; FSH proveniente de extrato de pituitária de suínos, ovinos e eqüinos ou ainda, FSH recombinante bovino ou gonadotrofina da menopausa humana (**hMG**) (REICHENBACH et al., 2002).

O eCG foi a primeira gonadotrofina amplamente utilizada dos tratamentos de SOV (GOULDING et al., 1996; COGNIE, 1999). É uma glicoproteína de origem eqüina, produzida nos cálices endometriais, com ação semelhante ao FSH e ao LH e vida média de 40 horas, podendo persistir por 8 a 14 dias na circulação dos ruminantes domésticos (GONZALEZ-RÉYNA et al., 1999), devido a grandes quantidades de ácido siálico presentes nesta molécula (MORELL et al., 1971). Por este motivo, uma única aplicação intramuscular deste hormônio é suficiente para provocar a superestimulação ovariana em diversas espécies (1500 a 2500UI para novilhas e vacas primíparas, 3000UI para vacas pluríparas, 1500 a 2000UI para ovinos - REICHENBACH et al., 2002 e 500 a 1200UI para cervídeos - DUARTE & GARCIA, 1995; BAINBRIDGE et al., 1996, 1998). Entretanto, esta vantagem do eCG pode ser superada pelo inconveniente da sua ação prolongada, responsável por provocar crescimento folicular disperso, mesmo após

o pico de LH; de forma que no momento da colheita de embriões, é comum observar a presença de folículos de tamanho grande (*C. elaphus* – BAINBRIDGE et al., 1995, 1996, 1998; ovinos – JABBOUR & EVANS, 1991), em número proporcional às doses utilizadas (GONZALEZ-RÉYNA et al., 1999). Estes folículos anovulatórios secretam altas concentrações de estradiol durante e após o período periovulatório, que podem alterar o meio ambiente uterino e interferir na captura dos óvulos pelas fímbrias e no seu posterior transporte (MURRAY et al., 1994). Também pode interferir no transporte dos espermatozóides pelo trato genital da fêmea (EVANS & ARMSTRONG, 1984), afetando a taxa de fertilização e a qualidade embrionária ou ainda, formando cistos foliculares (BAINBRIDGE et al., 1995). A influência da secreção de estradiol sobre o transporte dos espermatozóides já foi demonstrada em ovinos, comparando animais com alta (mais de 16 CL) e baixa resposta superovulatória, fertilizados por cópula natural; sendo que o primeiro grupo apresentou baixa taxa de fertilidade (ARMSTRONG & EVANS, 1983). Desta forma, em animais superovulados e fertilizados com cópula natural, é preconizada a associação da inseminação artificial **(IA)** intra-uterina, como forma de aumentar os índices de fertilidade (ARMSTRONG & EVANS, 1984; SARKAR et al., 2008).

Além do crescimento folicular disperso provocado pela longa meia-vida do eCG, outras causas podem estar relacionadas à presença dos folículos anovulatórios durante a SOV como, por exemplo, a deficiência ou inexistência do pico de LH após os tratamentos superovulatórios; a manutenção de altas concentrações deste hormônio (LH) por períodos prolongados; ou ainda a presença de folículos não responsivos ou menos responsivos ao LH, devido à diminuição do número de receptores para este hormônio nas células da granulosa e da teca e, conseqüentemente, à menor sensibilidade destes folículos ao LH (LOPEZ-DIAZ & BOSU, 1992). Este último fato é relatado quando folículos em início de atresia são recuperados e estimulados a crescer pela administração das gonadotrofinas exógenas, no entanto, o seu desenvolvimento estará associado à baixa capacidade ovulatória (baixas concentrações intra-foliculares de estradiol) e à deficiência na aquisição de competência oocitária, que também podem levar à má formação do CL pelas células da granulosa (RUBIANES et al., 1997).

As altas concentrações de estradiol também estão relacionadas à regressão prematura do CL em *C. elaphus* (BAINBRIDGE et al., 1996, 1998), assim como em outras espécies de ruminantes domésticos (PINTADO et al., 1996; RUBIANES et al., 1997; SAHARREA et al., 1998; COGNIÉ et al., 2003). Os níveis elevados de estradiol aumentam a sensibilidade do endométrio uterino à ocitocina e estimulam a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, ativando prematuramente o mecanismo de luteólise (BAINBRIDGE, et al., 1996, 1998) e/ou adiantam o pico de LH e favorecem a ovulação de pequenos folículos imaturos, com capacidade inadequada de formação luteal (VEIGA-LOPEZ et al., 2006). O estresse também pode ser uma causa de regressão luteal, especialmente em animais jovens, como já relatado em suínos (WAN et al., 1994), ovinos (SHEIKHELDING et al., 1988) e caprinos (EMESIH et al., 1995), devido aos transtornos endócrinos provocados pela liberação de corticosteróides (PETERS & LAMMING, 1986) e progesterona produzida pela glândula adrenal (ASHER & THOMPSON, 1989).

Os folículos destinados a formar CL inadequados não atingem seu completo desenvolvimento em receptores gonadotróficos, ou a habilidade máxima de sintetizar estradiol, sendo que a duração da estimulação do folículo, antes do pico de LH, pode ser crítica. Stubbings et al. (1986) propuseram que a formação de um corpo lúteo inadequado pode ocorrer como consequência do rápido desenvolvimento folicular e da ovulação, antes que as células da granulosa tenham adquirido a maturidade necessária para uma ótima luteinização em resposta ao LH.

Com o intuito de propiciar tempo para a aquisição suficiente de receptores de LH e aumentar as taxas de ovulação e de embriões viáveis, foram desenvolvidas estratégias que atrasam o pico pré-ovulatório de LH, como a manutenção da fonte exógena de progesterona por 24-36 horas após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a aplicação de LH exógeno 12-24 horas após a remoção da progesterona. Embora estes protocolos não tenham aumentado significativamente o número de embriões viáveis, em todas as raças bovinas avaliadas, quando comparados a protocolos com detecção do estro, eles permitiram o controle do momento da ovulação e a utilização da inseminação artificial com tempo-fixo (**IATF**) (BÓ et al., 2006; BARROS et al., 2007).

Por todos os efeitos adversos e aos baixos índices de recuperação de embriões (0,8 embriões viáveis/doadora), o uso isolado do eCG em cervídeos não é recomendado (WENKOFF & BRINGANS, 1991). No entanto, como a utilização deste fármaco oferece grande facilidade e praticidade devido a sua ação prolongada, algumas propostas têm sido avaliadas com o intuito de reduzir os seus efeitos adversos. A primeira delas é o seu uso associado ao controle da onda folicular ovariana, buscando melhor sincronia das ovulações; a segunda é o controle do período de ação do fármaco através da imunoneutralização/administração de anticorpos anti-eCG no final do estro (BAINBRIDGE et al., 1995) e a terceira é a inibição da sensibilidade do endométrio uterino à ocitocina, com a administração de interferon (BAINBRIDGE et al., 1998). Nos cervídeos, apenas as duas últimas propostas foram avaliadas e apresentaram resultados positivos quanto à diminuição da presença de grandes folículos e da regressão prematura do CL (BAINBRIDGE et al., 1995, 1998). Contudo, este é um assunto contraditório nos diversos estudos realizados em outras espécies domésticas, pois, apesar do procedimento ser eficiente para reduzir o crescimento folicular e as concentrações excessivamente elevadas de estradiol no período pós-ovulatório, não resultou em melhorias significativas no número de embriões recuperados (GOULDING et al., 1996). Além disso, o momento correto da imunoneutralização é essencial para não interferir no pico de LH endógeno e na ovulação (BAINBRIDGE et al., 1995; GOULDING et al., 1996).

O FSH é uma glicoproteína de origem hipofisária. Devido à curta meia-vida deste fármaco (5 horas – DEMOUSTIER et al., 1988), sua administração deve ser realizada através de aplicações intramusculares, a cada 12 horas, por um período de 3 a 4 dias, com a finalidade de promover o crescimento do maior número de folículos até o estágio pré-ovulatório. Os produtos comercialmente disponíveis no Brasil são obtidos a partir da purificação parcial da hipófise de suínos e apresentam variadas concentrações de LH. Acredita-se que as respostas superovulatórias e as taxas de colheita de embriões são influenciadas pelas quantidades relativas de FSH/LH no fármaco (proporção FSH:LH) (FENESSY et al., 1989; D'ALESSANDRO et al., 2005), sendo preferidas as preparações com baixos níveis de LH (FENESSY et al., 1989; GORDON, 1997).

Fisiologicamente esta relação decresce durante o período da regressão luteal até o pico pré-ovulatório de LH (D'ALESSANDRO et al., 1997) e a presença de LH nos produtos tem sido relacionada à ocorrência de folículos anovulatórios e a variabilidade nas respostas aos tratamentos superovulatórios (VEIGA-LOPEZ et al., 2006). Entretanto, as variações de resposta a esta relação são comuns até mesmo entre subespécies de cervídeos; enquanto *C. elaphus* exibe melhores respostas com baixas concentrações de LH, a subespécie *C. elaphus nelsoni* apresenta maior número de embriões de qualidade com produtos que contenham maiores níveis de LH (WENKOFF & BRINGANS, 1991). Esta discussão enfatiza a importância de diferenças interespecíficas e raciais na resposta às gonadotrofinas.

Na tentativa de mimetizar os eventos fisiológicos, o FSH, em geral, é administrado em doses decrescentes (GONZALEZ-BULNES et al., 2000; D'ALESSANDRO et al., 2005), mas o aumento da purificação dos produtos comerciais em relação a contaminação por LH, tornou possível o uso de doses iguais sem prejuízos para as respostas superovulatórias (BERLINGUER et al., 2004). Estes autores ainda sugerem que as altas doses iniciais dos protocolos de doses decrescentes podem induzir um desenvolvimento folicular rápido e anormal, afetando a qualidade do embrião. Entretanto, o uso de produtos altamente purificados tem resultado em baixas respostas de SOV, sugerindo que um pequeno aumento nas concentrações de LH após a remoção da fonte exógena, seria desejável para aumentar o número de ovulações e o número de embriões transferíveis (D'ALESSANDRO et al., 1997). No entanto, se estas concentrações se mantiverem por tempo prolongado, poderão ocorrer distúrbios na ovulação (GONZALEZ-BULNES et al., 2000).

Em caprinos e ovinos, o tratamento com FSH resulta em menor variabilidade na resposta de SOV, menor incidência de folículos anovulatórios, menores índices de regressão prematura do CL (D'ALESSANDRO et al., 1996); maior número de ovulações, maior taxa de recuperação e maior número de embriões viáveis (COGNIE, 1999), quando comparado ao tratamento com eCG (SAHARREA et al., 1998). Entretanto, o uso isolado deste fármaco também não é indicado para os cervídeos devido ao estresse provocado pelas múltiplas administrações (WENKOFF &

BRINGANS, 1991) e ao elevado número de animais que não responde ao seu estímulo (FENESSY et al., 1989; BERG et al., 1995). Argo et al. (1994) afirmaram que a maior eficiência dos tratamentos superovulatórios nos cervídeos de clima temperado é obtida quando múltiplas administrações de FSH são associadas a baixas dosagens de eCG. A atividade LH deste último fármaco reforça o pico pré-ovulatório e estimula a ovulação de um maior número de folículos em curto espaço de tempo. Além disso, minimiza os efeitos negativos do estresse provocado pelo manejo (BERG et al., 1995). Esta associação também tem sido avaliada em outros ruminantes domésticos na tentativa de diminuir o número de aplicações do FSH e aumentar as respostas a SOV (COGNIE, 1999; SIMONETTI et al., 2007).

A frequência de aplicação do FSH é a maior limitação para o seu uso em diversas espécies (JACKSON et al., 2006; SIMONETTI et al., 2007), em especial os cervídeos que são muito suscetíveis ao estresse provocado pelo manejo (DIAS, 1997). Por este motivo, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de simplificar a utilização deste fármaco. Em cervídeos, o primeiro deles foi realizado com a espécie *C. elaphus* utilizando um implante subcutâneo de liberação lenta de FSH ('osmotic minipump' – Alzet Corp., Palo Alto, CA, USA), mas os resultados foram significativamente inferiores quando comparados ao modo tradicional de administração do fármaco (FENESSY et al., 1989) (Tabela 1). Pesquisas realizadas na década de noventa em bovinos demonstraram que uma aplicação subcutânea de FSH produz resultados semelhantes ao método tradicional de várias aplicações (BO et al., 1994), mas segundo Hockley et al. (1992), para que uma única aplicação subcutânea possa ser eficiente, é necessário que o animal apresente uma camada razoável de gordura subcutânea. Novos experimentos em ovinos (D'ALESSANDRO et al., 2001; KNIGHTS et al., 2003) e bovinos (TAKEDOMI et al., 1993, 1995; YAMAMOTO et al., 1993, 1994, 1995; SATOH et al., 1996; SUGANO & SHINOGI, 1999) demonstraram que a SOV pode ser induzida com uma única aplicação de FSH dissolvido em polivinilpirrolidona (**PVP**), sem prejuízo aos resultados.

O PVP é um polímero orgânico sintético com diferentes pesos moleculares (10.000, 40.000 ou 360.000), solúvel em água e em vários solventes orgânicos. É

utilizado na produção dos fármacos de longa ação devido à propriedade de se ligar e estabilizar as moléculas, prolongando sua taxa de liberação *in vivo* (D'ALESSANDRO et al., 2001). Embora sua liberação por via subcutânea possa ser mais lenta (BÓ et al., 1994), D'Alessandro et al. (2001) obtiveram resultados semelhantes ($6,2 \pm 1,2$ CL) ao método tradicional ($6,6 \pm 1,0$ CL) com a superovulação de ovelhas utilizando 250UI de FSH, dissolvido em PVP (peso molecular = 40.000, solução 30%), administrado por via intramuscular 24 horas antes da retirada do implante de progesterona. A concentração da solução de PVP parece ser mais importante do que o seu peso molecular, pois as melhores taxas ovulatórias foram obtidas com soluções concentradas (30-50%) de PVP de baixo peso molecular (10.000-40.000) (TAKEDOMI et al., 1993; D'ALESSANDRO et al., 2001). Após a aplicação do FSH dissolvido no PVP em vacas, foi observado que as concentrações plasmáticas de FSH aumentam gradualmente, atingem o pico máximo em 12 horas e a partir daí decrescem gradualmente, sendo que os níveis plasmáticos se mantêm por períodos de 3 a 60 horas após a administração do fármaco (TAKEDOMI et al., 1995).

No entanto, um inconveniente da utilização do eCG e do FSH, é a possibilidade de indução de resposta humoral, uma vez que estes produtos são produzidos em espécies heterólogas. Uma redução progressiva na atividade ovariana e na resposta ovulatória tem sido documentada em ovinos (FORCADA et al., 2000), caprinos (BARIL et al., 1992) e bovinos tratados freqüentemente com o eCG e/ou FSH (geralmente após a terceira aplicação). Por outro lado, outros autores relatam ausência de indução humoral em ovinos, que receberam o eCG por três anos consecutivos (DIEKMAN et al., 1995) ou 17 aplicações com 17 dias de intervalo (GHERARDI & LINDSAY, 1980). A ausência de resposta humoral ao FSH de origem ovina em *C. elaphus* também já foi relatada (ASHER et al., 2000). A possibilidade de indução de resposta humoral é um fato relevante (FORCADA et al., 2000), uma vez que boa parte dos experimentos utiliza os mesmos animais (delineamento "cross-over") nos testes de protocolos (revisado por BARUSELLI et al., 2006), na tentativa de anular a variabilidade individual de resposta (THATCHER et al., 2001).

O intervalo mínimo recomendado entre duas superovulações consecutivas deve ser de 5 semanas (REICHENBACH et al., 2002).

Monitoramento da ovulação e colheita de embriões

A contagem dos CL, como forma de avaliar a taxa de ovulação nos tratamentos de SOV é usual nas pesquisas com *C. elaphus*, e em geral, os exames laparoscópicos são realizados entre 14 e 15 dias após a retirada do DIP (MAGYAR et al., 1988; ASHER et al., 1992; BAINBRIDGE et al., 1996, 1998; ASHER et al., 2000). Já a funcionalidade dos CL é usualmente avaliada pela dosagem hormonal de progesterona (SARKAR et al., 2008; ZANETTI et al., 2009) e as maiores taxas de ovulação estão associadas ao aumento proporcional deste hormônio, devido ao aumento da massa de tecido luteal (ASHER et al., 1995, ASMIRIDIS et al., 2002).

Embora haja uma correlação entre a funcionalidade do CL e a fertilidade do tratamento, uma vez que ele será o responsável pela manutenção do início da gestação (ADAM et al., 1985; PEREIRA et al., 2006), nos tratamentos de SOV, a taxa de fertilidade é acessada pela avaliação dos embriões coletados e por comparação entre o número coletado e o número de CL observados. No entanto, é importante salientar que inúmeros fatores já comentados anteriormente podem interferir na taxa de fertilização e na qualidade dos embriões.

A colheita dos embriões nos cervídeos pode ser cirúrgica (por laparotomia ou laparoscopia) ou não cirúrgica, por pinçamento do fornex e passagem de catéter através da cérvix, 7 a 8 dias após a IA e/ou a cópula (JABBOUR et al., 1997). Embora a coleta não cirúrgica já tenha sido realizada com sucesso em *O. virginianus* (MAGYAR et al., 1988), não é um método indicado para os cervídeos devido à dificuldade de passagem pelo canal cervical (WALDHAM et al., 1989).

A colheita por laparotomia é realizada com o posicionamento de um catéter de Foley na base do útero através de uma pequena incisão no sentido longitudinal. Um balão é inflado neste local e o meio de coleta (solução salina em tampão fosfato (PBS) acrescido de 1% de soro fetal bovino) é introduzido através de uma agulha com seringa na junção útero-tubárica e colhido pelo catéter (ARGO et al., 1994; MORROW et al.,

1994; ASHER et al., 1995; BERG et al., 1995; DUARTE & GARCIA 1995; SOLER et al., 2007). A utilização do relaxante muscular, clenbuterol, é recomendada para facilitar a manipulação do trato reprodutivo durante a cirurgia (FENESSY et al., 1989, 1994; MORROW et al., 1994; BERG et al., 1995). Embora a laparotomia seja o método mais utilizado, a exteriorização do trato reprodutivo provoca aderências pós-operatórias no útero, ovidutos e ovários levando à diminuição da fertilidade e uma redução significativa do número de embriões coletados após repetidas cirurgias (TORRÈS & SEVELLEC, 1987). Além disso, as aderências dificultam progressivamente o procedimento cirúrgico e muitas vezes, impossibilitam a coleta (McKELVEY et al., 1986).

O desenvolvimento de técnicas menos invasivas como a laparoscopia, permite colheitas repetidas sem a formação de aderências (McKELVEY & ROBINSON, 1986; McKELVEY et al., 1986; LEGENDRE et al., 1988), mas é um procedimento que exige maior treinamento técnico para a obtenção de taxas de coleta semelhantes ao método convencional (laparotomia) (McKELVEY & ROBINSON, 1986). Em geral, a taxa de colheita por laparoscopia é menor do que a obtida com a laparotomia (62% vs 85%) mas, cada doadora pode passar por mais 7 colheitas sem problemas graves de aderências (BARIL et al, 1989). Um estudo realizado com caprinos (ANDRIOLI et al., 1999) comparou os três métodos de colheita (transcervical, laparoscopia e laparotomia), e concluiu que o recolhimento do líquido injetado para lavagem do corno uterino foi significativamente maior na colheita por laparotomia (83,7%) quando comparado a colheita por laparoscopia (72,2%). No entanto, à taxa de colheita de embriões foi maior na técnica laparoscópica (81,1% e 27,3%, respectivamente), possivelmente devido à alta porcentagem de aderências provocadas pela laparotomia, chegando a 100% após a terceira cirurgia. Além disso, o tempo necessário para execução da técnica laparoscópica foi menor do que o tempo necessário para a realização da laparotomia (aproximadamente 37 minutos e 56 minutos, respectivamente) (ANDRIOLI et al., 1999).

O desenvolvimento cronológico dos embriões de *C. elaphus* é semelhante aos embriões bovinos (HAMILTON & LAING, 1946). Entretanto, um estudo recente nesta espécie de cervídeo (BERG et al., 2007) demonstrou que os embriões entram no útero como blastocistos por volta de 5 a 6,5 dias após a ovulação e não como embriões de 16

células, 3 a 4 dias após a ovulação como ocorre nos bovinos (HAMILTON & LAING, 1946), ovinos (HOLST, 1974) e caprinos (AGRAWAL & BHATTACHARYA, 1984). Além disso, foram encontrados embriões em estágio de mórula compacta e blastocisto na junção útero-tubárica até 180-186 horas após a cópula (BERG et al., 2007). Esta é uma questão fundamental para a colheita dos embriões e pode explicar porque Duarte & Garcia (1995), só obtiveram sucesso na colheita da espécie *M. gouazoubira* quando realizaram a lavagem da tuba uterina juntamente com o útero. Da mesma forma, Fenessy et al. (1989) e Waldhalm et al. (1989) obtiveram bons índices de coleta nas espécies *C. elaphus* e *O. virginianus* (Tabela 1), respectivamente, quando realizaram a lavagem da junção útero-tubárica.

IV. MATERIAL E MÉTODO

Para a realização deste estudo foram desenvolvidos 2 (dois) experimentos. O experimento 1 comparou três tratamentos de SOV na espécie *Mazama gouazoubira*, enquanto o experimento 2 comparou dois tratamentos, em outros indivíduos da mesma espécie. Os tratamentos foram delineados no esquema “cross-over”, ou seja, em cada experimento todos os animais passaram por todos os tratamentos, com um intervalo de 44 dias após a remoção do CIDR®. Este delineamento foi escolhido como uma tentativa de controlar a variabilidade de cada indivíduo na resposta aos tratamentos (THATCHER et al., 2001), devido ao reduzido número de animais disponíveis e à dificuldade de manejo desta espécie. Os experimentos descritos a seguir não levaram em consideração as estações do ano, pois esta espécie não apresenta sazonalidade reprodutiva (FRÄDRICH, 1987; PINDER & LEEUWENBERG, 1997; SANTOS et al., 2001; BARROZO et al., 2001; PEREIRA et al., 2006).

Animais

Experimento 1

Para a realização do Experimento 1 foram utilizados 9 (nove) animais da espécie *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro), sendo 6 (seis) fêmeas (primíparas, com idades entre 2 e 6 anos e peso entre 15,3 e 19,9 kg) e 3 (três) machos (sendo um previamente vasectomizado e dois férteis, com 7 a 11 anos de idade e peso médio de 17,5Kg), pertencentes ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP. Os parâmetros seminais dos machos férteis foram analisados 15 dias antes do início do experimento e encontravam-se dentro dos parâmetros de normalidade da espécie (BARROZO et al., 2001).

Experimento 2

Para a realização do Experimento 2 foram utilizados outros 8 (oito) animais da mesma espécie sendo 7 (sete) fêmeas (primíparas, com idades aproximadas entre 2 e

4 anos e peso entre 12,9 e 20,6 kg) e 1 (um) macho fértil (com aproximadamente 3 anos de idade e 18Kg), pertencentes à mesma instituição. A análise seminal do macho fértil foi realizada conforme descrição do experimento 1.

Local e período de estudo

Experimento 1

De Abril a Dezembro de 2007, os animais foram mantidos em baias individuais (3,0m x 2,0m), mantendo contato auditivo e olfativo, e foram expostos a variação natural de luminosidade. Receberam dieta composta por alimentos concentrados utilizados para equínos (Tec Horse®-Purina®-Paulínia-São Paulo-Brazil), fornecida diariamente pela manhã e alimento volumoso: soja perene (*Neonotomia wighti*), alfafa (*Medicago sativa*) ou ramos de amoreira (*Morus alba*), que foram fornecidos de acordo com a sua disponibilidade no campo, numa quantidade média de 1Kg/animal/dia, no final da tarde (sempre molhado, com intuito de adiar o murchamento e mantê-los aceitáveis pelos animais por mais tempo). Água foi oferecida *ad libitum*.

Experimento 2

O estudo se desenvolveu no período de Março a Agosto de 2009 e os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas para o experimento 1.

Período de adaptação e monitoramento do ciclo estral

Experimento 1

Durante o primeiro mês foi realizado o período de adaptação dos animais ao manejo com monitoramento do ciclo estral para identificar a fase do ciclo de cada fêmea. Nesse período, o macho vasectomizado foi colocado em contato com cada fêmea, diariamente, durante 10 minutos, entre as 7:30 e 9:30 horas. O monitoramento do ciclo estral com o macho vasectomizado continuou diariamente durante todo o período experimental, exceto quando o macho fértil foi utilizado, no final dos tratamentos. O estro comportamental foi definido como o período em que as fêmeas permitiram a cópula (Figura 2) (PEREIRA et al., 2006).



Figura 2. Cópula na espécie *Mazama gouazoubira*.
(Foto: E. S. Zanetti).

Experimento 2

Durante o primeiro mês foi realizado o período de adaptação dos animais ao manejo com o monitoramento do ciclo, como no Experimento 1. Entretanto, como foi utilizado um macho fértil para monitorar o ciclo das fêmeas, a cópula foi interrompida com a retirada do macho da baia, caso a monta ocorresse e a fêmea permanecesse em estação. Neste caso, o estro comportamental foi definido como o período em que as fêmeas permitiram a monta e permaneceram em estação (Figura 2). Também foi realizado um período de adaptação à caixa de contenção, utilizada para administrar os fármacos. Durante os primeiros 15 dias, diariamente, os animais foram retirados das baias, individualmente, e encaminhados por cerca de 200 metros (por um corredor e com o auxílio de um tapume) até a caixa, onde recebiam alimento atrativo (banana) durante cinco minutos. Nos 15 dias seguintes e durante todo o período experimental, este manejo foi realizado em dias alternados e, a região posterior do animal foi tocada com as mãos do operador, ao mesmo tempo em que o alimento foi oferecido (Figura 3).



Figura 3. Caixa de contenção onde os fármacos foram administrados na espécie *Mazama gouazoubira* (Foto: C. C. Borella).

Sincronização do estro e tratamento de superovulação

Experimento 1

Inicialmente, em dia aleatório do ciclo estral, todas as fêmeas foram sincronizadas com um dispositivo intravaginal impregnado com 0,33g de progesterona, desenvolvido para ovinos e caprinos (CIDR® - Tipo T - *Controlled Internal Drug Release*® - Pfizer® - EUA), por 8 dias, seguido por uma aplicação intra-muscular (**i.m.**) de 0,5mg (0,5mL) de benzoato de estradiol (**BE**) (Estrogin® - Farmavet Produtos Veterinários Ltda - Brasil) no momento da inserção (D-8) e 250µg (1mL) de cloprostenol sódico (Ciosin® - Shering Plough Coopers® - Brasil), no momento da sua retirada (D0) (Figura 4). Posteriormente, para a indução da superovulação, as fêmeas foram divididas em 3 grupos (n=2): (i) **Tratamento A**, os animais receberam uma aplicação i.m. de 600UI de eCG (Folligon® - Intervet International BV - Holanda), no quarto dia após a inserção do CIDR® (D-4), (ii) **Tratamento B**, receberam uma aplicação i.m. de 300UI de eCG, no mesmo momento, (iii) **Tratamento C**, receberam uma aplicação i.m. de 250UI de FSH (Pluset® - Calier® - Espanha) dissolvido em polivinilpirrolidona (Peso molecular = 40.000, solução de 30%, PVP-40 – Sigma - USA) (D’ALESSANDRO et al., 2001), também no quarto dia após a inserção do CIDR® (Figura 4). Os tratamentos foram delineados no esquema “cross-over”, com um intervalo de 44 dias após a remoção do CIDR®. Todos os procedimentos

acima foram realizados com contenção física (DUARTE et al., 2001), entre 11:00 e 14:00 horas.

Experimento 2

Em dia aleatório do ciclo estral, as fêmeas foram divididas em 2 grupos (n=3): (i) **Tratamento D**, os animais receberam um dispositivo intravaginal impregnado com 0,33g de progesterona (CIDR® - Tipo T - *Controlled Internal Drug Release*® - Pfizer® - EUA) por 8 dias seguido por uma aplicação i.m. de 0,25mg (0,25mL) de BE (Estrogin® - Farmavet Produtos Veterinários Ltda - Brasil) no momento da inserção (D-8), 700UI de eCG (Folligon® - Intervet International BV, Holanda) no quarto dia após a inserção (D-4) e 265µg (1mL) de cloprostenol sódico (Ciosin® - Shering Plough Coopers® - Brasil), no momento da sua retirada do dispositivo (D0) (Figura 4), (ii) **Tratamento E**, os animais receberam dispositivo intravaginal impregnado com 0,33g de progesterona (CIDR® - Tipo T - *Controlled Internal Drug Release*® - Pfizer® - EUA) por 7,5 dias seguido por uma aplicação i.m. de 0,25mg (0,25mL) de BE (Estrogin® - Farmavet Produtos Veterinários Ltda - Brasil) no momento da inserção (D-7,5), 130mg (6,5mL) de FSH (Folltropin-V® - Bioniche Animal Health - Canadá) divididos em 8 doses iguais (com a primeira dose administrada 4,5 dias após a inserção do CIDR® (D-3) e a última 12 horas após a sua remoção (D0,5)) e 265µg (1mL) de cloprostenol sódico (Ciosin® - Shering Plough Coopers® - Brasil), no momento da sua retirada do dispositivo (D0) (Figura 4). Os tratamentos também foram delineados no esquema “cross-over”, como descrito no experimento 1. Apenas os procedimentos do D-8 e D-7,5 foram realizados com contenção física (DUARTE et al., 2001), entre 8:00 e 09:30 horas. Para a realização dos outros procedimentos os animais foram encaminhados até a caixa de contenção (Figura 3).

Identificação do estro e fertilização

Experimento 1

Os sinais do estro comportamental foram verificados colocando o macho fértil junto com as fêmeas (10 minutos a cada 6 horas) a partir de 6 horas após o término dos tratamentos até o momento que deixassem de aceitar a cópula (fim do estro); sendo que foi permitida uma cópula a cada período de 6 horas. O número médio de cópulas

nos Tratamentos A, B e C foi 6,4; 6,5 e 11,3; respectivamente. O estro comportamental foi definido como o período em que as fêmeas permitiram a cópula (Figura 2) (PEREIRA et al., 2006).

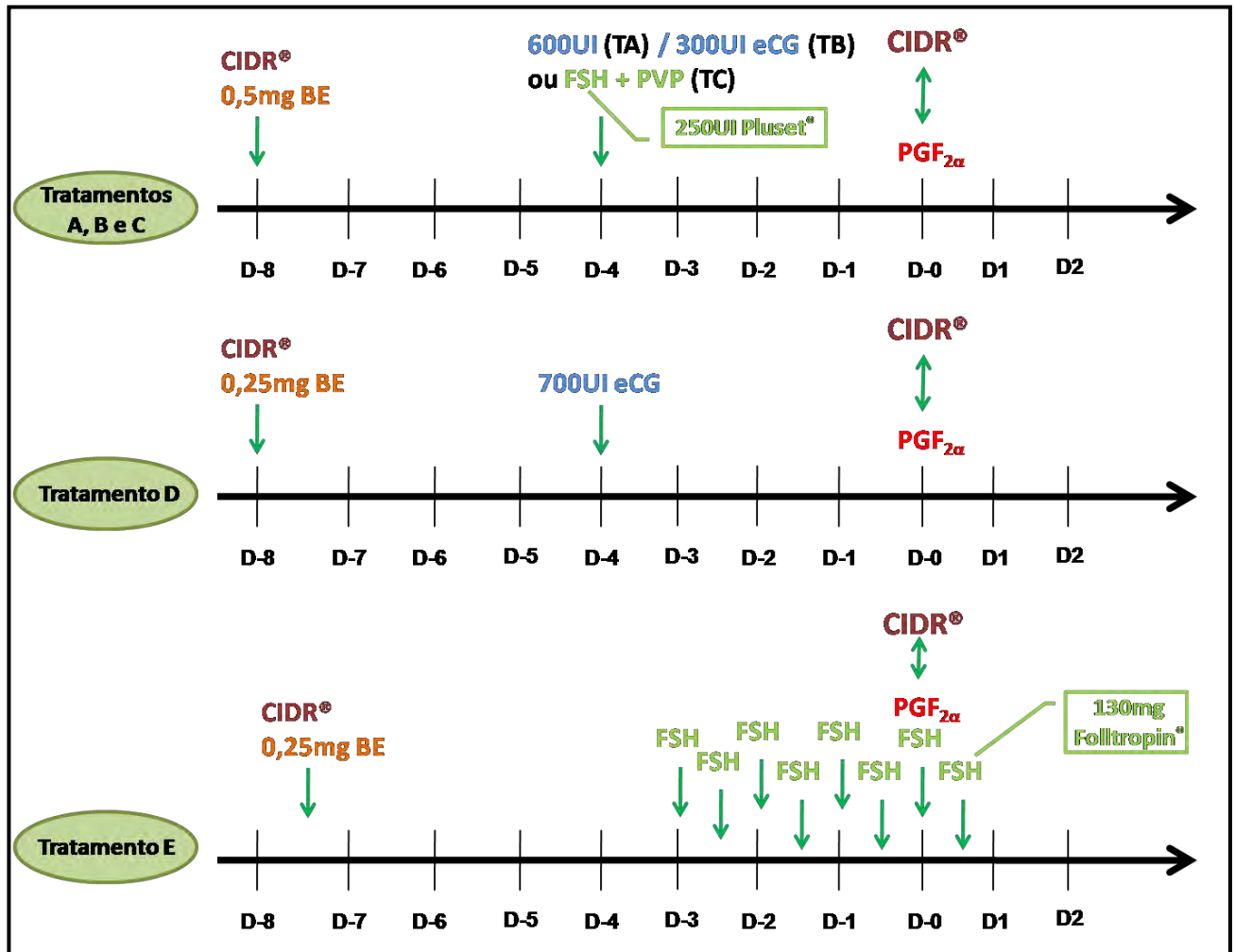


Figura 4. Esquema dos Tratamentos A (CIDR® por 8 dias + BE D-8 + 600UI eCG D-4 + cloprostenol D0), B (CIDR® por 8 dias + BE D-8 + 300UI eCG D-4 + cloprostenol D0) e C (CIDR® por 8 dias + BE D-8 + 250UI FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0), realizados no Experimento 1; e dos Tratamento D (CIDR® por 8 dias + BE D-8 + 700UI eCG D-4 + cloprostenol D0) e E (CIDR® por 7,5 dias + BE D-7,5 + 130mg FSH D-3 / D0,5 + cloprostenol D0), realizados no Experimento 2, com a espécie *Mazama gouazoubira*.

Experimento 2

Os sinais do estro comportamental foram verificados como no Experimento 1. Entretanto, o macho fértil foi colocado junto com as fêmeas por 10 minutos a cada 12 horas e foi permitida uma cópula a cada período de 12 horas, sendo que o número médio de cópulas nos Tratamentos D e E foi 3,3 e 3,0; respectivamente.

Avaliação da taxa de ovulação e colheita dos embriões

Experimentos 1 e 2

A avaliação da taxa de ovulação e a colheita dos embriões foram realizadas 7 (sete) dias após a primeira cópula ou 9 (nove) a 10 (dez) dias após o fim dos tratamentos nos animais que não apresentaram estro comportamental. O número total de CL e folículos grandes (maiores que 3mm) foram contados (a presença de pelo menos 2 (dois) CL foi definida como resposta superovulatória). Para isso, as fêmeas foram submetidas a jejum sólido e hídrico de 24 horas, contenção física e, posteriormente, anestesiadas com associação de 5,0 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Vetaset® - Fort Dodge - Brasil), 0,3 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer - Brasil) e 0,5 mg/Kg de midazolam (Dormonid® - Roche - Brasil), por via intravenosa (veia jugular). Para o início do procedimento cirúrgico, os animais foram intubados e mantidos em plano superficial com isoflurano (Forane® - Abbott - Brasil), na concentração média de 0.89 ± 0.08 V%, mensurada com vaporizador calibrado para esse fármaco (HB® Hospitalar - Brasil). Após posicionamento em decúbito dorsal, o acesso intra-venoso foi mantido no membro torácico (veia cefálica) com solução fisiológica 0,9%, foi realizada a preparação do campo cirúrgico com a tricotomia da região abdominal, anti-sepsia cirúrgica (Álcool 70% e Iodo-povidona) e colocação de panos de campo estéreis.

Para facilitar a visualização do útero e dos ovários, o animal foi reposicionado de modo que seus membros posteriores ficassem elevados aproximadamente 45°. Foi realizada uma incisão na pele com o bisturi (cerca de 0,2cm), na linha média, aproximadamente 10cm anterior à glândula mamária (Figura 5), para a introdução da agulha de Verres, após a suspensão manual do abdômen pelo auxiliar. Através desta agulha, o abdômen foi insuflado com dióxido de carbono (CO₂), cerca de 7 minutos, até

que o abdômen ficasse completamente distendido. Uma vez insuflado, a agulha de Verres foi retirada e a bainha tipo janela com válvula para CO₂ de 5mm, com trocáter de ponta protegida foi introduzida no mesmo local. Com a retirada do trocáter, a ótica laparoscópica (15cm / 5mm / 30°), conectada ao cabo de fibra ótica, à fonte de luz halógena de 250W e à micro-câmera foi inserida através da bainha. Após esses procedimentos, outra bainha tipo janela com válvula para CO₂ de 5 mm, com trocáter de ponta protegida, foi introduzida lateralmente à ótica para a inserção de uma pinça ginecológica atraumática (Figura 5), propiciando melhor manipulação e visualização dos ovários. Após a avaliação dos ovários, iniciou-se a colheita dos embriões (Figura 5): foi realizada uma terceira via de acesso, com a introdução de outra bainha (tipo diafragma sem válvula de 5mm) na linha média, 2cm posterior à bainha da ótica (Figura 5); em seguida, o corno uterino (do mesmo lado do ovário superovulado) foi pinçado próximo à bifurcação do útero (Figura 6a) e perfurado (em direção ao lúmen) com um trocáter (Pointer® - IMV Technologies - França), o mais caudal possível à bifurcação (Figura 6b). Após a perfuração e retirada do trocáter, a sonda de três vias (Ovicap® - IMV Technologies - França) foi introduzida no lúmen do útero (Figura 6c,d) e o balão foi inflado com 3mL de ar por uma das vias da sonda (Figura 6e). Em seguida o útero foi liberado e a junção útero-tubárica do corno foi pinçada (para evitar a perda de solução pelo oviduto). Pela segunda via da sonda, foram administrados 30mL de solução salina em tampão fosfato (**PBS**) (Nutricell Nutrientes Celulares® - Campinas - Brasil), aquecida a 37 °C e acrescida de 1% de soro fetal bovino (**SFB**) (Nutricell Nutrientes Celulares® - Campinas - Brasil) em cada corno uterino lavado. O líquido que retornou pela terceira via da sonda, foi coletado em recipiente graduado e mantido a 37°C. Posteriormente, foi transferido para placas de Petri e analisado em estereomicroscópio com aumento de 10x. Após o término da lavagem do corno, o balão foi desinflado e a sonda de três vias retirada do lúmen (Figura 6f). As incisões cirúrgicas da musculatura e pele foram suturadas com fio nylon 2-0 e os animais receberam uma aplicação i.m. de 40.000 UI/Kg de penicilina benzatina (Pentabiotico reforçado® - Fort Dodge – Brasil) e uma aplicação intra-venosa de 5mg/Kg de monofenilbutazona (Monofenew® - Vetnil – Brasil). A recuperação anestésica foi realizada em sala anexa ao centro cirúrgico.



Figura 5. (1) - Coleta de embriões por laparoscopia na espécie *Mazama gouazoubira*. Animal com membros posteriores elevados a 45°. (2) - Posicionamento das bainhas: (A) – ótica, incisão na linha média, 10cm da glândula mamária; (B) - sonda de três vias, incisão na linha média, 2cm posterior à ótica; (C) – pinça, incisão lateral à ótica. (Foto: A. F. Gualberto)

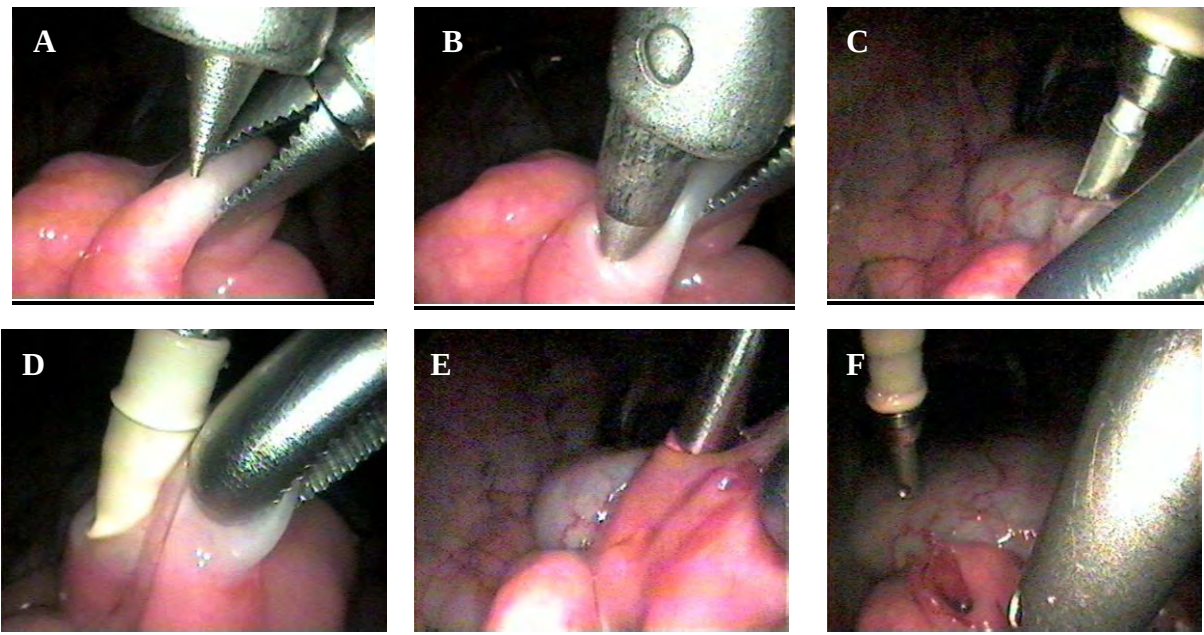


Figura 6. Procedimento laparoscópico para coleta de embriões da espécie *Mazama gouazoubira*: (A/B) - Apreensão do corno uterino próximo à bifurcação do útero e perfuração em direção ao lúmen, (C/D) - Introdução da sonda de três vias no lúmen uterino, (E) - Sonda posicionada e balão inflado, (F) - fim da lavagem do corno e retirada da sonda de três vias. (Foto: E. S. Zanetti)

Colheita de fezes

Experimento 1

Foi realizada colheita das fezes de todas as fêmeas do experimento durante um período de 28 dias por tratamento. Assim, a colheita foi iniciada, em dias alternados, 3 (três) dias antes do início dos tratamentos de sincronização/superoovulação e teve continuidade, diariamente, durante todo o período do tratamento até o 14º dia após o seu término; prosseguindo mais 3 (três) dias, em dias alternados. As fezes foram coletadas diariamente entre 7:30 e 9:30 horas e as baias foram limpas também diariamente às 18:00 horas para que as fezes fossem colhidas com no máximo 14 horas de defecadas. No entanto, o aspecto das fezes foi analisado antes da colheita e as que sugeriam defecação recente (síbalas claras, úmidas e brilhantes) foram preferidas devido ao seu período reduzido de exposição ao ambiente. Foram armazenadas em sacos plásticos, previamente identificados com o número do animal e data. Logo após a colheita, o material foi congelado (-20° C) e mantido nesta temperatura até o seu processamento.

Processamento das fezes

Experimentos 1

- **Homogeneização:** As amostras inicialmente foram secas em estufa (Mod. 320-SE® - Fanem® Ltda - São Paulo - Brasil) a 56°C por aproximadamente 72 horas (YAMAUCHI et al., 1997; HAMASAKI et al., 2001) e trituradas com auxílio de um martelo de borracha. Este processamento diminui a influência da água nas dosagens hormonais e favorece a homogeneização destas nos casos de disfunções gastroentéricas, como diarreia e constipação (BROWN & WILDT, 1997). Adicionalmente, as amostras processadas são facilmente manuseadas e armazenadas (BROWN E WILDT, 1997).
- **Extração dos metabólitos fecais:** Os metabólitos foram extraídos das amostras fecais assim como o descrito por Graham et al. (2001). Sucintamente, a 0,5g da amostra processada foram adicionados 5 ml de metanol a 80%. A mistura foi agitada

em vortex por 30 segundos, 12 horas em agitador horizontal (Mod. AP22® - Phoenix Ltda – Araraquara - Brasil) e novamente em vortex por 10 segundos. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 1500 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para análises posteriores.

- **Validação das dosagens hormonais:** os testes de validação propostos por Brown et al. (2004) e Wasser et al. (1991) foram utilizados para averiguar a eficácia das dosagens dos hormônios esteróides e seus metabólitos nas fezes de veado-catingueiro:

Teste de Paralelismo: Determina se as ligações entre o hormônio da amostra e o da curva-padrão com o anticorpo utilizado para o ensaio são similares. Inicialmente foram feitos 'pools' de extratos fecais, que foram diluídos seriadamente. A curva-padrão e a curva formada pela amostra diluída foram comparadas e este teste foi validado através da observação de uma disposição paralela entre elas. Através deste teste foi possível determinar a diluição adequada para as amostras fecais, que foi determinada pela diluição que apresentou aproximadamente 50% de ligação entre hormônio amostral e anticorpo no ensaio (a parte mais sensível da curva-padrão) (Figura 7).

Teste Dose-Resposta: Determina se alguma substância presente no extrato pode interferir na ligação entre o anticorpo e o hormônio. Este teste foi realizado adicionando-se uma quantidade conhecida de hormônio a uma amostra que apresente naturalmente uma baixa concentração do hormônio investigado e preparada na diluição determinada pela curva de paralelismo, e comparando-a com a quantidade mensurada no final do processo. Considera-se o teste validado quando o coeficiente de regressão linear for próximo de 1 e a inclinação da curva estiver entre 0,80 e 1,20. Neste estudo, o valor para o teste de dose resposta dos progestágenos foi $y = 0,99x + 1,14$, com $R^2 = 0,98$.

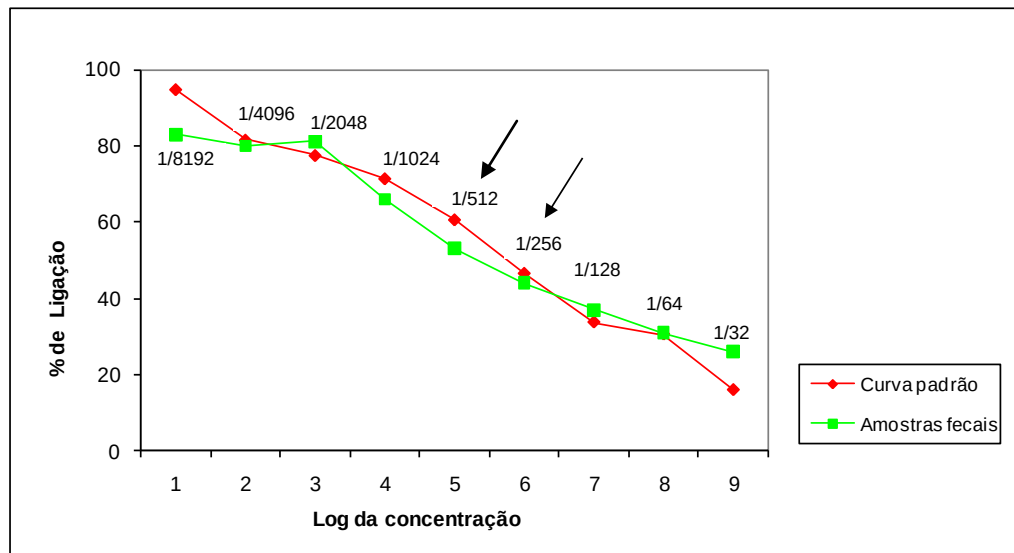


Figura 7. Teste de paralelismo da dosagem de progestágenos fecais na espécie *Mazama gouazoubira*. O paralelismo existente entre a curva padrão e a curva formada pela diluição seriada de extratos fecais mostra que os progestágenos presentes nas fezes desta espécie se ligam ao anticorpo utilizado no ensaio de forma similar ao que se ligam os progestágenos presentes na curva padrão. As diluições 1/250 e 1/500 foram utilizadas para os extratos fecais.

- **Ensaio Imunoenzimático (EIA):**

Experimento 1: As dosagens foram realizadas através de EIA, com a colaboração do Laboratório de Farmacologia da FCAV/UNESP Jaboticabal, utilizando o anticorpo CL425 (California University – Davis – CA - USA) para progestinas. Este anticorpo foi escolhido por apresentar alta reatividade cruzada com os metabólitos excretados nas fezes de *Mazama gouazoubira* - 5 α - e 5 β - pregnanes (POLEGATO, 2004). Todos os extratos fecais foram diluídos em tampão de diluição (1:250 e 1:500) e dosados em duplicata. Durante as dosagens hormonais foram utilizados como controles internos os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio, que asseguraram a acurácia, a repetibilidade e a comparabilidade dos dados obtidos com EIA. Os coeficientes de variação interensaio foram de 10,1% e 15,2%, para o controle com alta (~32% de ligação) e baixa (~75% de ligação) concentração de progestágenos, respectivamente. Os coeficientes de variação intraensaio foram menores que 12%. As concentrações de progestágenos estão expressas em nanograma por grama de fezes secas (ng/g fezes).

Medidas dos corpos lúteos

Experimento 1

As imagens da laparoscopia foram gravadas em sistema VHS, digitalizadas pelo programa “Pinnacle Studio 500 - USB”, no sistema AVI e, posteriormente, capturadas com o “Windows Movie Maker”. Os corpos lúteos de cada tratamento foram mensurados usando o programa computacional KS 300[®] (Kontron Elektronik – Munich - Alemanha) e correlacionados com a pinça cirúrgica (Figura 8). Todas as medidas foram geradas pela média de três aferições consecutivas.

Experimento 2

As imagens da laparoscopia foram gravadas em meio digital e foram analisadas como no Experimento 1.

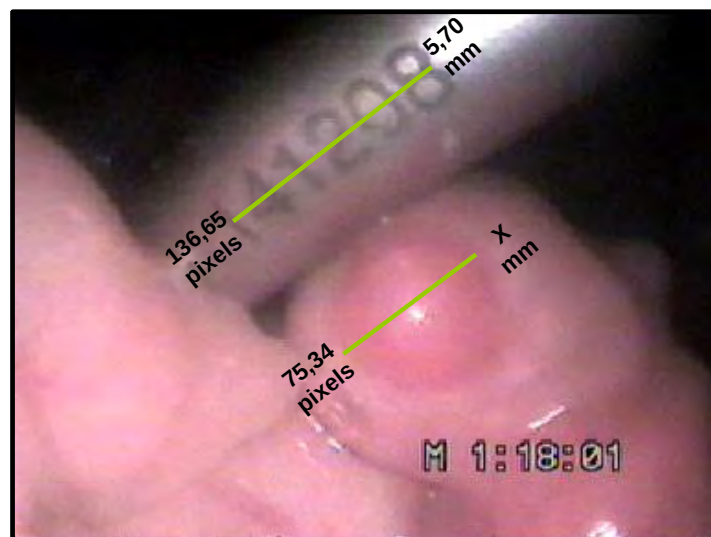


Figura 8. Representação esquemática da mensuração dos corpos lúteos da espécie *Mazama gouazoubira*, obtidos após os tratamentos de superovulação. (Fotos: E. S. Zanetti)

Tratamento de prostaglandina

Experimentos 1 e 2

Todas as fêmeas receberam uma aplicação de 250µg (1mL) de cloprostenol sódico (Ciosin[®] - Shering Plough Coopers[®] - Brasil), 14 dias após a retirada do CIDR[®] para induzir a

luteólise dos múltiplos corpos lúteos e prevenir a implantação de embriões que, eventualmente, permaneceram após a colheita.

Análise Estatística

Experimento 1:

Para análise dos dados (tempo para início do estro, duração do estro, número de CL, medida dos CL, número de folículos não ovulados, estímulo folicular total, concentrações de progestinas fecais no estro, na fase inter-luteal e luteal, tempo necessário para atingir a fase inter-luteal e duração desta fase), apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média (**EPM**), foi realizada a análise de variância de medidas repetidas seguidas pelo Teste de Tukey. Os dados não paramétricos (ocorrência ou ausência de superovulação e ocorrência ou ausência de estro comportamental) foram analisados pelo Teste exato de Fisher. Para a análise das concentrações de progestinas fecais nos dias 14 e 17 (após a remoção do CIDR[®]) dentro de cada tratamento e para acessar a significância do número médio de CL nos ovários direito e esquerdo dentro de cada tratamento foi utilizado o teste t de Student para amostras dependentes. A fêmea 3 foi excluída da média de duração do estro no Tratamento C e de 13 médias (folículos não ovulados, estímulo folicular total, número de CL, medida de CL, médias diárias dos progestágenos fecais, concentrações de progestágenos fecais na fase inter-luteal e luteal, tempo necessário para atingir a fase inter-luteal e duração desta fase, progestinas fecais nos dias 14 e 17 dentro de cada Tratamento) nos Tratamentos A e C, devido à repetição de estro comportamental após o Tratamento A e à duração do estro comportamental por mais de 150 horas após o Tratamento C. O Tratamento B teve apenas cinco animais tratados, devido ao óbito da fêmea 1 durante o período experimental. Os dados hormonais foram transformados em logaritmo devido à heterogeneidade das variâncias (MORROW et al., 1995). As concentrações basais de progestágenos foram definidas para cada fêmea separadamente, tomando-se o menor valor em cada um dos tratamentos e calculando a média $\pm$ desvio padrão (**DP**) a partir destes 6 (seis) valores (cinco valores no Tratamento B). De acordo com Thompson et al. (1998), os valores acima do critério (média $\pm$ 2DP) foram considerados indicativos de

fase luteal e valores abaixo deste critério foram considerados indicativos da fase inter-luteal. A concentração de progesterona na fase inter-luteal foi calculada como a média das concentrações de progestágenos nos dias de fase inter-luteal de cada uma das fêmeas separadamente; a média e o EPM foram calculados a partir destes 5 (cinco) valores. A concentração média de progesterona produzida pelos corpos lúteos (fase lútea) foi calculada a partir das concentrações médias de progestágenos de cada uma das fêmeas separadamente, no período compreendido entre a cirurgia laparoscópica (7º dia após a primeira cópula ou 9º-10º dia após o fim dos tratamentos nos animais que não apresentaram estro comportamental) e a última aplicação do cloprostenol (14º dia após a remoção do CIDR); a média e o EPM foram calculados a partir destes 5 (cinco) valores. A média dos diâmetros dos CL foi calculada a partir da média dos diâmetros dos CL de cada uma das fêmeas. Todas as análises foram feitas com o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Experimento 2:

Para análise dos dados (tempo para início do estro, duração do estro, número de CL, medida dos CL, número de folículos não ovulados, estímulo folicular total), apresentados como a média $\pm$ EPM, foi usado o teste t de Student para amostras independentes. No Tratamento E a fêmea 2 foi substituída pela fêmea 7, devido a uma alteração no protocolo do Tratamento E ocorrida na fêmea 2. A fêmea 5 foi excluída das médias de folículos não ovulados, estímulo folicular total e número de CL no Tratamentos D, pois apresentou comportamento de estro no dia do exame laparoscópico. A fêmea 3 foi excluída das mesmas médias no Tratamento E, devido à repetição do comportamento de estro. Todas as análises foram feitas com o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

V. RESULTADOS

Experimento 1

Estro e respostas ovarianas

Os resultados relativos ao estro e à resposta superovulatória estão apresentados na Tabela 2. A porcentagem de fêmeas em estro, fêmeas superovuladas, o tempo de intervalo entre o fim do tratamento e o início do estro e a duração do estro não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$). A variação de tempo entre o fim do tratamento e o início do estro foi entre 18-66 horas, 22-88 horas e 36-118 horas para os Tratamentos A, B e C, respectivamente. Dessa forma, a sincronia, ou seja, o intervalo entre a primeira e a última fêmea a exibir o comportamento de estro, foi menor no tratamento A e maior no Tratamento C.

Considerando as respostas ovulatórias, o Tratamento A resultou em maior número de CL quando comparado aos Tratamentos B e C ($P\leq 0,05$), sendo que o Tratamento B resultou em número intermediário de CL. A taxa média de folículos não ovulados não foi significativamente diferente entre os Tratamentos, mas a estimulação ovariana total do Tratamento A foi maior do que a dos Tratamentos B e C ($P\leq 0,05$) (Tabela 2). Quanto às mensurações dos CL, o Tratamento A produziu CL maiores do que os Tratamentos B e C ($P\leq 0,05$) (Tabela 2 e Figura 9). Não houve diferença significativa entre o número de ovulações nos ovários direito e esquerdo dentro de cada tratamento.

Durante a laparoscopia da fêmea 3, no Tratamento A, foi observada a presença de um grande folículo ovulatório e um CL em regressão, sendo que neste dia, também apresentou repetição do comportamento de estro. Esta mesma fêmea apresentou indicação de formação cística ovariana durante a laparoscopia do Tratamento C, pois seu comportamento de estro prolongou-se por mais de 150 horas. Ainda durante o Tratamento C, a fêmea 4 apresentou indícios de regressão luteal durante a observação laparoscópica e as fêmeas 1, 5 e 6 não apresentaram estruturas visíveis indicativas de CL, apesar dos níveis luteais de progesterona fecais.

Tabela 2. Dados relativos ao estro e à resposta superovulatória de seis fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* submetidas a três diferentes Tratamentos hormonais: A (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 600UI eCG D-4 + cloprostenol D0); B (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 300UI eCG D-4 + cloprostenol D0) e C (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 250UI FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0). Dados apresentados como média ($\pm$ EPM).

	Tratamentos			Valor P
	A	B	C	
Número de fêmeas tratadas / tratamento	6	5 ^a	6	
Fêmeas exibindo comportamento de estro (%)	5/6 (83,3%)	4/5 (80,0%)	4/6 (66,7%)	NS
Intervalo entre retirada do dispositivo de progesterona e início do estro (h) (intervalo)	40,40 $\pm$ 8.98 (18-66)	43,50 $\pm$ 15.37 (22-88)	67,75 $\pm$ 17,67 (36-118)	NS
Duração do estro (h) (intervalo)	38,40 $\pm$ 6.18 (24-60)	39,00 $\pm$ 7,14 (24-54)	66,00 $\pm$ 15,87* (42-96)	NS
Sincronia^b (h)	48	66	82	
Fêmeas superovuladas (%)	5/6 (83,3%)	2/5 (40,0%)	2/6 (33,3%)	NS
Nº Corpos lúteos (intervalo)	3,40 $\pm$ 0,68a* (2-6)	1,40 $\pm$ 0,24b (1-2)	0,80 $\pm$ 0,49b* (0-2)	0,01
Nº Corpos lúteos no ovário direito (intervalo)	1,80 $\pm$ 0,66* (0-4)	0,60 $\pm$ 0,24 (0-1)	0,40 $\pm$ 0,40* (0-2)	NS
Nº Corpos lúteos no ovário esquerdo (intervalo)	1,60 $\pm$ 0,51* (0-3)	0,80 $\pm$ 0,20 (0-1)	0,40 $\pm$ 0,40* (0-2)	NS
Medida corpo lúteo (mm) (intervalo)	7,33 $\pm$ 0,76a* (5,95-8,56)	3,94 $\pm$ 0,19b (3,4-4,43)	2,18 $\pm$ 0,49b* (1,69-2,66)	0,05
Nº Folículos não ovulados (intervalo)	1,40 $\pm$ 0,93* (0-5)	0,40 $\pm$ 0,24 (0-1)	0,60 $\pm$ 0,60* (0-3)	NS
Estímulo folicular total^c (intervalo)	4,80 $\pm$ 1,02a* (2-8)	1,80 $\pm$ 0,37b (1-3)	1,40 $\pm$ 0,60b* (0-3)	0,03

^a Tratamento B teve apenas cinco fêmeas tratadas, devido ao óbito da fêmea 1; ^b Intervalo entre a primeira e a última fêmea a exibir estro comportamental dentro de cada tratamento; ^c Somatória do número de corpos lúteos e número de folículos não ovulados; * Média $\pm$ EPM excluindo dados da fêmea 3, devido a repetição do comportamento de estro após o Tratamento A e a duração do comportamento de estro por mais de 150 horas após o Tratamento C. NS: $P > 0,05$; Valores com letras diferentes (a e b) nas linhas diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

As fêmeas 3, 4, 5 e 6 apresentaram estro comportamental (com duração de até 4 dias) após a administração de BE e continuaram a ciclar no período entre os tratamentos (Tabela 3). Com exceção da fêmea 3, todos os animais demonstraram

estro comportamental após a última administração de cloprostenol (14 dias após a retirada do CIDR®).

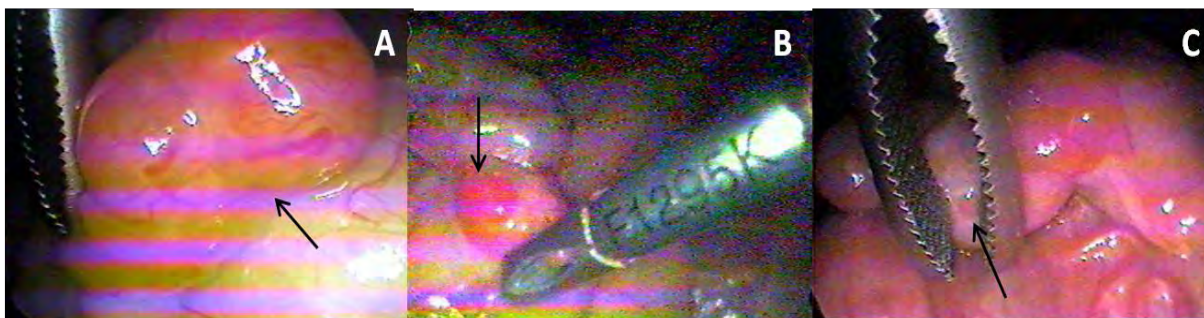


Figura 9. Aspectos morfológicos dos corpos lúteos de ovários da espécie *Mazama gouazoubira* nos Tratamentos A, B e C.

Tabela 3. Sequência da realização dos Tratamentos A (CIDR® por 8 dias + BE D-8 + 600UI eCG D-4 + cloprostenol D0); B (CIDR® por 8 dias + BE D-8 + 300UI eCG D-4 + cloprostenol D0) e C (CIDR® por 8 dias + BE D-8 + 250UI FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0) em cada uma das seis fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*, dia do ciclo estral (dia 0 = comportamento de estro) de cada animal no dia de início dos Tratamentos e ocorrência de estro comportamental após a administração de benzoato de estradiol (BE).

Fêmeas	1 ^a	2	3	4	5	6
Sequência dos Tratamentos	A/C/-	A/C/B	B/A/C	B/A/C	C/B/A	C/B/A
Dia do ciclo	30/30/-	11/30/31	7/6/17	16/8/9	4/9/11	29/26/12
Estro comportamental após a administração de BE	N/N/-	N/N/N	N/S/N	S/S/S	S/N/N	N/S/S
Tempo para início do estro após a administração de BE (h)	-/-/-	-/-/-	-/48/-	24/24/48	24/-/-	-/48/48
Duração do estro após a administração de BE (h)	-/-/-	-/-/-	-/72/-	72/96/72	72/-/-	-/72/24

^a Fêmea 1 não participou do Tratamento B devido ao seu óbito durante o período experimental; N = Não (fêmea não apresentou estro comportamental após a aplicação de BE); S = Sim (fêmea apresentou estro comportamental após a aplicação de BE).

Perfis endócrinos

Os perfis endócrinos com as concentrações médias diárias de progestágenos fecais nos Tratamentos A, B e C estão representados na Figura 10. As concentrações de progestágenos atingiram níveis inter-luteais $2,2 \pm 0,37$; $2,0 \pm 0,45$ e $3,8 \pm 0,20$ dias

após o término dos Tratamentos A, B e C, respectivamente; sendo que houve diferença significativa entre os dois primeiros (A e B) e o último tratamento (C).

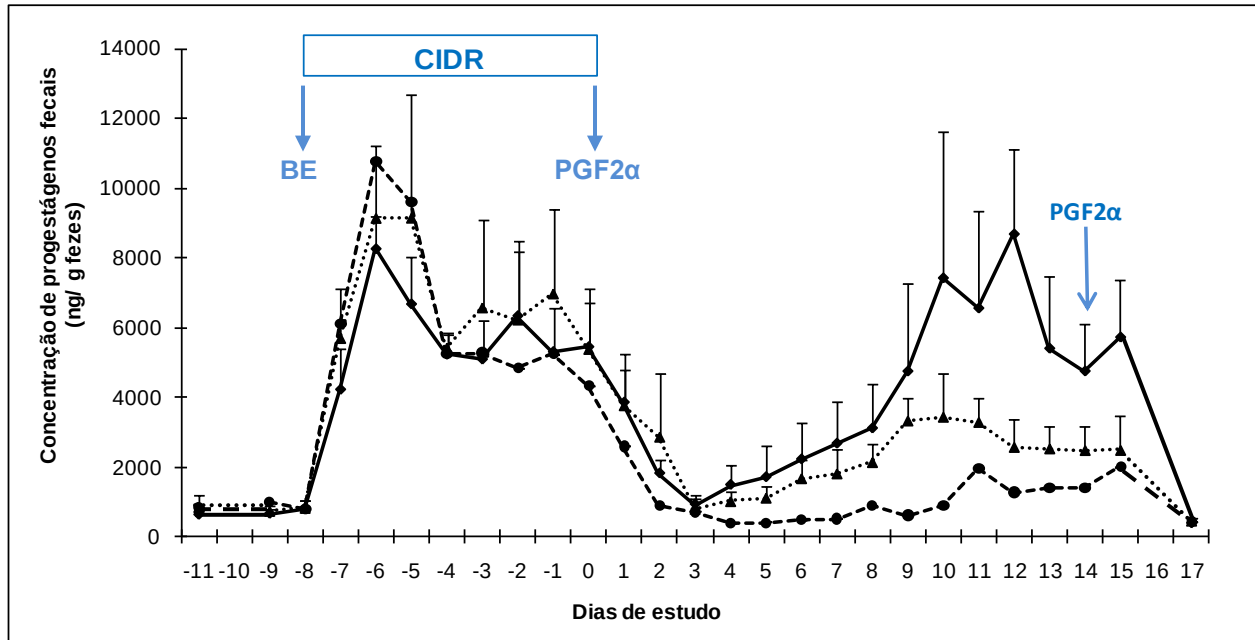


Figura 10. Perfis endócrinos das concentrações médias ($\pm$ EPM) diárias de progestágenos fecais de cinco fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* nos Tratamentos A (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 600UI eCG D-4 + cloprostenol D0) – *linha contínua*; B (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 300UI eCG D-4 + cloprostenol D0) – *linha pontilhada* e C (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 250UI FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0) – *linha tracejada*. *Média $\pm$ EPM excluindo dados da fêmea 3 dos Tratamentos A e C, devido a repetição do comportamento de estro após o Tratamento A e a duração do comportamento de estro por mais de 150 horas após o Tratamento C. O Tratamento B teve apenas cinco fêmeas tratadas, devido ao óbito da fêmea 1 durante o período experimental.

Os Tratamentos A, B e C apresentaram $5,4 \pm 1,81$ dias, $5,6 \pm 1,03$ dias e $4,8 \pm 1,11$ dias de fase inter-luteal ($P>0,05$), respectivamente, após a remoção da fêmea 3 das análises, devido à repetição do estro comportamental após o Tratamento A e a duração do estro maior que 150 horas após o Tratamento C. Entretanto, as concentrações de progestinas fecais nas fases inter-luteais dos Tratamentos A e B foram significativamente mais elevadas do que as do Tratamento C. Todos os tratamentos apresentaram aumento nas concentrações de progestinas fecais durante a

fase lútea ($P \leq 0,05$), sendo que o Tratamento A apresentou um aumento significativo em relação ao Tratamento C. As concentrações de progestágenos fecais nas diferentes fases dos Tratamento A, B e C estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações médias ($\pm$ EPM) de progestágenos fecais [P4] de seis fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*, em diferentes fases de três tratamentos hormonais: A (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 600UI eCG D-4 + cloprostenol D0); B (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 300UI eCG D-4 + cloprostenol (D0) e C (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 250UI FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0).

	Tratamentos		
	A	B ^a	C
[P4] Estro ^b (ng/g fezes)	923,71 $\pm$ 247,20ae*	780,26 $\pm$ 307,97ae*	398,99 $\pm$ 23,95ae*
[P4] Fase Inter-luteal (ng/g fezes)	1067,19 $\pm$ 207,53ae**	1002,81 $\pm$ 202,14ae	419,22 $\pm$ 19,01af**
[P4] luteal ^c (ng/g fezes)	6277,94 $\pm$ 2232,47be**	2970,15 $\pm$ 564,38bef	1374,82 $\pm$ 401,77bf**
[P4] pré-PGF ^d (ng/g fezes)	4753,98 $\pm$ 1366,12ce**	2470,71 $\pm$ 680,60cef	1398,50 $\pm$ 440,50cf**
[P4] pós-PGF ^e (ng/g fezes)	376,75 $\pm$ 71,31de**	440,56 $\pm$ 64,70de	444,87 $\pm$ 94,39ce**

^a O Tratamento tem apenas 5 fêmeas tratadas, devido ao óbito da fêmea 1; ^b [P4] um dia após a manifestação do estro comportamental; ^c [P4] no período compreendido entre a cirurgia laparoscópica e o 14º dia após a remoção do CIDR[®]; ^d [P4] no 14º dia após a remoção do CIDR[®]/dia da última aplicação do cloprostenol; ^e [P4] no 17º dia após a remoção do CIDR[®]/ 3 dias após a última aplicação do cloprostenol. *Média $\pm$ EPM excluindo os dados das fêmeas que não apresentaram estro comportamental nos respectivos tratamentos; **Média $\pm$ EPM excluindo os dados da fêmea 3, devido à repetição do comportamento de estro após o Tratamento A e à duração do comportamento de estro por mais de 150 horas após o Tratamento C. NS: $P > 0,05$; Valores com letras diferentes (a e b) nas colunas diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey; Valores com letras diferentes (c e d) nas colunas diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo Teste t de Student; Valores com letras diferentes (e e f) nas linhas diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

A administração de cloprostenol, 14 dias após a remoção do CIDR[®], está associada à destruição do tecido luteal em 72 horas, como indicado pelo declínio abrupto ($P \leq 0,05$) nas concentrações de progestágenos fecais nos Tratamentos A e B, (Tabela 4 e Figura 10). O Tratamento C também apresentou queda nas concentrações fecais de progestágenos, embora não tenha sido significativa.

Colheita de embriões

Em todos os procedimentos de lavagem uterina (Tratamento A - 4/5 fêmeas superovuladas, Tratamento B - 2/2 fêmeas superovuladas e Tratamento C – 1/2 fêmeas superovuladas) foi recolhido, no mínimo, 85% do meio de coleta, entretanto nenhum embrião foi coletado. Não foram observadas aderências pós-operatórias.

No momento da retirada CIDR[®] foi verificado que 3/6 (50,0%) animais apresentavam hiperemia da mucosa vaginal com secreção purulenta no Tratamento A. O mesmo foi observado em 4/5 (80,0%) fêmeas do Tratamento B e 2/6 (33,3%) fêmeas do Tratamento C.

Experimento 2

Estro e respostas ovarianas

Os resultados relativos ao estro e à resposta superovulatória estão apresentados na Tabela 5. A porcentagem de fêmeas em estro, fêmeas superovuladas, o tempo de intervalo entre o fim do tratamento e o início do estro e a duração do estro não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$). A variação de tempo entre o fim do tratamento e o início do estro foi entre 24-48 horas e 48-120 horas para os Tratamentos D e E, respectivamente. Dessa forma, a sincronia, ou seja, o intervalo entre a primeira e a última fêmea a exibir o comportamento de estro, foi menor no tratamento D do que no Tratamento E.

Considerando as respostas ovulatórias, o Tratamento D resultou em maior número de CL ($P\leq 0,05$). Entretanto, a taxa média de folículos não ovulados e a estimulação ovariana total não foram significativamente diferentes entre os Tratamentos (Tabela 5). Também não houve diferença significativa entre o número de ovulações nos ovários direito e esquerdo dentro de cada tratamento.

Tabela 5. Dados relativos ao estro e a resposta superovulatória de seis fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* submetidas a dois diferentes Tratamentos hormonais: D (CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 700UI eCG D-4 + cloprostenol D0) e E (CIDR[®] por 7,5 dias + BE D-7,5 + 130mg FSH D-3 / D0,5 + cloprostenol D0). Dados apresentados como média ($\pm$ EPM).

	Tratamentos		Valor P
	D	E	
Número de fêmeas tratadas / tratamento	6	6	
Fêmeas exibindo comportamento de estro (%)	3/6 (50,0%)	3/6 (50,0%)	NS
Intervalo entre retirada do dispositivo de progesterona e início do estro (h) (intervalo)	40,0 $\pm$ 8,0 (24-48)	92,0 $\pm$ 22,3 (48-120)	NS
Duração do estro (h) (intervalo)	40,0 $\pm$ 4,0 (36-48)	36,0 $\pm$ 6,9 (24-48)	NS
Sincronia^a (h)	24	72	
Fêmeas superovuladas (%)	6/6 (100%)	4/6 (66,7%)	NS
Nº Corpos lúteos (intervalo)	6,0 $\pm$ 1,7a* (2-10)	2,0 $\pm$ 0,3b** (1-3)	0,05
Nº Corpos lúteos no ovário direito (intervalo)	3,4 $\pm$ 1,29* (0-7)	1,0 $\pm$ 0,3** (0-2)	NS
Nº Corpos lúteos no ovário esquerdo (intervalo)	2,6 $\pm$ 0,7* (0-5)	1,0 $\pm$ 0,3** (0-2)	NS
Medida corpo lúteo (mm) (intervalo)	6,58 $\pm$ 0,27 (5,2-7,81)	4,70 $\pm$ 0,15 (4,16-5,19)	NS
Nº Folículos não ovulados (intervalo)	7,2 $\pm$ 3,0* (0-18)	8,4 $\pm$ 1,0** (6-11)	NS
Estímulo folicular total^b (intervalo)	13,2 $\pm$ 2,6* (6-20)	10,4 $\pm$ 1,1** (7-13)	NS

^aIntervalo entre a primeira e a última fêmea a exibir estro comportamental dentro de cada tratamento;

^bSomatória do número de corpos lúteos e número de folículos não ovulados *Média $\pm$ EPM excluindo dados da fêmea 5, no Tratamento D, pois apresentou comportamento de estro no dia do exame laparoscópico; **Média $\pm$ EPM excluindo dados da fêmea 3, no Tratamento E, devido à repetição do comportamento de estro. NS: $P > 0,05$; Valores com letras diferentes (a e b) nas linhas diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Student.

A fêmea 5, no Tratamento D, não apresentou comportamento de estro no final do tratamento, mas sim no dia do exame laparoscópico (10 dias após a retirada do CIDR[®]), onde foi observado a presença de 2 (dois) CL, 2 (dois) CL em regressão, e 2 (dois) grandes folículos ovulatórios. Ainda neste Tratamento, foi observada a presença de

corpos *albicans* e CL com indícios de regressão nas fêmeas 2 e 4, sendo que estes dois animais apresentaram comportamento de estro 12 e 14 dias, respectivamente, após o término do Tratamento D. O comportamento de estro não foi observado na fêmea 4, após a retirada do CIDR®.

A fêmea 3, no Tratamento E, apresentou repetição do estro comportamental 2 (dois) dias antes do exame laparoscópico (7 dias após o fim do tratamento), sendo que durante o exame foi observado 1 (um) CL, 1 (um) folículo grande e vários pequenos folículos difusos. Corpos *albicans* e CL com indícios de regressão também foram visualizados nas fêmeas 1 e 4, no Tratamento E.

As fêmeas 2, 3, 4, 5 e 6 apresentaram estro comportamental (com duração de até 3 dias) após a administração de BE e continuaram a ciclar no período entre os tratamentos (Tabela 6). Com exceção das fêmeas 2, 4 e 5, no Tratamento D, todos os outros animais demonstraram estro comportamental após a última administração de cloprostenol (14 dias após a retirada do CIDR®).

Tabela 6. Sequência da realização dos Tratamentos D (CIDR® por 8 dias + BE D-8 + 700UI eCG D-4 + cloprostenol D0) e E (CIDR® por 7,5 dias + BE D-7,5 + 130mg FSH D-3 / D0,5 + cloprostenol D0) em cada uma das seis fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*, dia do ciclo estral (dia 0 = comportamento de estro) de cada animal no dia de início dos Tratamentos e ocorrência de estro comportamental após a administração de benzoato de estradiol (BE).

Fêmeas	1	2	3	4	5	6	7
Sequência dos Tratamentos	D / E	D	D / E	D / E	D / E	D / E	E
Dia do ciclo	?* / ?	6	2 / 24	32 / 5	7 / 6	2 / 2	?
Estro comportamental após a administração de BE	N / N	S	S / N	N / S	S / N	N / S	N
Tempo para início do estro após a administração de BE (h)	- / -	48	72 / -	- / 48	48 / -	- / 48	-
Duração do estro após a administração de BE (h)	- / -	48	24 / -	- / 24	48 / -	- / 72	-

*Animal não demonstrou estro comportamental durante todo o período experimental, N = Não (fêmea não apresentou estro comportamental após a aplicação de BE), S = Sim (fêmea apresentou estro comportamental após a aplicação de BE).

Colheita de embriões

Em todos os procedimentos de lavagem uterina (Tratamento D - 3/6 fêmeas superovuladas e Tratamento E - 2/4 fêmeas superovuladas) foi recolhido, no mínimo, 74% do meio de coleta, entretanto nenhum embrião foi coletado. Embora a fêmea 3 tenha copulado após o Tratamento D, não foi realizada a sua colheita porque apresentou repetição de estro 2 (dois) dias antes do exame laparoscópico. Não foram observadas aderências pós-operatórias.

VI. DISCUSSÃO

Dentre os três tratamentos propostos para o Experimento 1 (Tratamento A - CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 600UI eCG D-4 + cloprostenol D0, Tratamento B - CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 300UI eCG D-4 + cloprostenol D0 e Tratamento C - CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 250UI FSH+PVP D-4 + cloprostenol D0) e os dois tratamentos propostos para o Experimento 2 (Tratamento D - CIDR[®] por 8 dias + BE D-8 + 700UI eCG D-4 + cloprostenol D0 e Tratamento E - CIDR[®] por 7,5 dias + BE D-7,5 + 130mg FSH D-3 / D0,5 + cloprostenol D0), os Tratamentos com as maiores doses de eCG (A e D) produziram os maiores números de corpos lúteos, como já havia sido relatado por Duarte & Garcia (1995), após o uso de esponja de MPA por 13 ou 14 dias (troca no dia 7) com 700UI de eCG no dia da retirada da esponja. Entretanto, neste último estudo foi relatada a ocorrência de cistos foliculares e a inclusão da gonadotrofina coriônica humana (**hCG**) no protocolo para induzir a ovulação 3 dias após a aplicação do eCG ou no início do estro. É provável que a ocorrência de cistos foliculares neste caso e em outros, onde a ocorrência de grandes folículos com falha na ovulação já foi relatada (*C. elaphus* – BAINBRIDGE et al., 1995, 1996, 1998; *D.dama* - THOMPSON & ASHER, 1988; ovinos - JABBOUR & EVANS, 1991) esteja associada ao momento de aplicação das gonadotrofinas, pois até o presente momento, os protocolos de sincronização utilizados para a SOV em cervídeos (Tabela 1) não consideravam o desenvolvimento dos folículos ovarianos (BAINBRIDGE et al., 1995; McCORKELL et al., 2008). Em bovinos, parte da variabilidade das respostas ovarianas à SOV tem sido relacionada ao estatus das ondas foliculares no início dos tratamentos (ARMSTRONG et al., 1993), ou seja, o início dos tratamentos na presença de folículo dominante (RUBIANES et al., 1997; BURKE et al., 1999) resulta em menor número de ovulações e embriões e maior número de folículos anovulatórios e variabilidade nas respostas à SOV.

A melhor média de ovulações obtida no Experimento 1 (Tratamento A – $3,40 \pm 0,68$ CL) foi similar às médias obtidas nas espécies *E. davidianus* (3,83 CL - ARGO et al., 1994), *O. virginianus* (3,10 CL - WALDHALM et al., 1989) e *C. elaphus* não selecionados para um programa de TE (2,15 CL – ASHER et al., 2000) e inferior as

médias de ovulação obtidas nas espécies *D. dama* (6 a 10 CL – FENESSY et al., 1994; MORROW et al., 1994; ASHER et al., 1995) e *C. elaphus*, em geral, já selecionados para programas de TE (média de 5 a 12 CL - FENESSY et al., 1989, 1994; ASHER et al., 1992, 1995; ARGO et al., 1994; BAINBRIDGE et al., 1996; SOLER et al., 2007). Apesar da melhor média obtida no Experimento 2 (Tratamento D – $6,0 \pm 1,7$ CL) ser compatível com a médias encontradas na literatura e superior ao Experimento 1, é necessário cuidado ao comparar e interpretar estes dados, pois as variações intra/interespecíficas e os diferentes protocolos de sincronização/SOV utilizados nos diversos experimentos podem influenciar significativamente os resultados (BERG et al., 1995).

Três fatores principais podem ser a explicação das diferenças entre as taxas ovulatórias obtidas no Tratamento A (Experimento 1) e Tratamento D (Experimento 2): 1) já foi demonstrado que a presença de altos níveis de estradiol no momento da inserção do implante de progesterona e no início da administração das gonadotrofinas tem impacto negativo na resposta superovulatória (KUMAR et al., 2003; BARTLEWSKI et al., 2008) e a dose de BE utilizada com a fonte de progesterona para a sincronização da onda folicular, no Experimento 1, pode ter sido elevada para a espécie *M. gouazoubira*, pois várias fêmeas demonstraram estro comportamental por um período prolongado, apesar da presença do CIDR®. Este fato também pode ter influenciado todos os tratamentos do Experimento 1; 2) a dose de eCG também pode ter influenciado as taxas ovulatórias, pois a dosagem utilizada no Tratamento D foi maior do que a dose do Tratamento A e estas duas dosagens foram inferiores à outras anteriormente relatadas para outras espécies de cervídeos (1000UI - *O. virginianus* - WALDHAM et al. 1989; 1200UI – *C. elaphus* – BAINBRIDGE et al., 1996, 1998); 3) o uso repetido do eCG nos Tratamentos A e B do Experimento 1 pode ter provocado uma reposta imune humoral que está correlacionada com a redução da atividade ovariana e da resposta ovulatória, geralmente após a terceira aplicação (BARIL et al., 1992; FORCADA et al., 2000), pois a redução da resposta está relacionada ao aumento dos anticorpos em animais tratados repetidamente com este fármaco. No entanto, quando hormônios diferentes (FSH ou eCG) são intercalados em tratamentos repetidos, a

resposta à SOV sofre menor influência (VIUDES DE CASTRO et al., 2009), como já relatado em jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno, após seis tratamentos hormonais alternados entre FSH e eCG (PAZ, 2004). Por outro lado, alguns estudos demonstraram a refratariedade de inúmeras espécies a tratamentos repetidos com gonadotrofinas (GHERARDI & LINDSAY, 1980; DIEKMAN et al., 1995; ASHER et al., 2000).

Além destes fatores, é importante considerar que as taxas ovulatórias dos dois experimentos podem ter sido influenciadas pela administração das gonadotrofinas em momento inadequado da onda folicular, pois o primeiro estudo que induziu a emergência da onda folicular em cervídeos foi desenvolvido em *C. elaphus*, em anestro, e demonstrou o início de uma nova onda $5,2 \pm 0,2$ dias após a administração de progesterona e estradiol-17 β (McCORKELL et al., 2008); ou ainda que o início dos tratamentos de SOV no momento da emergência da onda não elimina a variabilidade da resposta superovulatória (BÓ et al., 2008).

Apesar do Experimento 2 ter resultado em maior número de ovulações, é provável que a redução da dose de BE não tenha sido suficiente porque as fêmeas continuaram a apresentar estro comportamental por até 3 dias e os dois tratamentos deste experimento resultaram em grande número de folículos anovulatórios. Em geral, a ocorrência destes folículos está associada ao uso do eCG, que devido à sua ação prolongada, provoca crescimento folicular disperso e folículos anovulatórios em número proporcional às doses utilizadas (GONZALEZ-RÉYNA et al., 1999), no entanto, a ocorrência dos folículos anovulatórios no Experimento 2 parece não estar exclusivamente relacionada ao uso do eCG, pois o tratamento com FSH também resultou em inúmeros folículos anovulatórios. Outras causas que podem estar associadas à ocorrência destes folículos é a deficiência ou inexistência do pico de LH após os tratamentos, a manutenção de altas concentrações deste hormônio por tempo prolongado ou ainda a presença de folículos não responsivos ou menos responsivos ao LH, devido à diminuição do número de receptores para este hormônio (LOPEZ-DIAZ & BOSU, 1992). Além disso, devemos considerar que a dose de BE utilizada no Experimento 2 pode ter sido insuficiente para sincronizar a onda folicular, propiciando a ovulação precoce de um folículo dominante, no início dos tratamentos superovulatórios,

com conseqüente formação de CL e inibição da ovulação dos demais folículos (STOCK et al., 1996).

As altas concentrações de estradiol secretadas pelos folículos anovulatórios ou simplesmente pelo ovário hiperestimulado, durante e após o período periovulatório, também podem diminuir significativamente as taxas de ovulação, o estímulo total ovariano e as taxas de fertilidade, além de propiciar a regressão prematura de aproximadamente 10% dos CL, como já foi relatado em *C. elaphus* (BAINBRIDGE et al., 1995, 1996, 1998), e outras espécies domésticas (RUBIANES et al., 1997; COGNIÉ et al., 2003). Embora, os dois tratamentos do Experimento 2 tenham resultado em grande número de folículos não ovulados, o Tratamento D apresentou três animais com repetição do estro comportamental e indícios de regressão prematura do CL, enquanto o Tratamento E teve apenas uma fêmea com os mesmos sinais, sugerindo que a regressão prematura esteja mais associada ao uso do eCG e à sua ação prolongada do que a simples ocorrência de folículos anovulatórios. Este fato pode ser confirmado pelo ocorrido no Tratamento A, onde não houve grande número de folículos anovulatórios e uma fêmea apresentou repetição do estro comportamental e indícios de regressão prematura do CL. O estresse também deve ser considerado como um fator importante para a ocorrência de folículos anovulatórios e de regressão prematura de CL, devido aos transtornos endócrinos causados pela liberação de corticosteróides (PETERS & LAMMING, 1989) e/ou pela produção de progesterona pela glândula adrenal (ASHER & THOMPSON, 1989), que podem inibir o pico de LH. Entretanto, como só houve indicação de formação cística ovariana em uma fêmea do Tratamento C, sugere-se que, neste estudo, o estresse tenha mais influência no crescimento e emergência folicular do que na indução de uma onda inadequada de LH (CAVALIERI et al., 2002).

A menor dose de eCG utilizada (Tratamento B) produziu respostas ovulatórias e estímulo total ovariano próximos da resposta obtida para esta mesma espécie após a sincronização de estro com protocolo sem o BE e o eCG (ZANETTI et al., 2009), embora tenha sido suficiente para induzir resposta superovulatória mínima em duas fêmeas. Assim, a taxa de ovulação aumentou de maneira dose-dependente

(GONZÁLEZ-REYNA et al., 1999) em relação ao aumento da dose de eCG para 600UI (Tratamento A) e 700UI (Tratamento D).

Apesar da estimulação ovariana total média do Tratamento B e C serem semelhantes, 100% dos animais no Tratamento B apresentaram pelo menos um corpo lúteo, enquanto apenas 33,3% das fêmeas no Tratamento C apresentaram o mesmo resultado. Este fato pode estar relacionado não só ao uso do FSH-PVP em uma única dose, mas ao próprio uso deste hormônio, uma vez que algumas espécies de cervídeos não respondem ao uso isolado deste fármaco (ARGO et al., 1994). No entanto, o Tratamento E apresentou um estímulo folicular total semelhante ao Tratamento D e aos melhores tratamentos já descritos na literatura para outras espécies de cervídeos (Tabela 1), apesar de ter induzido apenas resposta ovulatória mínima. De qualquer forma, estes resultados sugerem que a administração do FSH-PVP em uma única aplicação no quarto dia após a inserção do CIDR[®] (Tratamento C) foi inadequada para estimular a SOV; enquanto o tratamento de múltiplas doses (Tratamento E) foi capaz de estimular a SOV, mas inadequado para propiciar o estímulo ovulatório. É provável que a utilização de baixas doses de eCG no final dos tratamentos de FSH para a SOV em outras espécies de cervídeos (Tabela 1) tenha como objetivo principal propiciar um estímulo gonadotrófico extra para a ovulação (BERG et al., 1995), especialmente porque, em geral, o regime de múltiplas aplicações é influenciado pelos efeitos do estresse (WENKOFF & BRINGANS, 1991).

Em bovinos, os níveis plasmáticos de FSH aumentaram gradualmente após uma aplicação de FSH dissolvido em PVP, atingiram a concentração máxima 12 horas após a administração e começaram a diminuir gradativamente, sendo que as concentrações plasmáticas foram mantidas por até 60 horas após a aplicação (TAKEDOMI et al., 1995). Como a retirada do dispositivo de progesterona ocorreu 96 horas após a aplicação, pode-se deduzir que neste momento o PVP não foi capaz de manter uma atividade suficiente do FSH para sustentar o crescimento de múltiplos folículos (D'ALESSANDRO et al., 2001). Outra possibilidade que pode ser responsável pelas baixas taxas de ovulação e pelos distúrbios observados nas fêmeas 3 e 4 durante o Tratamento C, é a alta dose de FSH administrada de uma só vez (D'ALESSANDRO et

al., 2001). A exposição a altas concentrações de FSH podem prejudicar os folículos, causando falhas no desenvolvimento folicular e na ovulação (TAKEDOMI et al., 1995). No entanto, a associação FSH-PVP já foi utilizada com sucesso em outras espécies domésticas com resultados semelhantes aos protocolos de injeções múltiplas (TAKEDOMI et al., 1995; SUGANO & SHINOBI et al., 1999; D'ALESSANDRO et al., 2001), mas não há relatos da sua utilização em cervídeos. Tentativas semelhantes foram feitas, em *C. elaphus*, utilizando um implante subcutâneo para a administração de FSH, resultando em baixas taxas de ovulação (3,0CL) (FENESSY et al., 1989).

O menor número de fêmeas demonstrando estro comportamental no Experimento 2 em relação ao Experimento 1 deve ser avaliado com cuidado, pois dois animais (1 e 7) já não apresentavam estro comportamental durante o período de adaptação. Além disso, os animais passaram por um manejo diferente durante o período experimental, que pode ter provocado maiores condições de estresse. Entretanto, deve-se considerar que as fêmeas que apresentavam estro no período de adaptação continuaram a ciclar regularmente no intervalo entre os Tratamentos, sugerindo que o estresse possivelmente provocado pelo manejo deste período, não exerceu influência significativa nesta característica reprodutiva.

Embora a relação direta entre estímulo ovariano total e menor tempo de início do estro já tenha sido descrita na espécie *C. elaphus* (ASHER et al., 1995) como uma consequência direta do aumento precoce das concentrações de esteróides foliculares necessários para o início do estro comportamental (JABBOUR et al., 1994), parece que este adiantamento do tempo de início do estro tenha maior relação com o uso do eCG do que com o estímulo ovariano total provocado por ele, pois os Tratamentos A e D induziram estímulo aproximadamente duas e sete vezes maior, respectivamente, do que o Tratamento B e seus tempos de início do estro são praticamente iguais. O aumento da dose de eCG também diminuiu o tempo de sincronia dos Tratamentos D, A e B, evidenciando o reforço do pico pré-ovulatório e o estímulo de ovulação de um maior número de folículos em um curto espaço de tempo (BERG et al., 1995). Além disso, o tempo para início do estro e o número de dias para atingir a fase inter-luteal dos Tratamentos A e B foram inferiores aos obtidos com a sincronização do estro

(CIDR[®] por 8 dias com cloprostenol 8ºdia) da espécie *M. gouazoubira* ($70,5 \pm 5,0$ h e $3,2 \pm 0,73$ dias, respectivamente) (ZANETTI et al., 2009). Além do tempo para início do estro e da fase inter-luteal terem sido adiantados, o rápido aumento dos perfis de progesterona fecal após a retirada do CIDR[®], demonstrado pelas maiores concentrações de progestágenos fecais nas suas fases inter-luteais quando comparadas ao Tratamento C, indicam que algumas ovulações podem ter ocorrido imediatamente após a retirada do CIDR[®] ou até mesmo durante a sua inserção na ausência de LH endógeno, favorecendo o rápido início da função luteal (ARGO et al., 1994). Ovulações em animais que não exibiram o pico de LH endógeno após o tratamento com eCG já foram observadas na espécie *D. dama* (JABBOUR et al., 1993). Este fato é decorrente de uma ação direta do eCG no ovário, devido à sua potente ação LH e longa meia-vida (GONZALEZ-REYNA et al., 1999) que pode prolongar o tempo de ação do estrógeno, dispersar as ovulações e levar a um período inter-luteal mais longo do que aquele obtido com a sincronização de estro da espécie *M. gouazoubira* ($4,6 \pm 1,57$ dias) (ZANETTI et al., 2009).

Por outro lado, o tempo de início do estro, o número de dias para atingir a fase inter-luteal e a duração da fase inter-luteal no Tratamento C foram semelhantes aos parâmetros obtidos com a sincronização do estro na espécie *M. gouazoubira* ($70,5 \pm 5,0$ h, $3,2 \pm 0,73$ dias e $4,6 \pm 1,57$ dias, respectivamente), apesar da duração do estro comportamental ter sido praticamente o dobro da obtida com a sincronização ($34,7 \pm 4,5$ h) (ZANETTI et al., 2009). Este fato sugere que houve uma secreção prolongada de estrógeno por folículos que apresentaram falha na ovulação. A lenta liberação de FSH prolongou a secreção de estrógeno, apesar de não ter sido suficiente para sustentar o crescimento final de múltiplos folículos. A dissociação entre comportamento de estro e onda pré-ovulatória de LH endógeno já foi demonstrada na espécie *D. dama* (ASHER et al., 1995) e ovelhas superovuladas (COGNIE et al., 2003). Já no Tratamento E, a duração do estro comportamental foi praticamente o mesmo da duração dos Tratamentos A, B e D e do estro sincronizado (ZANETTI et al., 2009); enquanto o tempo para início do estro foi aproximadamente 25 horas maior do que o

tempo do Tratamento C, possivelmente devido ao menor tempo de inserção do dispositivo de progesterona (JABBOUR et al., 1991).

Os perfis de concentração de progestágenos fecais na fase luteal associados com a visualização cirúrgica dos corpos lúteos evidenciaram uma fonte luteal de secreção seguida de ovulação nos três tratamentos do Experimento 1, com aumento da taxa de ovulação associada a uma maior secreção de progesterona como consequência do aumento significativo de massa de tecido luteal (ASHER et al., 1995). Entretanto, em três fêmeas (1, 5 e 6) do Tratamento C, foram observados níveis luteais de progestágenos fecais, sem a presença de CL. Este fato sugere que a progesterona destes animais possa ser de origem adrenal (ASHER et al., 1989) ou pela ocorrência de ovulações tardias ou ainda que os tecidos luteais não estavam visíveis (HARDER & MOORHEAD, 1980). Os CLs dos Tratamentos D e E apresentaram características e tamanhos compatíveis com as estruturas lúteas dos Tratamentos A e B, sugerindo funcionalidade luteal.

Apesar das concentrações de progesterona no dia da colheita de embriões serem positivamente relacionadas com o total de embriões colhidos em cabras (KUMAR et al., 2003); as possíveis falhas de fertilização e a ausência de embriões coletados neste estudo podem ser, em parte, atribuídas aos efeitos de altas concentrações de estradiol secretadas por grandes folículos não ovulados ou pelos próprios folículos em crescimento, conforme descrito anteriormente em cervídeos (ARGO et al., 1994; MORROW et al., 1994; ASHER et al., 1995) e ovinos (JABBOUR & EVANS, 1991) superovulados.

A manutenção de altas concentrações de estradiol durante ou próximo ao processo ovulatório induzem desordens na fertilização e no desenvolvimento embrionário, provocando alterações no transporte espermático, no transporte dos oócitos pelo trato reprodutivo e no desenvolvimento oocitário (impedindo sua maturação bioquímica), com diminuição significativa na taxa de recolhimento de oócitos e embriões, devido alterações no transporte embrionário através do trato reprodutivo e desenvolvimento embrionário anormal (VEIGA-LOPEZ et al., 2006). Segundo Kumar et

al. (2003), altas concentrações de estradiol tem um impacto maior na taxa de recolhimento de embriões e sua qualidade do que em seu número.

Alguns outros fatores podem ter contribuído para a ausência de embriões neste estudo: 1) o uso da cópula natural pode ter prejudicado ainda mais o transporte espermático sob altas concentrações de estradiol, como já demonstrado em animais da espécie *D. dama* superovulados, que apresentaram baixas taxas (0-30%) de fertilização (THOMPSON & ASHER, 1988); 2) o uso do eCG em algumas espécies como *D. dama* resulta em prejuízos no recrutamento, maturação folicular e na fertilidade (ASHER et al., 1995); 3) quando o CL estava presente em apenas um ovário, foi realizada a lavagem do corno uterino do mesmo lado e possíveis embriões que estariam no corno contralateral foram perdidos e, no caso da fêmea 4 do Tratamento A e da fêmea 6 do Tratamento D, parte do líquido injetado no corno foi perdido pela junção útero-tubárica, provocando uma possível perda dos embriões, como já observado em *O. virginianus* (WALDHALM et al., 1989). Finalmente, embora a colheita de embriões por laparoscopia tenha sido realizada com sucesso em ovinos (McKELVEY & ROBINSON, 1986; McKELVEY et al., 1986; LEGENDRE et al., 1988), este método de colheita pode não ter sido adequado para a espécie estudada, pois os materiais utilizados foram desenvolvidos para ovinos e caprinos e o trato reprodutivo da espécie *M. gouazoubira* apresenta tamanho inferior a estas espécies domésticas, dificultando a introdução do catéter no corno uterino e o procedimento de lavagem, especialmente a lavagem da tuba, onde os embriões poderiam estar no período da colheita (DUARTE & GARCIA, 1995; BERG et al. 2007). Os melhores índices de colheita de embriões em cervídeos foram obtidos com técnica de laparotomia (Tabela 1), no entanto, esta técnica dificulta os experimentos que são delineados no esquema “cross-over”, pois propicia a ocorrência de aderências que dificultam e até impedem as colheitas sucessivas (ANDRIOLI et al., 1999).

No Experimento 1, em todos os casos onde foi evidenciado ovulação e/ou aumento dos níveis de progestágenos fecais na fase luteal, a administração de cloprostenol 14 dias após o fim dos tratamentos resultou em rápida destruição do tecido luteal e retorno às concentrações basais de progesterona dentro de 72 horas,

acompanhado da manifestação do estro comportamental. O estro comportamental também ocorreu neste período do Experimento 2 em todos animais, exceto nas fêmeas que apresentaram regressão prematura de CL no Tratamento D. Este fato é relevante nos programas de transferência de embriões para prevenir a implantação de embriões que possam ter permanecido após a colheita e ressincronizar as fêmeas para monta natural (ASHER et al., 1995). Ao contrário do ocorrido em estudos com *C. elaphus* (ASHER et al., 1992) não foi observado retenção de embriões após as aplicações de prostaglandina.

Assim, embora o nosso tamanho amostral seja limitado e os Tratamentos A e D tenham induzido resposta superovulatória significativa dentro dos Experimentos 1 e 2, não é possível dizer que foi estabelecido um protocolo adequado para a indução da SOV e colheita de embriões por laparoscopia na espécie *M. gouazoubira*, pois nenhum embrião foi colhido durante os experimentos. Embora o eCG seja um método conveniente de SOV nos cervídeos, novas pesquisas devem ser realizadas buscando avaliar a ação deste fármaco na fertilidade da espécie *M. gouazoubira*. Além disso, devem ser priorizados os ajustes na sincronia da onda folicular, na colheita de embriões e na avaliação de estímulos que possam aumentar a taxa ovulatória a partir do grande número de folículos não ovulados nos Tratamentos D e E. Os protocolos devem ser delineados buscando minimizar a manipulação excessiva dos animais, evitando os possíveis efeitos do estresse. O ocorrido neste estudo evidencia a dificuldade de adaptar protocolos já conhecidos em espécies domésticas e salienta a necessidade de estudos específicos, que melhor se adequem a biologia reprodutiva da espécie e possibilitem a utilização das biotécnicas reprodutivas como uma ferramenta na conservação das espécies selvagens.

VII. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo permitiram concluir que:

- Três protocolos de SOV descritos na literatura para ruminantes domésticos (Tratamento A, Experimento 1 e Tratamentos D e E, Experimento 2) induziram resposta superovulatória na espécie *M. gouazoubira*;
- As doses de 600UI de eCG (Tratamento A, Experimento 1) e 700UI de eCG (Tratamento D, Experimento 2) foram capazes de estimular as maiores respostas superovulatórias e os maiores CLs (Tratamento A, Experimento 1);
- O uso de 300UI de eCG (Tratamento B, Experimento 1) e do FSH associado ao PVP (Tratamento C, Experimento 1) não foi capaz de induzir resposta superovulatória mínima;
- O uso do FSH no esquema de múltiplas administrações (Tratamento E, Experimento 2) foi capaz de induzir resposta superovulatória mínima, mas produziu grande número de folículos anovulatórios, assim como o uso de 700UI de eCG (Tratamento D, Experimento 2);
- O aumento significativo das concentrações de progesterona fecal na fase luteal dos Tratamentos do Experimento 1 e o retorno às concentrações basais após a administração de PGF2 α evidenciaram a funcionalidade dos CLs associada ao aumento da massa luteal;
- Os Tratamentos utilizados nos Experimentos 1 e 2, associados à colheita de embriões por laparoscopia não mostraram-se adequados para a espécie *M. gouazoubira*, nas condições do presente estudo.

VIII. REFERÊNCIAS

ADAM, C. L.; MOIR, C. E.; ATKINSON, T. Plasma concentration of progesterone in female red deer (*Cervus elaphus*) during the breeding season, pregnancy and anoestrus. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 74, p. 631-363, 1985.

ADAMS, G. P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 19-24, 1994.

AGRAWAL, K. P.; BHATTACHARYYA, N. K. Barbari Goat: Temporal effect on the cell stage and location of embryo. **Int. Goat Sheep Res.**, Scottsdale, v. 3, p. 227-230, 1984.

AMIRIDIS, G. S.; REKKAS, C. A.; FTHENAKIS, G. C.; VAINAS, E.; LYMBEROPOULOS, A.; CHRISTODOULOU, V.; BELIBASAKI, S. Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 1143-1150, 2002.

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 99, p. 223–243, 2007.

ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A. A.; SOARES, A. T.; VISINTIN, J. A. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 36, 1999. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000300006&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Oct. 2009. doi: 10.1590/S1413-95961999000300006.

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

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, Stoneham, v. 19, p. 31-42, 1983.

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 71, p. 89-94, 1984.

ARMSTRONG, D. T. Recent advances in Superovulation of cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 39, p. 7-24, 1993.

ASHER, G. W.; ADAM, J. L.; OTWAY, W.; BOWMAR, P.; VAN REENAN, G.; MACKINTOSH, C. G.; DRATCH, P. Hybridization of Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*) and Red deer (*Cervus elaphus*) by artificial insemination. **J. Zool**, London, v. 215, p. 197-203, 1988.

ASHER, G. W.; FISHER, M. W.; JABBOUR, H. N.; SMITH, J. F.; MULLEY, R. C.; MORROW, C. J.; VELDHUIZEN, F. A.; LANGRIDGE, M. Relationship between the onset of oestrus, the preovulatory surge in luteinizing hormone and ovulation following oestrus synchronization and superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*). **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 96, p. 261-273, 1992.

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

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

ASHER, G. W.; PETERSON, A. J.; DUGANZICH, D. Adrenal and ovarian sources of progesterone secretion in young female fallow deer, *Dama dama*. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 85, p. 667–675, 1989.

ASHER, G. W.; SCOTT, I. C.; O'NEILL, K. T.; SMITH, J. F.; INSKEEP, E. K.; TOWNSEND, E. C. Ultrasonographic monitoring of antral follicle development in red deer (*Cervus elaphus*). **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 111, p. 91-99, 1997.

ASHER, G. W.; THOMPSON, J. G. E. Plasma progesterone and LH concentrations during oestrous synchronization in female fallow deer (*Dama dama*). **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 19, p. 143-153, 1989.

ÁVILA-PIRES, F. D. As formas sul-americanas do “veado-virá”. **An. Acad. Bras. Ciên.**, Rio de Janeiro, v.31, p.547-556, 1959.

BAINBRIDGE, D. R. J.; CHAPPLE, D.; LOUDON, A. S. I.; JABBOUR, H. N. Immunoneutralization with a monoclonal antibody attenuates the superstimulatory effects of PMSG on endocrine and ovarian responses in red deer (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 1339-1350, 1995.

BAINBRIDGE, D. R.; DEAKIN, D.; JABBOUR, H. N. Premature luteal regression induced by equine chorionic gonadotrophin and estrogen is suppressed by administration of exogenous interferon in Red deer (*Cervus elaphus*). **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 58, p. 124-129, 1998.

BAINBRIDGE, D. R. J.; HUNTER, M. G.; CHAPPLE, D. G.; FLINT, A. P. F.; JABBOUR, H. N. Role of estrogen and prostaglandin F_{2α} in premature luteal regression in monovulatory and superovulated Red Deer (*Cervus elaphus*). **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 54, p. 347-354, 1996.

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

BAINBRIDGE, D. R. J.; CATT S. L.; EVANS, G.; JABBOUR, H. N. Successful in vitro fertilization of in vivo matured oocytes aspirated laparoscopically from red deer hinds (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 891-898, 1999.

BALLOU, J. D.; COOPER, K. A. Genetic management for endangered captive populations: the role of genetic and reproductive technologies. In: **SYMPOSIUM OF THE ZOOLOGICAL SOCIETY OF LONDON**, 64, 1992, London. Proceedings...p. 183–206.

BARIL, G.; CASAMITJANA, P.; PERRIN, J.; VALLET, J.C. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. **Zuchthygiene**, Berlin, v. 24, p. 101-115, 1989.

BARIL, G.; REMY, B.; VALLET, J. C.; BECKERS, J. F. Effect of repeated use of progestagen-PMSG treatment for estrus control in dairy goats out of breeding season. **Reprod. Dom. Anim.**, Berlin, v. 27, n. 3, p. 161-168, 1992.

BARROS, C. M.; BARCELOS, A. C. Z.; NOGUEIRA, M. F. G. Tratamentos superestimulatórios utilizados em protocolos para transferência de embriões bovinos. **Acta sci. vet.**, Porto Alegre, v. 35, p. 759-766, 2007.

BARROZO, L. A.; TONIOLLO, G. H. I.; DUARTE, J. M. B.; PINHO, M. P.; OLIVEIRA, J. A. Padrão anual de variação da testosterona sérica, volume testicular e aspectos seminais de veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*, Fisher, 1814) em cativeiro. **Rev. Bras. Repr. Anim.**, Belo Horizonte, v. 25, p. 210-211, 2001.

BARTLEWSKI, P. M.; ALEXANDER, B. D.; KING, W.A. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrus ewes. **Small Rumin. Res.**, Amsterdam, v. 75, 210–216, 2008.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BO, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 77–88, 2006.

BERG, D. K.; ASHER, G. W. New developments reproductive technologies in deer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, p. 189-205, 2003.

BERG, D. K.; THOMPSON, J. G.; PETERSON, A. J.; ASHER, G. W. The temporal relationship between oocyte maturation and early fertilisation events in relation to the preovulatory LH peak and preimplantation embryo development in red deer (*Cervus elaphus*). **Anim. Reprod. Sci.**, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.03.013, 2007.

BERG, D. K.; THOMPSON, J. G.; PUGH, P. A.; TERVIT, H. R.; ASHER, G. W. Successful in vitro culture of early cleavage stage embryos recovered from superovulated red deer (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, p. 247-254, 1995.

BERGALLO, H. G., C.; ROCHA, F. D.; ALVES, M. L. S., SLUYS, M. **A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: EdUERJ, 2000.

BERLINGUER, F.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P. P.; ROSATI, I.; LEDDA, S.; NAITANA, S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, p. 1477–1486, 2004.

BINDON, B. M.; PIPER, L. R.; CAHILL, M. A.; DRIANCOURT, M. A.; O'SHEA, T. Genetic and hormonal factors affecting Superovulation. **Theriogenology**, Stoneham k, v. 25, p. 53-70, 1986.

BLANCO, M. R.; SIMONETTI, L.; RIVERA, O. E. Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments. **Small Rumin. Res.**, Amsterdam, v. 47. p. 183-191, 2003.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 31-40, 1995.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; CHESTA, P. M.; MARTINS, C. M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 89-101, 2006.

BÓ, G. A.; GUERRERO, D. C.; ADAMS, G. P. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, p. 81-87, 2008.

BÓ, G. A.; HOCKELEY, D. K.; NASSER, L. F.; MAPLETOFT, T. J. Superovulatory response to subcutaneous injection of Folltropin in beef cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v.42, p. 963-975, 1994.

BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. **International Zoo Yearbook**, London, v. 35, p. 173-191, 1997.

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. 2004. **Endocrine Manual for the Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species**, 2nd ed. Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Manual. pp. 1–93.

BURKE, C. R.; BOLAND M. P.; MACMILLAN, K. L. Ovarian responses to progesterone and oestradiol benzoate administered intravaginally during dioestrus in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 55, p. 23-33, 1999.

CAVALIERI, J.; COLEMAN, C.; RODRIGUES, H.; MACMILLAN, K. L.; FITZPATRICK, L. A. The effect of timing of administration of estradiol benzoate on characteristics of oestrus, timing of ovulation and fertility in *Bos indicus* heifers synchronised with a progesterone releasing intravaginal insert. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v. 80, p. 217-223, 2002.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, p. 171-188, 2003.

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 105-116, 1999.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reprod. Nutr. Dev.**, Paris, v. 40, p. 493-504, 2000.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3rd ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M. A.; BORGHESE, A.; TERZANO, M. G.; BELLITTI, A. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 65, p. 255-264, 2001.

D'ALESSANDRO, A.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M. A.; CAFUERI, C.; TOTEDA, F. Some effects of adding p-LH in defined amount to purified p-FSH to modify FSH/LH ratios during the superovulatory treatment of anestrus ewes. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 47, 91-98, 1997.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G.; TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 1764–1774, 2005.

D'ALESSANDRO, A.; MARTEMUCCI, G.; TOTEDA, F.; GAMBACORTA, M.; MANCHISI, A. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. **Small Rum. Res.**, Amsterdam, v. 19, p. 255-261, 1996.

DE ROOVER, R.; BOLS, P. E. J.; GENICOT, G.; HANZEN, CH. Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 1902-1913, 2005.

DEMOUSTIER, M. M.; BECKERS, J. F.; VAN DER ZWALMEN, P.; CLOSSET, J.; GILLARD, J. L.; ECTORS, F. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 30, p. 379-386, 1988.

DIAS, J. L. C. Miopatia de captura. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 172-179.

DIEKMAN, M. A.; NEARY, M. K.; KELLY, G. R. Repeated injections of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) failed to induce antibody production in fall-lambing ewes. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 73, p. 51, 1995.

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

DUARTE, J. M. B. Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em animais silvestres: o exemplo dos cervídeos. **Agrociencia**, Chapingo, vol. 9, n. 1-2, p. 541-544, 2005.

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Reprodução assistida em cervídeos brasileiros. **Rev. Bras. Repr. Anim.**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1-2, p. 111-121, 1995.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L.; GONZÁLES, S.; NUNES, A. L. V.; GARCIA, J. M.; SZABÓ, M. P. J.; PANDOLFI, J. R.; ARANTES, I. G.; NASCIMENTO, A. A.; MACHADO, R. Z.; ARAÚJO JR., J. P.; CATÃO-DIAS, J. L.; WERTHER, K.; GARCIA, J. E.; GÍRIO, R. J. S.; MATUSHIMA, E. R. Order Artiodactyla family Cervidae (deer). In: FOWLER, M. E.; Cubas, Z. S. (Eds.). **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa State University Press, Ames, 2001. p. 402–422.

EMESIH, G. C.; NEWTON, G. R.; WEISE, D. W. Effects of heat stress and oxytocin on plasma concentrations of progesterone and 13,14-dihydro-15-ketoprostaglandin F2 α in goats. **Small Rumin. Res.**, Amsterdam, v. 16, p. 133- 139, 1995.

EVANS, G.; ARMSTRONG, D. T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 70, p. 47–53, 1984.

FENESSY, P. F.; ASHER, G. W.; BEATSON, N. S.; DIXON, T. E.; HUNTER, J. W.; BRIGANS, M. J. Embryo transfer in deer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 133-138, 1994.

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

FORCADA, F.; LOZANO, J. M.; ABECIA, J. A.; ZÚÑIGA, O. Repeated superovulation of high prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high quality embryos. **Livest. Prod. Sci.**, Amsterdam, v. 66, p. 263–269, 2000.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 50, p. 225-232, 1994.

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

GALLI, C.; DUCHI, R.; GROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, p. 599-616, 2003.

GHERARDI, P. B.; LINDSAY, D. R. The effect of season on the ovulatory response of Merino ewes to serum from pregnant mares. **J. Reprod. Fertil.**, v. 60, p.425-429, 1980.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.20, p. 187-200, 1989.

GINTHER, O. J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, Stoneham, v. 42, p. 987–1001, 1994.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 689–703, 1995.

GINTHER, O. J.; BERFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 63, p. 383-389, 2000.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, p. 1055-1064, 2000.

GONZÁLEZ-REYNA, A.; MÁRQUEZ-GARCÍA, E.; ÂA, H. LIZÁRRAGA-TRACY, H.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. C. Dose response effects of PMSG on ovulation rate and follicular development in Pelibuey ewes treated with Syncro-mate-B implants. **Small Rum. Res.**, Amsterdam, v. 31, p. 149-155, 1999.

GORDON, I. Controlled Reproduction in deer. In: GORDON, I. (Ed.). **Controlled Reproduction in Horses, Deer and Camelids**. Oxon, UK: Cab International, 1997. p.169-188.

GOULDING, D.; WILLIAMS, D. H.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Factors affecting Superovulation in heifers treated with PMSG. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, p. 765-773, 1996.

GRAHAM, L. H.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestagens in feces and serum. **Zoo Biol.**, v. 20, p. 227–236, 2001.

HAMASAKI, S.; YAMAUCHI, K.; OHKI, T.; MURAKAMI, M.; TAKAHARA, Y.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Comparison of various reproductive status in sika deer (*Cervus nippon*) using fecal steroid analysis. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 63, p. 195–188, 2001.

HAMILTON, W. J.; LAING, S. A. Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. **J. Anat.**, London, v. 80, p. 194-209, 1946.

HARDER, J. D.; MOORHEAD, D. L. Development of corporea lutea and plasma progesterone levels associated with the onset of the breeding season in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Biol. Reprod.**, Columbus, v. 22, p. 185-191, 1980.

HOCKLEY, D. K.; BO, G. A.; PALASZ, A. T.; DEL CAMPO, M. R.; MAPLETOFT, R. J. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. **Theriogenology**, Stoneham, v.37, n.1, p.224, 1992.

HOLST, P. J. The time of entry of ova onto the uterus of the ewe. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 36, p. 427-428, 1974.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Rev. Reprod.**, Cambridge, v. 4, p. 143-150, 1999.

HUNTER, M. G; BIGGS, C.; FAILLACE, L. S.; PICTON, H. M. Current concepts of folliculogenesis in monovular and polyovular farm species. **J. Reprod. Fertil.** Cambridge, v. 45, p. 21-38, 1992. Suppl.

IUCN, 2009. 2009 IUCN Red List of Threatened Species, www.iucnredlist.org (downloaded on 12.10.09).

JABBOUR, H. N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-P. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 26, p. 93-106, 1991.

JABBOUR, H. N.; HAYSEN, V.; BRUFORD, M. W. Conservation of deer: contributions from molecular biology, evolutionary ecology and reproductive physiology. **J. Zoology**, London, v. 243, p. 461-484, 1997.

JABBOUR, H. N., VELDHUIZEN, F. A., GREEN, G., ASHER, G. W. Endocrine responses and conception rates in fallow deer (*Dama dama*) following oestrous synchronization and cervical insemination with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 98, p. 495-502, 1993.

JABBOUR, H. N.; VELDHUIZEN, F. A.; GREEN, G.; LANGRIDGE, M.; ASHER, G. W. Fertility of fallow deer (*Dama dama*) does following synchronization of oestrus with CIDR devices or prostaglandin. **Proc. NZ Soc. Anim. Prod.**, Hamilton, v. 51, p. 147-151, 1991.

JABBOUR, H. N.; VELDHUIZEN, F. A.; MULLEY, R. C.; ASHER, G. W. Effect of exogenous gonadotrophins on oestrus, the LH surge and the timing and rate of ovulation in red deer (*Cervus elaphus*). **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 100, p. 533-539, 1994.

JACKSON, A. L.; BREEN, S. M.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; KNOX, R. V. Evaluation of methodology for administration of porcine FSH for use in estrus induction and for increasing ovulation rate in prepubertal gilts. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 1042–1047, 2006.

JUNGIUS, H. Status and distribution of threatened deer species in South America. In: JACKSON, J. (Ed.). **World wildlife yearbook**. Morges: World Wildlife Fund, 1975-1976. p. 203-221.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 48, p. 137-157, 1997.

KNIGHTS, M.; BAPTISTE, Q. S.; DIXON, A. B.; PATE, J. L.; MARSH, D. J.; INSKEEP, E.K.; LEWIS, P. E. Effects of dosage of FSH, vehicle and time of treatment on ovulation rate and prolificacy in ewes during the anestrus season. **Small Rum. Res.**, Amsterdam, v. 50, p. 1-9, 2003.

KO, J. C. H.; KASTELIC, J. P.; DEL CARMO, M. R. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers. **J. Reprod. Fert.**, Cambridge, v. 91, p. 511-551, 1991.

KUMAR, P. S.; SARAVANAN, D.; RAJASUNDARAM, R. C.; SELVARAJU, M.; KATHIRESAN, D. Serum oestradiol and progesterone profiles and their relationship with superovulatory in Tellicherry goats treated with eCG and FSH. **Small Rum. Res.**, Amsterdam, v. 49, p. 69-77, 2003.

LEGENDRE, X.; BOUSSEAU, S.; KOYUNDJIEV, S. Embryo collection from ewes by laparoscopy using a 3-way rigid catheter. **Theriogenology**, Stoneham, v. 29, p. 269-865, 1988.

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

LOCATELLI, Y.; VALLET, J. C.; HUYGHE, F. P.; COGNIÉ, Y.; LEGENDRE, X.; MERMILLOD, P. Laparoscopic ovum pick-up and in vitro production of sika deer embryos: Effect of season and culture conditions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 1334–1342, 2006.

LOPEZ-DIAZ, M. C.; BOSU, W. T. K. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. **Theriogenology**, Stoneham, v. 37, p. 1163–83, 1992.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

MAGYAR, S. J.; HODGES, C.; SEAGER, S. W. J.; KRAEMER, D. C. Successful nonsurgical embryo collection with surgical transfer in captive white-tailed deer. **Theorigenology**, Stoneham, v. 29, n. 1, p. 273, 1988.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, Paris, v. 42, p. 601–611, 2002.

MARQUES, A. A. B.; FONTANA, C. S.; VÉLEZ, E.; BENCKE, G. A.; SCHNEIDER, M.; REIS., R. E. **Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul: Decreto no 41.672, de 10 junho de 2002**. Porto Alegre: FZB / MCT–PUCRS / Pangea (Publicações Avulsas FZB, 11), 2002.

McCORKELL, R. B.; MacDOUGALL, L.; ADAMS, G. P. Ovarian follicle development in wapiti (*Cervus elaphus*) during the anovulatory season. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, p. 473–483, 2004.

McCORKELL, R. B.; WOODBURY, M.; ADAMS, G. P. Ovarian follicular and luteal dynamics in wapiti during the estrous cycle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 540–556, 2006.

McCORKELL, R. B.; WOODBURY, M. R.; ADAMS, G. P. Evaluation of an ovarian synchronization scheme for fixed-time artificial insemination in wapiti. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 1217–1223, 2007.

McCORKELL, R. B.; WOODBURY, M. R.; ADAMS, G. P. Ovarian follicular and luteal dynamics in wapiti during seasonal transitions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 1224–1232, 2007a.

McCORKELL, R. B.; WOODBURY, M. R.; ADAMS, G. P. Induction of ovarian follicular wave emergence in wapiti (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, p. 1017–1023, 2008.

McKELVEY, W. A. C.; ROBINSON, J. J. Repeated recoveries of ovine ova by laparoscopy. **Theriogenology**, Stoneham, v. 25, p. 171, 1986.

McKELVEY, W. A. C.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P.; ROBERTSON, I. S. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. **Theriogenology**, Stoneham, v. 25, p. 855-865, 1986.

McLEOD, B. J.; MEIKLE, L. M.; FISHER, T. R.; MANLEY, T. R.; HEATH, D. A.; MCNATTY, P. Variation in antral follicle development during the follicular phase of the oestrous cycle in red deer (*Cervus elaphus*) hinds. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 697-705, 2001.

McNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; HENDERSON, K. M.; LUN, S.; HURST, P. R.; ELLIS, L. M.; MONTGOMERY, G. W.; MORRISON, L.; THURLEY, D. C. Some aspects of

thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 72, p. 39-53, 1984.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Eds). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. cap. 3, p. 25-55.

MORELL, A. G.; GREGORIADIS, G.; SCHEINBERG, I. H.; HICKMAN, J.; ASHWELL, G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, vol. 246, p. 1461-1467, 1971.

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

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

MURRAY, J. F.; DOWNING, J. A.; SCARAMUZZI, R. J.; EVANS, G. Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. **Theriogenology**, Stoneham, v. 42, p. 1337–1347, 1994.

NASSER, L.; ADAMS, G. P.; BO, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 713-724, 1993.

PAZ, R. C. R. **Biotecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus***. 2004. 148f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

PETERS, A. R.; LAMMING, G. E. Regulation of ovarian function in the post partum cow: an endocrine model. **Vet. Rec.**, London, v.118, p. 236-239, 1986.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fisher 1814). In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p.60-68.

PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ, B.; GARDE, J. Influence of the synchronization treatment on the superovulatory response of Murciana goats. **Small Rumin. Res.**, Amsterdam, v. 23, p. 135-141, 1996.

POLEGATO, B. F.; DUARTE, J. M. B. Período de gestação e cio pós-parto em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOOLOGIA**, 2., 2003, Belo Horizonte. Resúmen...p. 286-287.

POLEGATO, B. F. **Validação de método endócrino não-invasivo para o monitoramento da fisiologia reprodutiva e da atividade dos glicocorticóides em cervídeos neotropicais**. 2004. 43f. Trabalho de Graduação (Graduação em Medicina

Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

PTAK, G.; CLINTON, M.; BARBONI, B.; MUZZEDDU, M.; CAPPAL, P.; TISCHNER, M.; LOI, P. Preservation of the European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 66, p. 796-801, 2002.

PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reprod. Fertil. Dev.**, Melbourne, v. 16, p. 33-46, 2004.

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

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F., SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Eds). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. cap. 8, p. 127-177.

ROLDAN, E. R. S.; GOMENDIO, M.; GARDE, J. J.; ESPESO, G.; LEDDA, S.; BERLINGUER, F.; del OLMO, A.; SOLER, A. J.; ARREGUI, L.; CRESPO, C.; GONZALEZ, R. Inbreeding and Reproduction in Endangered Ungulates: Preservation of Genetic Variation through the Organization of Genetic Resource Banks. **Reprod. Dom. Anim.**, Berlin, v. 41, Suppl. 2, p. 82–92, 2006.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de Mazama Ranfinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RUBIANES, E.; IBARRA, D.; UNGERFELD, R.; CARBAJAL, B.; CASTRO, T. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 465-472, 1995.

RUBIANES, E.; CASTRO, T.; KMAID, S.; CARBAJAL, B.; BENQUET, N.; PINCZAK, A. Superovulatory response to FSH treatments after different progesterone primings in ewes. **Small Rumin. Res.**, Amsterdam, v. 33, p. 159-164, 1999.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 78, p. 271–287, 2003.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1 to 5-day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F_{2α}. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 78, p. 47-55, 2003.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑALES, C.; RIVERO, A.; ADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, p. 1479-1488, 1997.

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

SAHARREA, A.; VALENCIA, J.; BALCÁZAR, A.; MEJÍA, O.; CERBÓN, J. L.; CABALLERO, V.; ZARCO, L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of HCG or GnRH administration during the early luteal phase. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, p. 1039--1052, 1998.

SAMARTZI, F.; BELIBASAKI, S.; VAINAS, E.; BOSCOS, C. Plasma progesterone concentration in relation to ovulation rate and embryo yield in Chios ewes superovulated with PMSG. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 39, p. 11-21, 1995.

SANTOS, G. L.; CERAVOLO, L.; SOUZA, S.; DUARTE, J. M. B. Sazonalidade reprodutiva e duração do ciclo estral e do cio de fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) sob condições de cativeiro. In: **CONGRESO INTERNACIONAL MANEJO DEL FAUNA SILVESTRE EN AMAZONÍA Y LATINOAMERICA**, 5., 2001, Cartagena. Proceedings...p. 232.

SARKAR, M.; CHAKRABORTY, P.; SHARMA, B. C.; DEKA, B. C.; DUTTABORAH, B. K.; MOHANTY, T. K.; PRAKASH, B. S. Assessment of superovulatory responses in terms of palpable corpora lutea and embryo recovery using plasma progesterone in yaks (*Poephagus grunniens L.*). **Res. Vet. Sci.**, London, v. 85, p. 233–237, 2008.

SATOH, H.; NUMABE, T.; TAKADA, T.; OIKAWA, T. KIFUNE, A.; WATANABE, G.; TAYA, K. Superovulation in Japanese beef cows using polyninylpirrolidone (PVP) as the vehicle for porcine FSH (p-FSH). **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, p. 332, 1996.

SHEIKHELDING, M. A.; HOWLAND, B. E.; PALMER, W. M. Effects of heat stress on serum progesterone in cyclical ewes and on progesterone and cortisol response to ACTH in ovariectomized ewes. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 84, p. 521-529, 1988.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O. E.; CAROU, N.; ALBERIO, R. H.; ABECIA, J. A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. **Anim. Reprod. Sci.**, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.01.020, 2007.

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

STOCK, A. E.; ELLINGTON, J. E.; FORTUNE, J. E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, p. 1091-1102, 1996.

STROUD, B.; HASLER, J. F. Dissecting why Superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 65-76, 2006.

STUBBINGS, R. B.; BOSU, W. T. R.; BAKER, C. A. V.; KING, G. J. Serum progesterone concentration associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. **Can. J. Vet. Res.**, Ottawa, v. 50, p. 369-373, 1986.

SUGANO, M.; SHINOBI, T. Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 55, p. 175-181, 1999.

TAKEDOMI T.; AOYAGI, Y.; KONISHI, M.; KISHI, H.; TAYA, K.; WATANABE, G. Superovulation in Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, Stoneham, v. 39, p. 327, 1993.

TAKEDOMI, T.; AOYAGI, Y.; KONISHI, M.; KISHI, H.; TAYA, K.; WATANABE, G.; SASAMOTO, S. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 1259-1268, 1995.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J. E. P.; MATTOS, R. C.; LOPES, F. L.; PANCARCI, S. M.; RISCO, C. A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 75-89, 2001.

THOMPSON, J. G. E.; ASHER, G. W. Superovulation and ova recovery in farmed fallow deer (*Dama dama*). **Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.**, v. 20, p. 4, 1988.

THOMPSON, K. V.; MASHBURN, K. L.; MONFORT, S. L. Characterization of estrous cyclicity in the Sable Antelope (*Hippotragus niger*) through fecal progestagen monitoring. **Gen. Comp. Endocrinol.**, San Diego, v. 112, p. 129–137, 1998.

TORRÈS, S; SEVELLEC, C. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. **Reprod. Nutr. Dev**, Paris, v. 27, p. 859-863, 1987.

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; TREGUERRES, J. A. F.; DOMINGUEZ, V.; ARIZNAVARRETA, C.; COCERO, M. J. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. **Dom. Anim. Endocrinol.**, Stoneham, v. 30, p. 76-87, 2006.

VIUDES DE CASTRO M. P.; CORTELL, C.; MOCÉ, E.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; JOLY, T.; VICENTE, J. S. Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, n. 2, p. 655-662, 2009.

WALDHALM, S. J.; JACOBSON, H. A.; DHUNGEL, S. K.; BEARDEN, H. J. Embryo transfer in the white-tailed deer: a reproductive model for endangered deer species of the world. **Theriogenology**, Stoneham, v. 31, n. 2, p. 437-449, 1989.

WALKER, E. **Mammals of the world**. 5th ed. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1991. 1629 p.

WAN, S. S.; HENNESSY, D. P.; CRANWELL, P. D. Seasonal infertility, stress and adrenocortical responsiveness in pigs. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 34, p. 265-279, 1994.

WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; WILDT, D. E. Rapid extraction of fecal steroids for measuring reproductive cyclicity and early pregnancy in free-ranging yellow baboons *Papio cynocephalus cynocephalus*. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 92, p. 415-423, 1991.

WENKOFF, M. S.; BRINGANS., M. J. Embryo transfer in cervids. In: RENECKER, L. A.; HUDSON, R.J. (Eds.). **Wildlife production – conservation and sustainable development**. University of Alaska: Fairbanks, 1991. p. 461-463.

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

WILDT, D. E.; WEMMER, C. Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. **Biodivers. Conserv.**, London, v. 8, p. 965-976, 1999.

YAMAMOTO, M.; SUZUKI, T.; OOE, M.; TAKAGI, M. Superovulation in beef cows and heifers with a single injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **J. Repr. Dev.**, Tokyo, v. 39, p. 353-356, 1993.

YAMAMOTO, M.; KAWAGUCHI, M.; OOE, M.; TAKAGI, M.; SUZUKI, T. Dose response to a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone for Superovulation in cows. **J. Repr. Dev.**, Tokyo, v. 41, p. 93-96, 1995.

YAMAMOTO, M.; OOE, M.; KAWAGUCHI, M.; SUZUKI, T. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 747-755, 1994.

YAMAUCHI, K.; HAMASAKI, S.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Assessment of reproductive status of Sika Deer by fecal steroid analysis. **J. Reprod. Dev.**, Tokyo, v. 43, p. 221-226, 1997.

ZANETTI, E. S.; POLEGATO, B. F.; DUARTE, J. M. B. Comparison of two methods of synchronization of estrus in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Anim. Reprod. Sci.** doi:10.1016/j.anireprosci.2009.05.010, 2009.

*“De tudo ficaram três coisas...
 A certeza de que estamos começando...
 A certeza de que é preciso continuar...
 A certeza de que podemos ser interrompidos
 antes de terminar...
 Façamos da interrupção um caminho novo...
 Da queda, um passo de dança...
 Do medo, uma escada...
 Do sonho, uma ponte...
 Da procura, um encontro!”
 Fernando Sabino*