

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

DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTINAS
FECAIS DURANTE O CICLO ESTRAL, GESTAÇÃO E PERÍODO PÓS-
PARTO EM CERVOS-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*) EM
CATIVEIRO

Bruna Furlan Polegato

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Agosto de 2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNA FURLAN POLEGATO – Nasceu em São Paulo no dia 17 de fevereiro de 1982. Ingressou no curso de Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Campus de Jaboticabal em 2000 e graduou-se em janeiro de 2005. Nos anos de 2002-2003 foi bolsista FAPESP sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e desenvolveu o estudo “Perfil das progestinas fecais durante a gestação em veados-catingueiro (*Mazama gouzoubira*)” como Iniciação Científica. Em 2004 desenvolveu o Trabalho de Graduação intitulado “Validação de método endócrino não-invasivo para monitoramento da fisiologia reprodutiva e da atividade dos glicocorticóides e cervídeos neotropicais”, que foi desenvolvido em parceria com o *Conservation and Research Center – Smithsonian Institution*, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e co-orientação do Prof. Dr. Steven L. Monfort. Em 2006 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) e desde então foi bolsista FAPESP.



*Ando devagar porque já tive pressa
Levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Eu nada sei*



*Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir*



*Penso que cumpri a vida seja simplesmente
compreender a marcha ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro
levando a boiada eu vou tocando os dias
pela longa estrada eu vou, estrada eu sou*

*Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir*



*Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega e no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz*

*Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir*

*Ando devagar porque já tive pressa
Levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz*

***Tocando em frente
Almir Sater e Renato Teixeira***

*Dedico às “minhas mocinhas”, que foram
as maiores colaboradoras desse trabalho e
deixarão muitas saudades...*

Agradeço...

...À minha mãe, Sandra, que com seu jeito sério e objetivo me ensinou dia após dia o significado do amor incondicional. Ela é e sempre será meu exemplo de luta, determinação, dedicação e vitória.

...Ao meu pai, Pedro, pelo carisma diário que me faz seguir seus passos. E pelo entusiasmo e carinho nas ajudas durante o experimento.

...À minha irmã, Bertha, por me ajudar a entender o significado da família e por termos criado juntas uma relação de amizade, carinho e confiança indissolúvel.

...Ao Thiago, pelo amor, paciência, cumplicidade e sonhos compartilhados.

...Ao meu orientador, Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, que me conduziu pelos belos caminhos da ciência, sendo sempre um exemplo de competência e genialidade. Sua paixão pela pesquisa e pelo seu trabalho é contagiante.

...Aos Profs. Drs. Elisabeth Criscuolo Urbinati, Paulo Henrique Franceschini, Cláudio Alvarenga de Oliveira pelas sugestões pertinentes, que ajudaram a tornar esse trabalho melhor.

...À FAPESP, por ter me dado o suporte financeiro, e consequentemente o equilíbrio psicológico necessário, para o desenvolvimento desse estudo.

...À Chris, à Nhola, ao Beterraba e ao Turquinho, pela ajuda imprescindível com o manejo.

...À Ana Paula e Sr. Orlando, pela boa manutenção da liofilizadora e “galhos quebrados” para me ajudar a cumprir os prazos dos relatórios.

...Ao Prof. Dr. Antonio de Queiroz Neto e à Isabel, por disponibilizarem o laboratório de Farmacologia para o desenvolvimento desse estudo.

...Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira e ao querido Léo, pela ajuda com a estatística.

...Às “minhas mocinhas”, Fifi, Valéria, Belinha, Nani, Penélope e Sofy, que revolucionaram a visão que eu tinha sobre o mundo animal. Elas me ensinaram muito sobre respeito, sensibilidade e confiança.

...Ao Victor e à Natália, pela dedicação ao trabalho, confiança em mim e nas minhas sugestões e por terem se tornado amigos queridos. Vocês me ensinaram muito e são meus orgulhos!

...Aos amigos do NUPECCE que marcaram minha vida pra sempre, em especial à velha guarda: Eveline, Vanessa, André, Geléia, Gafa, Ricardo, Javier. Vocês são muito queridos!

...Às amigas especiais: Xaxá, Kstanha e Eveline, que me fortalecem e tornam a caminhada mais leve e prazerosa. Vocês me ensinam muito sobre confiança, respeito, lealdade... sobre a amizade.

...Ao Beto, à Lu e à Pietra, pela amizade e momentos de boa convivência.

...Às meninas de casa, que amenizavam o peso do dia-a-dia e compartilharam bons e maus momentos da minha vida, Nhola, Gema, Kstanha, Aline, Norréia, Toskera, Pentelha, Tia Rô e Carla.

...À Natalina, pelo cuidado materno e boas conversas.

...Ao Drake, pelos passeios, pela euforia ao me ver, pelo carinho e pelos conselhos silenciosos. Vou sentir sua falta “dengucho”!

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
SUMMARY.....	9

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. O cervo-do-pantanal: generalidades e problemática para a conservação.....	11
2.2. Biologia e fisiologia reprodutiva em cervídeos.....	14
2.2.1. Ciclo estral.....	14
2.2.2. Gestação.....	17
2.2.3. Pós-parto.....	21
2.3. Hormônios fecais.....	22
3. REFERÊNCIAS.....	25

CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE ESTRÓGENO E PROGESTINAS FCAIS DURANTE O CICLO ESTRAL, GESTAÇÃO E PERÍODO PÓS-PARTO EM CERVOS-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*) EM CATIVEIRO

RESUMO.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3. RESULTADOS.....	48
4. DISCUSSÃO.....	57
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS.....	64

CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÕES.....73

DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTINAS FECALIS DURANTE O CICLO ESTRAL, GESTAÇÃO E PERÍODO PÓS-PARTO EM CERVOS-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*) EM CATIVEIRO

RESUMO – Atualmente, o conhecimento sobre a fisiologia e a biologia reprodutiva de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) é escasso e as lacunas existentes aumentam a vulnerabilidade da espécie à extinção. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram: (1) caracterizar alguns parâmetros relacionados à fisiologia reprodutiva de fêmeas de cervos-do-pantanal e (2) fornecer métodos adequados para o acesso às diferentes fases do ciclo reprodutivo. Para isso, seis fêmeas da espécie foram utilizadas para a caracterização hormonal do ciclo estral, da gestação e do período pós-parto. Amostras fecais foram colhidas diariamente para o monitoramento do ciclo estral, duas vezes por semana durante a gestação e em dias alternados no período pós-parto. As dosagens das progestinas fecais foram feitas por EIA. Foram monitorados 16 ciclos estrais completos, cuja duração média foi de $21,3 \pm 1,3$ dias ($6,4 \pm 1,2$ d fase inter-luteal e $14,8 \pm 1,3$ d fase luteal). As concentrações médias de progestinas fecais para as fases inter-luteal e luteal do ciclo estral foram $834 \pm 311 \text{ ng g}^{-1}$ e $3979 \pm 1611 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente, e o valor limite entre elas foi de 1457 ng g^{-1} . Quatro fêmeas levaram a gestação a termo, determinando um período de gestação médio de 253 ± 4 dias. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de progestinas fecais a partir do quarto mês de gestação, o que pôde direcionar o diagnóstico presuntivo de gestação na espécie. Assim, concentrações de progestinas fecais $\geq 15250 \text{ ng g}^{-1}$ foram indicativas de gestação. No período de 60 dias pós-parto em que as fêmeas foram monitoradas, 75% (3/4) delas apresentaram estro e/ou retomaram a atividade ovariana.

Palavras-chave: *Blastocerus dichotomus*, cervo-do-pantanal, conservação, ensaio imunoenzimático, hormônios fecais, reprodução

**DETERMINATION OF THE FECAL ESTROGENS AND PROGESTINS PROFILES
DURING THE ESTROUS CYCLE, PREGNANCY AND POST PARTURITION PERIOD
IN CAPTIVE MARSH DEER (*Blastocerus dichotomus*)**

SUMMARY – The scarce knowledge about reproductive physiology and biology in marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) increases the vulnerability of this species to the extinction. Thus, the aims of this study were: (1) to characterize some parameters related to the reproductive physiology of females marsh deer and (2) to turn available adequate tools for the assessment of the reproductive cycle's phases. Six females and one male were used to the hormonal characterization of the estrous cycle, pregnancy and post parturition period. Fecal samples were collected daily during the estrous cycle, twice a week during the pregnancy and in alternated days during the post parturition period of monitoring and the amount of fecal progestins was evaluated by enzyme immunoassay. The mean length of the estrous cycle was 21.3 ± 1.3 days (6.4 ± 1.2 d inter-luteal and 14.8 ± 1.3 d luteal phase) and the fecal progestins concentrations were $834 \pm 311 \text{ ng g}^{-1}$ and $3979 \pm 1611 \text{ ng g}^{-1}$, respectively for the inter-luteal and luteal phase. The limit value between these phases was 1457 ng g^{-1} . Four females became pregnant and exposed a mean pregnancy period of 253 ± 4 days. There was a significant increase ($p < 0,0001$) in the fecal progestins excretion since the fourth month of pregnancy, that could provide guidelines for the pregnancy diagnosis in the species. Thus, fecal progestins concentrations $\geq 15250 \text{ ng g}^{-1}$ were indicative of pregnancy. Seventy five percent (3/4) of the females exhibit estrous and/or restarted the ovarian function during the post parturition period of monitoring.

Keywords: *Blastocerus dichotomus*, conservation, enzyme immunoassay, fecal hormones, marsh deer, reproduction

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), por seu carisma e especificidade pelas áreas alagadas (PINDER, 1996; PIOVEZAN et al., 2001), desempenha além de sua função intrínseca para a biodiversidade (como uma espécie), outro papel ecológico relevante: o de espécie-bandeira, auxiliando na conservação de espécies que se inserem no mesmo habitat de várzea, mas que não têm a mesma visibilidade.

Embora seja um animal diurno e de grande porte, poucas características referentes à sua biologia e fisiologia foram completamente elucidadas e, virtualmente, não há dados na literatura sobre sua reprodução (HAYSEN et al., 1993; WEMMER, 1998). Sendo assim, para um entendimento mais amplo desta espécie, novos estudos devem ser gerados. Essa necessidade intensifica-se principalmente devido às modificações drásticas que são impostas aos seus ambientes naturais em consequência da atividade humana. Tal atividade provoca a redução e fragmentação do habitat e torna a espécie vulnerável à extinção ou extinta em áreas significativas (PINDER e SEAL, 1995).

O risco de extinção pode ser amenizado pela geração de conhecimento sobre a espécie, especialmente sobre sua fisiologia reprodutiva, uma vez que as características e as estratégias reprodutivas de cada espécie determinam como o material genético dos indivíduos vai ser transmitido para as gerações futuras (WILDT e WEMMER, 1999). Adicionalmente, a reprodução está diretamente relacionada ao sucesso na manutenção dos efetivos populacionais. Neste contexto, a possibilidade de preservação do patrimônio genético de populações e o fácil acesso a este material para programas de conservação, podem assegurar a sobrevivência desta espécie no caso de ocorrência de catástrofes (WILDT et al., 1997; WILDT e WEMMER, 1999). Por outro lado, embora a manipulação reprodutiva de animais selvagens seja um método para a conservação das espécies, o uso das biotécnicas reprodutivas (ex: inseminação artificial,

transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões e clonagem) é altamente dependente de conhecimentos básicos referentes à fisiologia reprodutiva e estes nem sempre são extrapoláveis de uma espécie para outra (DUARTE e GARCIA, 1995).

O conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva auxilia no manejo reprodutivo dos animais, no monitoramento de populações de vida livre, no que diz respeito a sua saúde reprodutiva e dinâmica populacional (WASSER et al., 1995; BORJESSON et al., 1996) e na condução de decisões de manejo que visem a produção de estratégias de conservação adequadas (PICKARD et al., 2001). Sendo assim, os objetivos desse capítulo foram: (1) traçar um histórico sobre a espécie *Blastocerus dichotomus* e (2) com base no conhecimento existente para outras espécies, fornecer subsídios que apoiem o desenvolvimento e a compreensão de estudos relacionados à reprodução em cervos-do-pantanal.

2. Revisão de literatura

2.1. O cervo-do-pantanal: generalidades e problemática para a conservação

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) pertence à ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, infra-ordem Pecora, superfamília Cervoidea, família Cervidae, subfamília Odocoileinae e tribo Odocoileini (ROSSI, 2000). É o maior cervídeo neotropical e indivíduos adultos desta espécie podem atingir até 1,3 m de altura e 150 kg. Sua pelagem é castanho-avermelhada, com as extremidades dos membros, a cauda, o focinho e a região periocular pretas e a parte inferior do tórax, o abdômen, a garganta e o interior das orelhas brancos (TOMÁS, 1992; DUARTE, 1996; WEMMER, 1998; D'ALESSIO et al., 2001). A distribuição geográfica original desta espécie era ampla e proporcionada pela exuberante rede fluvial existente na América do Sul, que favorecia a formação de várzeas, seu habitat preferencial (MAURO et al., 1995; TOMÁS et al., 1997; PIOVEZAN et al., 2001). Entretanto, ocorreu uma acentuada retração na área de ocorrência da espécie (PINDER e SEAL, 1995), o que a tornou vulnerável ao processo de extinção (IUCN, 2001). Atualmente, sua distribuição se restringe ao

Pantanal brasileiro (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), à Ilha do Bananal, ao Rio Araguaia (Mato Grosso e Tocantins), ao Rio Guaporé (Rondônia) e a populações isoladas no Rio Paraná (Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo), no Paraguai (ao longo dos rios Paraguai e Paraná), na Bolívia (Nordeste) e na Argentina (esteros de Iberá) (TOMÁS et al., 1997).

Múltiplos fatores interagem para determinar a fragilidade do cervo-do-pantanal, e os mais relevantes são decorrentes da perda e fragmentação do habitat (TOMÁS et al., 1997; GONZÁLEZ, 1998); da aproximação com animais domésticos, favorecendo a transmissão de patógenos (TOMÁS et al., 1997) e da forte pressão de caça (TOMÁS et al., 1997; GONZÁLEZ, 1998; WEMMER, 1998; D'ALESSIO et al., 2001). Vários destes fatores puderam ser identificados e contribuíram para praticamente extinguir várias subpopulações de cervo-do-pantanal do Rio Paraná após a construção da Usina Hidroelétrica de Porto Primavera (DUARTE, 2001). Frente a esse impacto, foi implantado, em 1998, um programa de conservação do cervo-do-pantanal em cativeiro, visando principalmente expandir os conhecimentos sobre esta espécie e a manutenção da variabilidade genética desta população (DUARTE, 2001; ZANETTI e DUARTE, 2008).

Como consequência direta da expressiva redução nos efetivos populacionais ocorre a perda da variabilidade genética (devido à deriva genética, depressão endogâmica e consangüinidade) e, neste contexto, é provável que problemas de fertilidade surjam (KRZYWINSKY, 1987; DUARTE e GARCIA, 1997; PICKARD et al., 2001). Como alternativa para tal problema, a utilização de biotécnicas ligadas à reprodução (i.e. inseminação artificial, transferência de embriões, fertilização *in vitro*, colheita e criopreservação de sêmen) pode contribuir diretamente para a conservação de espécies ameaçadas por facilitar o manejo reprodutivo, promover acréscimo da variabilidade genética (WILDT, 1989; BAINBRIDGE et al., 1999) e a manutenção de populações estáveis em cativeiro e bancos atualizados de germoplasma (WILDT et al., 1997; WILDT e WEMMER, 1999). O sucesso na aplicação destas biotécnicas, no entanto, é dependente de conhecimentos básicos relacionados à biologia, como ocorrência de sazonalidade reprodutiva e caracterização da atividade ovariana e da

gestação (DUARTE e GARCIA, 1995), parâmetros esses que podem ser monitorados através de análises dos hormônios esteróides reprodutivos (progesterona e estrógeno). Adicionalmente, para populações pequenas ou ameaçadas, as análises endócrinas podem auxiliar na identificação de problemas na concepção, perda embrionária e aborto, sendo assim, um importante instrumento para a avaliação do sucesso reprodutivo, da dinâmica populacional e da saúde da população (WASSER et al., 1995; BORJESSON et al., 1996).

Algumas características reprodutivas já foram abordadas anteriormente nesta espécie. Sabe-se que as fêmeas são poliétricas, possuem ciclo estral de aproximadamente 24 dias (DUARTE e GARCIA, 1997; SCHWARZENBERGER e DREBEN, 1998), período de gestação de 9 meses (FRÄDRICH, 1995; TOMÁS et al., 1997) e produzem um único filhote por gestação, que possui a pelagem semelhante à dos animais adultos (JABBOUR, et al., 1997; TOMAS et al., 1997). Há citação de estro pós-parto em *B. dichotomus* (FRÄDRICH, 1995) o que possibilita a ocorrência de mais de um nascimento no ano e demonstra que, para a espécie, não há estacionalidade reprodutiva nas condições de cativeiro. Estes resultados foram confirmados por SCHWARZENBERGER e DREBEN (1998), que monitoraram a espécie ao longo de um ano e observaram que as três fêmeas estudadas ciclaram por todo o período do estudo.

Segundo PINDER (1996), nas várzeas do Rio Paraná, os nascimentos iniciam-se no período em que a cheia entra no estado de vazante e estendem-se até o começo do período seco, quando os animais concentram-se nos locais mais baixos e alagados da planície. No entanto, outros períodos foram descritos para o nascimento dos filhotes (JABBOUR et al., 1997; TOMÁS et al., 1997). Provavelmente, esta diferença se deva ao ambiente distinto em que cada estudo foi conduzido, uma vez que as estratégias reprodutivas são adotadas para aumentar as chances de sucesso reprodutivo e são geralmente moldadas pelas condições ambientais (BRONSON, 1989).

Comportamentos agonísticos entre machos do Pantanal Mato-grossense foram descritos, o que sugere que algum nível de disputa por território ou por fêmeas possa existir (TOMÁS et al., 1997). Os machos não competem por haréns, ao invés disso, eles defendem seus territórios e investigam quanto ao estro, periodicamente, as fêmeas que

interpolam a área de moradia com a sua. Quando detecta fêmea sexualmente receptiva, o macho tenta defendê-la até a cópula e procura outra fêmea em seguida (TOMÁS et al., 1997).

2.2. Biologia e fisiologia reprodutiva em cervídeos

2.2.1. Ciclo estral

O ciclo estral é central para a função reprodutiva. Ele é caracterizado por padrões repetidos de proliferação, diferenciação e transformação celulares que cercam o desenvolvimento folicular e a ovulação, assim como a formação, função e regressão do corpo lúteo (CL) (BERISHA e SCHAMS, 2005). O controle do ciclo estral é feito por complexas interações entre os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), sintetizado e secretado pelo hipotálamo, estimula a adenohipófise a produzir e liberar as gonadotrofinas, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), que por sua vez atuam nas gônadas, nas quais estimulam modificações estruturais, secreção de hormônios esteróides reprodutivos e outros fatores locais de controle da atividade reprodutiva (BROWN et al., 2004).

O desenvolvimento inicial do folículo é independente da ação das gonadotrofinas. Essa primeira etapa de crescimento é caracterizada por proliferação das células da granulosa e aparecimento de receptores para o FSH e LH na granulosa e na teca, respectivamente, dos folículos primordiais, que os tornam responsivos às gonadotrofinas (folículo pré-antral). Na segunda fase, também conhecida como fase de recrutamento folicular, ocorre intensa proliferação e diferenciação celular, os folículos adquirem capacidade esteroidogênica e tornam-se dependentes do aporte gonadotrófico. Essa segunda fase permite a passagem para o estágio de seleção folicular, ao final do qual emerge um folículo dominante destinado à ovulação. Este folículo secreta hormônios como o estradiol e a inibina, que suprimem a secreção de FSH a níveis abaixo do requerido para ativar o desenvolvimento de novos folículos e suficiente para provocar atresia dos demais folículos da mesma onda (HUNTER et al., 1992). A ovulação do folículo dominante, no entanto, não é garantida, e depende do

folículo destinado a ovulação estar no grupo de folículos saudáveis com mais de 2mm de diâmetro no momento da luteólise (McNATTY, 1982; FORTUNE, 1994) e, em até 10 horas, emergir como um folículo estrogênico ativo (McNATTY, 1982). Para a secreção de estradiol, deve haver um sinergismo entre as células da teca e da granulosa que, sob ação de LH e FSH, respectivamente, produzem andrógenos (principalmente testosterona) e a enzima aromatase. Os andrógenos produzidos pelas células da teca difundem-se no fluido folicular e sob ação da aromase são convertidos em estradiol. Os níveis aumentados de estradiol causam proliferação das células da granulosa e modificações nos receptores de FSH destas células, que passam a ser sensíveis ao LH. Além disso, o estradiol induz o pico de secreção de LH, e consequentemente a ovulação (DAVIDSON et al., 1999). Por outro lado, se o folículo emergir como dominante na presença de um CL, a secreção de grande quantidade de progesterona inibe os pulsos de GnRH e consequentemente o pico de LH, impedindo a ovulação. A diminuição dos pulsos de GnRH, por sua vez, causa um aumento na secreção de FSH, que é necessário para ativar um novo recrutamento folicular (CHABBERT-BUFFER et al., 2000; McCORKELL et al., 2006). Neste caso, o folículo dominante entra em atresia e ocorre nova onda de crescimento folicular.

Em *Cervus elaphus*, o desenvolvimento folicular ocorre em ondas caracterizadas por crescimento regular e sincrônico de um grupo de folículos, que se inicia imediatamente após a ovulação (BERISHA e SCHAMS, 2005). Nesta espécie, o desenvolvimento do folículo antral é similar ao de outras espécies de ruminantes monovulares, e pelo menos um folículo grande (~8mm de diâmetro) pode ser observado em todos os estágios do ciclo estral (McLEOD et al., 2001). Contraditoriamente, ASHER et al. (1997) reportaram que poucas fêmeas tiveram folículos ≥ 6 mm de diâmetro antes de 3-4 dias após a ovulação. O número de ondas de crescimento folicular por ciclo variou entre 2 e 4 e relacionou-se positivamente com a duração do ciclo estral e inversamente com a magnitude da dominância folicular (diâmetro e duração do folículo dominante) (BERISHA e SCHAMS, 2005). Este número, no entanto, parece ser influenciado por fatores genéticos, nutricionais, estresse térmico e meio ambiente, em bovinos (FORTUNE, 1994).

Após a ovulação, o folículo colapsado sofre luteinização, que consiste em uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas que ocorrem nas células da teca interna e da granulosa, devido ao pico pré-ovulatório de LH. Uma das principais modificações que ocorre nesta fase é a angiogênese, pois, para o desenvolvimento do CL é necessário um aporte sanguíneo adequado (BERISHA e SCHAMS, 2005). Entre os dias 2 e 5 do ciclo estral, o aporte sanguíneo aumenta gradualmente no CL em formação, em paralelo com o aumento do seu volume e da concentração plasmática de progesterona (ACOSTA et al., 2003). Em ruminantes, os hormônios luteotróficos primários são o LH e o hormônio do crescimento (GH). O LH estimula a secreção de progesterona pelas células luteais pequenas, enquanto que o GH age principalmente nas células luteais grandes, que são responsáveis por aproximadamente 80% da produção total de progesterona pelo CL. Além da produção de progesterona, o GH estimula a secreção de oxitocina pelo CL (NISWENDER et al., 1985; LIEBERMANN e SCHAMS, 1994; KOELLE et al., 1998; NISWENDER et al., 2000).

A luteólise ocorre ao final de cada ciclo não-fértil devido a exposição prolongada dos tecidos a ação da progesterona. Acredita-se que nas fases luteais inicial e média do ciclo estral seu efeito seja antiluteolítico e na fase lútea final a progesterona atue restabelecendo a sensibilidade endometrial à oxitocina, favorecendo a luteólise. A oxitocina secretada pelo CL estimula o endométrio a secretar $\text{PGF}_{2\alpha}$, que por sua vez estimula a secreção de oxitocina pelo CL, o que configura uma relação de retro-alimentação positiva entre o útero e o CL (BAINBRIDGE et al., 1996). $\text{PGF}_{2\alpha}$ é uma luteolisina primária em *Cervus elaphus* (BAINBRIDGE et al., 1995), e o aumento na sua secreção pelo endométrio causa inicialmente a perda da capacidade esteroidogênica do CL em até 12h (luteólise funcional). Posteriormente, inicia-se a morte celular, ocorrendo reabsorção e involução tecidual em poucos dias (luteólise estrutural) (BERISHA e SCHAMS, 2005).

A vida útil do CL influencia a duração do ciclo estral e o número de ondas de crescimento folicular que haverá em cada ciclo. Essa deve ser suficientemente longa para permitir ao embrião recém desenvolvido sintetizar e liberar fatores que mantenham o CL e conseqüentemente a gestação e, ao mesmo tempo, ser relativamente curta para

que o animal não fecundado possa retornar ao estado potencialmente fértil o mais rápido possível (DAVIDSON et al., 1999).

A taxa de fertilidade, o número de filhotes nascidos por gestação (em espécies que possuem ovulações múltiplas) e a proporção entre os sexos dos filhotes são características reprodutivas comumente reportadas como ambiente-dependentes (BRONSON, 1989). A hierarquia da fêmea parece influenciar a frequência do sexo dos filhotes em *Cervus elaphus* e *Odocoileus virginianus* (VERME e OZAGA, 1981; CLUTTON-BROCK et al., 1984), sendo que fêmeas dominantes produzem mais filhotes machos e as subordinadas produzem mais fêmeas. Esta estratégia aumenta as chances da fêmea dominante propagar sua genética em sistemas de acasalamento poligínicos (nos quais um macho fecunda várias fêmeas) e favorece a dispersão do material genético desta, caso ela consiga produzir um filhote macho com capacidade de se tornar dominante. Neste contexto, foi descrito que o investimento materno é maior quando o filhote é macho (CLUTTON-BROCK et al., 1981). Em termos biológicos, pouco se sabe sobre como esta seleção se dá em *C. elaphus*. FLINT et al. (1997) formularam a hipótese de que alguma característica que confira dimorfismo sexual ao trofoblasto (ex: secreção diferenciada de interferon) seja capaz de induzir respostas uterinas, sob influência da progesterona, capazes de causar morte embrionária prematura do conceito, dependendo do seu sexo. VERME e OZAGA (1981) sugerem que as fêmeas dominantes de *O. virginianus* têm privilégios na hora da cópula, e que a hora de fertilização influencia o sexo do filhote. Segundo estes autores, as fêmeas que copularam mais tardiamente (49-95h depois do início do estro) apresentaram 81% de filhotes machos, enquanto das que copularam em até 24h do início do estro, apenas 14% dos filhotes foram machos.

2.2.2. Gestação

A duração da gestação possui uma ampla variação entre as espécies de cervídeos em consequência da alta diversidade morfológica e fisiológica que existe entre elas. De acordo com McKEOWN et al. (1976), os padrões reprodutivos em mamíferos são influenciados pela seleção natural, que determina qual estratégia

reprodutiva cada espécie vai adotar. Estas estratégias podem ser influenciadas pelo crescimento fetal, número de fetos produzidos, duração da gestação e maturidade do filhote ao nascimento. Em geral, a duração da gestação é diretamente relacionada ao tamanho corporal da fêmea e à maturidade do filhote ao nascimento e inversamente relacionada ao número de filhotes produzidos por gestação. Estas relações podem ser observadas para os cervídeos, nos quais gestações mais curtas geralmente ocorrem em espécies menores (ex: *M. gouazoubira*- 7 meses; PEREIRA et al., 2006) e gestações mais longas em espécies de maior tamanho corpóreo (ex: *B. dichotomus*- ~9 meses; FRADRICH, 1995). A espécie *O. virginianus*, apesar de seu grande porte, apresenta gestações de 6,5 meses (VERME, 1969), que geralmente são gêmeares.

A respeito da gestação propriamente dita, ela compreende o período entre a fertilização e o parto e sua manutenção é dependente de processos altamente controlados. Um dos mecanismos mais refinados envolvidos na gestação é o reconhecimento materno, quando o feto sinaliza sua presença para a mãe através da secreção do interferon-tau (IFN- τ) produzido pelo trofoblasto, que desencadeia respostas nos tecidos da fêmea gestante. IFN- τ suprime a liberação pulsátil de PGF_{2 α} pelo endométrio, inibe a expressão de receptores de oxitocina endometriais e modula a atividade dos receptores de estrógenos, que estão relacionados à estimulação da síntese de receptores para oxitocina (DEMMERS et al., 2001; DRION et al., 2003). A identificação de receptores para IFN- τ no hipotálamo e hipófise e a capacidade deste composto diminuir a liberação de oxitocina extra-ovariana podem sugerir o envolvimento do sistema nervoso central no reconhecimento materno da gestação em cervídeos (BAINBRIDGE e JABBOUR, 1999).

BAINBRIDGE et al. (1996) mostraram que fêmeas de *Cervus elaphus* retardaram a luteólise após a administração de uma molécula análoga ao INF- τ , o INF- α , durante o ciclo estral. Para esta espécie, o INF- τ é mais evidente no fluido uterino entre os dias 14 e 20 da gestação (DEMMERS et al., 1999), com maior liberação no dia 18, devido a mudanças que ocorrem no blastocisto, que passa da forma esférica para a alongada (DEMMERS et al., 2000). Esta liberação de INF- τ , que ocorre no fim da fase luteal do

ciclo normal, previne a regressão do corpo lúteo. A manutenção dos níveis elevados de progesterona suprime o ciclo subsequente e suporta a gestação (DRION et al., 2003).

Durante a gestação, a placenta sintetiza progesterona na maioria das espécies de cervídeos, no entanto, a importância desta secreção é variável. Em espécies nas quais o CL é o órgão mais importante de secreção de progesterona, a concentração desse hormônio permanece relativamente constante e similar à observada para a fase luteal do ciclo estral durante toda a gestação e a placenta tem um papel secretório secundário. Nesse caso, há uma correlação entre o nível sérico de progesterona, o número de fetos produzidos e, conseqüentemente, o número de CLs formados (PLOTKA et al., 1977). Outras espécies que apresentam esse padrão de secreção de progesterona são *O. virginianus* (PLOTKA et al., 1977), *Rangifer tarandus tarandus* (FLOOD et al., 2005) e pelo menos no início da gestação em *Cervus elaphus* (ASHER et al., 1996).

A placenta, no entanto, assume uma importante função secretória em várias espécies de cervídeos e esta fonte adicional de progesterona provoca um aumento expressivo na concentração deste hormônio geralmente a partir do segundo trimestre de gestação. Esse aumento ocorre devido à presença de células binucleares características na interface entre o feto e a mãe. Estas células são produzidas continuamente no trofoblasto, e migram para o epitélio materno onde se fusionam com células de origem materna para formar massas sinciciais que subsequentemente são reabsorvidas pelas células do trofoblasto (FLOOD et al., 2005). Estas células são sabidamente esteroidogênicas em bovinos, ovinos e caprinos (REIMERS et al., 1985; GOSS e WILLIAMS, 1988; WOODING et al., 1996).

A esteroidogênese é evidentemente mais rápida nos tecidos luteais do que na placenta, portanto, no início da gestação, quando a massa placentária é pequena, a importância desta fonte de síntese e secreção de progesterona é limitada. A partir do meio da gestação a massa placentária torna-se muito maior do que a massa lútea. Portanto, é provável que nas fases intermediária e final da gestação a placenta seja uma fonte fisiologicamente significativa de síntese de esteróides (FLOOD et al., 2005). Com o desenvolvimento embrionário e o estabelecimento da placenta, ocorre um

aumento na concentração sanguínea de progesterona que se correlaciona positivamente com o tamanho do concepto em *Capreolus capreolus* (SEMPÉRE et al., 1989). Adicionalmente, foi relatado que o feto possui uma importância significativa na secreção de esteróides reprodutivos em uma série de espécies. Esta secreção está biologicamente relacionada ao desenvolvimento das glândulas mamárias e à inibição da lactação (MOLLETT et al., 1976) e seria uma estratégia de competição entre o feto e o filhote lactente, com a qual o feto asseguraria quantidades maiores de energia sendo direcionadas para o seu crescimento (FLOOD et al., 2005). Sendo assim, os níveis de progestinas foram utilizados para várias espécies como um método indireto para diagnóstico de gestação (*Capreolus capreolus*: SEMPÉRE, 1977; *Cervus elaphus nelsoni*: WHITE et al., 1995; GARROT et al., 1998; *Cervus elaphus nannodes*: STOOPS et al., 1999; *Cervus eldi thamin*: MONFORT et al., 1990; *Dama dama*: WILLARD et al., 1998).

De forma distinta, os níveis séricos de estrógenos foram baixos durante a maior parte da gestação em *O. virginianus*, *Rangifer tarandus tarandus* e *Cervus eldi thamin*, e começaram a aumentar seis semanas antes do parto, à medida que este se aproximava (PLOTKA et al., 1977; MONFORT et al., 1990; ROPSTAD et al., 2005). O aumento nos níveis de estrógenos não foi associado com o número de fetos, mas pôde ser associado com o aumento dos corticóides, que determina o fim da gestação. Os níveis de estrógeno diminuíram abruptamente após o parto (PLOTKA et al., 1977).

Algumas variáveis podem influenciar o aparecimento de mudanças nas características da gestação. Para *O. virginianus*, uma restrição nutricional significativa pode resultar no prolongamento da gestação e nascimento de filhotes com massa corporal reduzida (VERME, 1965). Como a redução na massa corpórea dos filhotes ao nascimento correlaciona-se com o aumento na mortalidade desses, a fêmea deve investir grande quantidade de energia para o desenvolvimento do feto, ainda que isso resulte em perda de sua própria condição corporal (GARCÍA et al., 2006). Esta relação pode ser ressaltada pelo fato de que, em alces, mesmo quando as fêmeas estão expostas a condições extremamente críticas de dieta e com condição corpórea muito ruim ou próxima da morte, a ocorrência de abortos é rara a partir do segundo trimestre

da gestação (COOK et al., 2002). Isso se deve ao alto custo energético do processo reprodutivo, e a perda da gestação a partir desse período, implica na mobilização de grande quantidade de energia, sem obter sucesso na reprodução. A espoliação energética da fêmea, no entanto, pode causar a interrupção da sua reprodução e ser uma estratégia adequada em termos de balanço energético, além de aumentar as chances de sucesso reprodutivo depois do período de descanso (PLOTKA et al., 1977). PUTMAN (1988) descreveu que para cervídeos os nascimentos gemelares são mais comuns em áreas com densidade populacional baixa e grande disponibilidade de alimentos, constituindo-se outra estratégia reprodutiva para a adaptação de cervídeos às condições ambientais.

2.2.3. Pós-parto

Acredita-se que estro pós-parto ocorra na maioria dos cervídeos neotropicais. Este já foi descrito para *B. dichotomus* (FRADRICH, 1995), *Pudu puda* (BLANVILLAIR et al., 1997), *Mazama americana* (GARDNER, 1971), *M. nana* (GARDNER, 1971) e *M. gouazoubira* (PEREIRA et al., 2006). Assim como para a maioria das espécies de mamíferos, as estratégias reprodutivas em cervídeos são altamente moldadas pelas condições ambientais (BRONSON, 1989). A abundância de alimentos de forma contínua na natureza parece fornecer a energia necessária para a mãe e o filhote de cervídeos tropicais, uma vez que no fim da gestação e na lactação a fêmea requer mais energia devido ao rápido crescimento fetal e do filhote (ROBBINS, 1983). Neste contexto, a ocorrência de estro após o parto pode ocorrer principalmente em espécies que ocupam ambientes nos quais não há restrição suficiente na disponibilidade de alimentos para limitar a atividade reprodutiva ao longo do ano (PINDER, 1992).

Quando o ambiente provém recursos alimentícios para a recuperação da condição corporal, as fêmeas geralmente concebem no estro pós-parto (BUNNELL, 1987). Entretanto, o ambiente hormonal depois do parto pode propiciar uma condição favorável para a expressão do estro comportamental, mas o trato reprodutivo ainda não estar preparado para sustentar uma nova gestação (PEREIRA et al., 2006). Em *Gazella dama mohor*, observou-se uma taxa de concepção de apenas 30,8% no primeiro estro

pós-parto (PICKARD et al., 2001). Esta baixa eficiência reprodutiva pode estar relacionada a características próprias do período pós-parto. Em ovinos, a secreção de progesterona ocorre de forma mais lenta do que o normal e é freqüente a observação do primeiro ciclo ovariano com curta duração no início do período pós-parto. Essas alterações decorrem da influência luteolítica do útero em involução, que libera $\text{PGF}_{2\alpha}$ de forma crescente e prolongada e da incompleta restauração na liberação de gonadotrofinas, que provoca crescimento e maturação folicular insuficientes e ovulação de folículos com reduzido número de células na granulosa (SCHIRAR et al., 1989).

2.3. Hormônios fecais

O monitoramento dos parâmetros reprodutivos e da fisiologia reprodutiva em animais selvagens, especialmente de cervídeos, é difícil. Parte das limitações impostas aos estudos desse grupo esta relacionada ao comportamento intratável dos animais e a alta susceptibilidade desses ao estresse. Nesse contexto, o uso de técnicas invasivas para avaliação reprodutiva (ex: ultrassonografia e a colheita sistemática de amostras sanguíneas) é complexo em cervídeos, por se tornarem potenciais fontes de estresse e de causas de injúrias aos animais. Os métodos não-invasivos de monitoramento dos parâmetros endócrino-reprodutivos são os de eleição para este grupo, pois dispensam contenção química ou física para colheita de amostras de sangue sucessivas, evitando os riscos intrínsecos desses procedimentos e situações de estresse (MONFORT, 2002; SCHOENECKER et al., 2004). Nessas situações, ocorre a ativação da cortical da adrenal com liberação de cortisol (STEPHENS et al., 1980), que atua mobilizando as reservas de energia e adequando-as à necessidade fisiológica que aumenta durante o estresse, e de adreno-progesterona, que suprime o pico pré-ovulatório de LH (MONFORT et al., 1990). Neste processo, os eventos reprodutivos podem ser interrompidos, comprometendo a veracidade da informação endócrina obtida (LASLEY et al., 1989; MORROW e MONFORT, 1998; HAMASAKI et al., 2001).

Várias matrizes biológicas podem ser utilizadas para monitorar eventos endócrinos (ex: sangue, fezes, urina, saliva e suor), e cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens sobre as demais. As dosagens hormonais realizadas a partir

das fezes tornaram-se confiáveis após demonstração de correspondência entre a concentração plasmática dos hormônios esteróides e a concentração de seus metabólitos nas fezes (MONFORT et al., 1993; SHAW et al., 1995; BERKLEY et al., 1997; THOMPSON et al., 1998; CAPEZZUTO et al., 2008). Para melhor entendimento desta correspondência, os mecanismos de metabolismo e excreção destes hormônios devem ser considerados. Os hormônios esteróides são rapidamente secretados no sangue após sua síntese (CHALLIS et al., 1973; GANJAM et al., 1975; THOMPSON et al., 1998), mas levam de 12 a 18 horas para serem excretados nas fezes de ruminantes (MORROW e MONFORT, 1998; THOMPSON et al., 1998). Esse período reflete o tempo necessário para que sejam metabolizados pelo fígado, excretados com a bile e conduzidos pelos intestinos com o bolo fecal (TAYLOR, 1971; THOMPSON et al., 1998). A velocidade do trânsito intestinal é o principal fator que determina este período, e ela pode ser influenciada pela digestibilidade da dieta, quantidade de alimento ingerido e por características funcionais e estruturais do trato digestivo (STEVENS e HUME, 1995; PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; WASSER et al., 2002).

A dosagem dos hormônios esteróides e seus metabólitos feita a partir das fezes é amplamente utilizada em espécies selvagens, embora não seja possível uma caracterização muito precisa dos eventos reprodutivos através desta técnica (por não ser possível investigar os hormônios protéicos, LH e FSH, e por haver um intervalo entre a secreção do hormônio e sua excreção nas fezes). Esta matriz possibilita a condução de estudos em ambientes naturais, de indivíduos ou de grupos, a colheita das amostras pode ser feita do chão, nas condições mais adversas e sem riscos para os animais ou para o homem (HEISTERMANN et al., 1993; MONFORT et al., 1993; HODGES, 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996). Outra vantagem é que os metabólitos distribuem-se uniformemente pelas fezes, como observado em alce (THOMPSON et al., 1998), carneiro (PALME et al., 1996) e *Oryx dammah* (MORROW e MONFORT, 1998) e, portanto, pequenas quantidades da amostra são necessárias para que uma acurada caracterização do estado endócrino e fisiológico do animal seja feita.

No entanto, a partir de 12 horas após a defecação, pode haver variação na concentração hormonal original devido à degradação microbiana (GRAHAM, 2001).

Algumas das aplicações mais importantes relacionadas ao monitoramento dos hormônios esteróides envolvidos no processo reprodutivo são: (1) acessar o início da puberdade, através do início da atividade esteroideogênica das gônadas; (2) geração de dados espécie-específicos como ocorrência de sazonalidade, duração de ciclo estral, estro, fase inter-luteal e fase luteal não-gestante; (3) previsão de parto, identificação de prenhez e caracterização do período pós-parto; (4) identificação de causas de inatividade ou hiperatividade reprodutiva, incluindo patologias como cistos foliculares e retenção do corpo lúteo; (5) otimização do tratamento exógeno com gonadotropinas, usado em reprodução assistida, com objetivo de avaliar a resposta ovariana; (6) acessar os níveis fisiológicos de estresse como método para avaliar e melhorar o ambiente, manejo e o bem estar do animal visando potencializar a reprodução e (7) fazer comparações entre espécies para estudos em conservação e evolução de mecanismos reprodutivos (BROWN e WILDT, 1997). Neste aspecto, vários estudos foram realizados com ungulados visando o monitoramento endócrino não-invasivo da reprodução, através dos hormônios esteróides fecais e seus metabólitos (SHAW et al., 1995; WHITE et al., 1995; BORJESSON et al., 1996; BLAINVILLAIN et al., 1997; GARROTT et al., 1998; MORROW e MONFORT, 1998; THOMPSON et al., 1998; KAPKE et al., 1999; STOOPS et al., 1999; PICKARD et al., 2001; OSTROWSKI et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; entre outros).

Assim, este estudo pretende contribuir para um entendimento mais amplo sobre a espécie, cervo-do-pantanal, e fornecer dados consistentes relacionados à sua reprodução. Espera-se também que tais conhecimentos possam auxiliar no manejo reprodutivo desta espécie e que, de alguma forma venham a favorecer sua conservação.

3. Referências bibliográficas

ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, p. 759-767, 2003.

ASHER, G.W.; FISHER, M.W.; BERG, D.K.; WALDRUP, K.A.; PEARSE, A.J. Luteal support of pregnancy in red deer (*Cervus elaphus*): effect of cloprostenol, ovariectomy and lutectomy on the viability of the post-implantation embryo. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 41, p. 141-151, 1996.

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*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 111, p. 91-99, 1997.

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

BAINBRIDGE, D. R. J.; CHAPPLE, D. G.; LOUDON, A. S. I.; JABBOUR, H. N. Immuno-neutralization 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. J.; DAVIES, M. H.; SCARAMUZZI, R. J.; JABBOUR, H. N. Exogenous interferon delays luteal regression in red deer hinds (*Cervus elaphus*) by suppressing steroid-induced endometrial oxytocin sensitivity. **Biology of Reproduction**, Columbus, v. 55, p. 883-888, 1996.

BAINBRIDGE, D. R. J.; JABBOUR, H. N. Source and site of action of anti-luteolytic interferon in red deer (*Cervus elaphus*): possible involvement of extra-ovarian oxytocin secretion in maternal recognition of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 116, p. 305-313, 1999.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 29, p. 305-317, 2005.

BERKELEY, E. V.; KIRKPATRICK, J. F.; SCHAFFER, N. E.; BRYANT, W. M.; THRELFALL, W. R. Serum and fecal steroids analysis of ovulation, pregnancy, and parturition in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). **Zoo Biology**, New York, v. 16, p. 121-132, 1997.

BLANVILLAIN, C.; BERTHIER, J. L.; BOMSEL-DEMONTTOY, M. C.; SEMPÉRÉ, A. J.; OLBRICHT, G.; SCHWARZENBERG, F. Analysis of reproductive data and measurement of fecal progesterone metabolites to monitor the ovarian function in the Pudu, *Pudu puda* (*Artiodactyla, Cervidae*). **Mammalia**, Paris, v. 61, n. 4, p. 589-602, 1997.

BORJESSON, D. L.; WALTER, M. B.; GARDINER, I. A.; DEFORGE, J.; LASLEY, B. Pregnancy detection in Bighorn sheep (*Ovis canadensis*) using a fecal-based enzyme immunoassay. **Journal of Wildlife Diseases**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 67-74, 1996.

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

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

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.

BUNNELL, F. L. Reproductive tactics of Cervidae and their relationships to habitat. In: WEMMER, C. (Ed.). **Biology and management of the Cervidae**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 145-167.

CAPEZZUTO, A.; CHELINI, M. O. M.; FELIPPE, E. C. G.; OLIVEIRA, C. A. Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids throughout gestation in goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 103, p. 78-86, 2008.

CHABBERT-BUFFER, N.; SKINNER, D. C.; CARATY, A.; BOUCHARD, P. Neuroendocrine effects of progesterone. **Steroids**, São Francisco, v. 65, p. 613-620, 2000.

CHALLIS, J. R. G.; HARRISON, F. A.; HEAP, R. B. The kinetics of oestradiol-17 α metabolism in the sheep. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 57, p. 97-110, 1973.

CLUTTON-BROK, T. H.; ALBON, S. D.; GUINNESS, F. E. Parental investment in male and female offspring in polygynous mammals. **Nature**, London, v. 289, p. 487-489, 1981.

CLUTTON-BROK, T. H.; ALBON, S. D.; GUINNESS, F. E. Maternal dominance, breeding success and birth sex ration in red deer. **Nature**, London, v. 308, p. 358-360, 1984.

COOK, R. C.; COOK, J. G.; GARROT, R. A.; IRWIN, L. L.; MONFORT, S. L. Effects of diet and body condition on fecal progestagen excretion in elk. **Journal of Wildlife Diseases**, Copenhagen, v. 38, p. 558-565, 2002.

D'ALESSIO, S.; VARELA, D.; GAGLIARDI, F.; LARTIGAU, B.; APRILE, G.; MÓNACO, C.; FORTABAR, S. H. Ciervo de los pântanos. In: DELLAFIORE, C. M.; MACIERA, N. (eds.) **Los ciervos autóctonos de la Argentina**. 1. ed. Buenos Aires: Panca, 2001. p. 14-26.

DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H.; BRINSKO, S. P. Reprodução e lactação. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: 1-579, 1999.

DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. P. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 41-49, 2001.

DEMMERS, K. J., JABBOUR, H. N., DEAKIN, D. W.; FLINT, A. P. Production of interferon by red deer (*Cervus elaphus*) conceptuses and the effects of rolFN-tau on the timing of luteolysis and the success of asynchronous embryo transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 118, p. 387-395, 2000.

DEMMERS, K. J.; KALUZ, S.; DEAKIN, D. W.; JABBOUR, H. N.; FLINT, A. P. Production of interferon by the conceptus in red deer *Cervus elaphus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 115, p. 59-65, 1999.

DRION, P. V.; HANZEN, C.; WIRTH, D.; BECKERS, J. F.; LEBOEUF, B.; ROPSTAD, E.; BALLIGAND, M.; BAUVIR, E.; GABRIEL, A.; COLLIN, B. Physiologie de la reproduction et endocrinologie chez les cervidés: une revue. **Annales de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 147, p. 291-313, 2003.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: Funep, 1996. 8p.

DUARTE, J. M. B. O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: Resultado de dois anos de pesquisa. Jaboticabal: FUNEP, 2001. CD ROM.

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

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Tecnologia da Reprodução para Propagação e Conservação de Espécies Ameaçadas de Extinção. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 228-238.

FLINT, A. P. F.; ALBON, S. D.; LOUDON, A. S. I.; JABBOUR, H. N. Behavioral dominance and corpus luteum function in Red deer *Cervus elaphus*. **Hormones and Behavior**, Orlando, v. 31, p. 296-304, 1997.

FLOOD, P. F.; TYLER, N. J. C.; READ, E. K.; RODWAY, M. J.; CHEDRESE, P. J. Ovarian and placental production of progesterone and oestradiol during pregnancy in reindeer. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, p. 147-162, 2005.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, Columbus, v. 50, p. 225-232, 1994.

FRÄDRICH, H. Erfahrungen mit dem sumpfhirsch (*Blastocerus dichotomus*) im Zoo Berlin. **Zoologische Garten NF**, Berlin, v. 65, p. 81-100, 1995.

GANJAM, V. K.; KENNEY, R. M.; FLICKINGER, G. Effect of exogenous progesterone on its endogenous levels: Biological half-life of progesterone binding in mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v. 23, p. 183-188, 1975.

GARCÍA, A. J.; LANDETE-CASTILLEJOS, T.; CARRIÓN, D.; GASPAREL-LÓPES, E.; GALLEGOS, L. Compensatory extension of gestation length with advance of conception in red deer (*Cervus elaphus*). **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 305, p. 55-61, 2006.

GARDNER, A. L. Postpartum estrus in a red brocket deer, *Mazama americana*, from Peru. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 52, p. 623-624, 1971.

GARROTT, R.; MONFORT, S. L.; WHITE, P. J.; MASHBURN, K. L.; COOK, J. G. One-sample pregnancy diagnosis in elk using fecal steroid metabolites. **Journal of Wildlife Diseases**, Copenhagen, v. 34, n. 1, p. 126-31, 1998.

GONZÁLEZ, S. Estado de conservação dos cervídeos da América do Sul. **Logos tempo e ciencia**, v. 2, p. 61-65, 1998.

GOSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. In vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and parturition. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 83, p. 565-573, 1988.

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 Biology**, New York, 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. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, p. 195-198, 2001.

HAYSSEN, V. A.; TIENHOVEN, A. V. **Asdell's Patterns of Mammalian reproduction: a compendium of species-specific data**. Ithaca: Cornell University Press, 1993.

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

HODGES, J. K. Determining and manipulating female reproductive parameters. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S.; HARRIS, H. (Ed.). **Wild mammals in captivity principles and techniques**. Chicago and London: The University of Chicago Press, 1996. p. 418-428.

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

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

KAPKE, C. A.; ARCESE, P.; ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G. R. Estradiol and progesterone metabolite concentration in White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) feces. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 30, n. 3, p. 361-371, 1999.

KOELLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, Columbus, v. 59, p. 836-846, 1998.

KRZYWINSKY, A. Artificial insemination and embryo transfer in deer: applying these methods for propagating endangered species. In: **Biology of management of the Cervidae**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 443-449.

LASLEY, B. L.; TOEDSSON, M.; BRAVO, W.; HAGGERTY, M. A. Estrogen conjugate measurements to monitor ovarian activity. **Theriogenology**, Stoneham, v. 31, n. 1, p. 127-39, 1989.

LIEBERMANN, J.; SCHAMS, D. Actions of somatotrophin on oxytocin and progesterone release from the micro-dialysed bovine corpus luteum in vitro. **Journal of Endocrinology**, Almondsbriy, v. 143, p. 243-250, 1994.

MAURO, R. A.; MOURÃO, G. M.; PEREIRA da SILVA, M.; COUTINHO, M. E.; TOMÁS, W. M.; MAGNUSSON, W. E. Influência do habitat na densidade e distribuição de cervo (*Blastocerus dichotomus*) durante a estação de seca no pantanal Mato-Grossense. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, p. 745-751, 1995.

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

McKEOWN, T., MARSHALL, T. and R. G. RECORD, 1976. Influences on fetal growth. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, 47: 167-181.

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. Ovarian follicle development from the onset of luteal regression in humans and sheep. In: ROLAND, R.; van HALL, E. V.; HILLIER, S. G.; McNATTY, K. P.; SHOEMAKER, J. (Eds.). **Follicular maturation and ovulation**, Amsterdam: Excerpta Medica Press, 1982. p. 1-18.

MOLLETT, T. A.; ERB, R. E.; MONK, E. L.; MALVEN, P. V. Changes in estrogen, progesterone, prolactin and lactation traits associated with injection of estradiol-17 β and progesterone in lactating cows. **Journal of Animal Science**, Sanvy, v. 42, p. 655-663, 1976.

MONFORT, S. L. Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations. In: HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; RODGER, J. C.; WILDT, D. E. **Reproductive science and integrated conservation**, 1. ed. Cambridge: 2002. p. 147-165.

MONFORT, S. L.; SCHWARTZ, C. C.; WASSER, S. K. Monitoring reproduction in moose using urinary and fecal steroid metabolites. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 57, p. 400-407, 1993.

MONFORT, S. L.; WEMMER, C.; KEPLER, T. H.; BUSH, M.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Monitoring ovarian function and pregnancy in Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) by evaluating urinary steroid metabolite excretion. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, p. 271-281, 1990.

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

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; McINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Review of Physiology**, Baltimore, v. 80, p. 1-29, 2000.

NISWENDER, G. D.; SCHWALL, R. H.; FITZ, T. A.; FARIN, C. E.; SAWYER, H. R. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. **Recent Progress in Hormone Research**, San Diego, v. 41, p. 101-151, 1985.

OSTROWSKI, S.; BLANVILLAIN, C.; MÉSOCHINA, P.; ISMAIL, K.; SCHWARZENBERGER, F. Monitoring reproductive steroids in feces of Arabian oryx: toward a non-invasive method to predict reproductive status in the wild. **Wildlife Society Bulletin**, Bethesda, v. 33, p. 965-973, 2005.

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

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

PICKARD, A. R.; ABÁIGAR, T.; GREEN, D. I.; HOLT, W. V.; CANO, M. Hormonal characterization of the reproductive cycle and pregnancy in the female Mohor gazelle (*Gazella dama mhor*). **Reproduction**, Cambridge, v. 122, p. 571-580, 2001.

PINDER, L. Comportamento social e reprodutivo dos veados campeiro e catingueiro. In: **CONGRESSO DE ETOLOGIA**, 10., 1992, Jaboticabal. Proceedings...p.167-173.

PINDER, L. Marsh deer *Blastocerus dichotomus* population estimate in the Paraná River, Brazil. **Biological Conservation**, Essex, v. 75, p. 87-91, 1996.

PINDER, L.; SEAL, U. S. **Population and Habitat Viability Assessment Report for Marsh deer *Blastocerus dichotomus* (PHVA)**. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN, USA. 1-172, 1995.

PIOVEZAN, U.; JACOB, A. A.; ANDRIOLO, A.; PARANHOS da COSTA, M.J.R.; DUARTE, J.M.B. 2001. Estudo preliminar dos efeitos da inundação provocada pela UHE Sérgio Motta (Porto Primavera) na sobrevivência e na definição de áreas de moradia do Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) nas proximidades da foz do rio do Peixe, Estado de São Paulo, Brasil. In: Duarte JMB (2001) **O cervo-do-pantanal de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa**. Cd-Rom, FUNEP, Jaboticabal.

PLOTKA, E. D., SEAL, U. S., VERME, L. J. and J. J. OZOGA. Reproductive steroids in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*). II. Progesterone and estrogens levels in peripheral plasma during pregnancy. **Biology of Reproduction**, Columbus, v. 17, p. 78-83, 1977.

PLOTKA, E. D.; SEAL, U. S.; VERME, L. J.; OZOGA, J. J. Reproductive steroids in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*) - IV Origin of progesterone during pregnancy. **Biology of Reproduction**, Columbus, v. 26, p. 258-262, 1982.

PUTMAN, R. Life history and population dynamics. In: PUTMAN, R. (Ed.). **The natural history of deer**. London: Christopher Helm, 1988. p. 87-116.

REIMERS, T. J.; ULLMAN, M. B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. **Biology of Reproduction**. Columbus, v. 33, p. 1227-1236, 1985.

ROBBINS, C. T. **Wildlife feeding and nutrition**. New York: Academic Press, 1983. 343p.

ROPSTAD, E.; VIEBERG, V.; SÄKKINEN, H.; DAHL, E.; KINDAHL, H.; HOLAND, O.; BECKERS, J. F.; ELORANTA, E. Endocrine of pregnancy and early pregnancy detection by reproductive hormones in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 1775-1788, 2005.

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

SCHIRAR, A.; MEUSNIER, C.; PALY, J.; LEVASSEUR, M. C.; MARTINET, J. Resumption of ovarian activity in post-partum ewes: role of the uterus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 19, p. 79-89, 1989.

SCHOENECKER, K. A.; LYDA, R. O.; KIRKPATRICK, J. Comparison of three fecal metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis Canadensis*). **Journal of Wildlife Diseases**, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 273-281, 2004.

SCHWARZENBERGER, F.; DREBEN, W. Faecal progesterone metabolites for monitoring ovarian function in marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). In: **INTERNATIONAL DEER BIOLOGY CONGRESS**, 4., 1998, Kaposvár. Proceedings...p. 153-155.

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

SEMPÉRÉ, A. Plasma progesterone levels in the roe deer *Capreolus capreolus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 50, p. 365-366, 1977.

SEMPÉRÉ, A. J.; RENAUD, G.; BARITEAU, F. Embryonic development measured by ultrasonography and plasma progesterone concentrations in roe deer (*Capreolus capreolus*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 20, p. 155-164, 1989.

SHAW, H. J.; GREEN, D. I.; SAINSBURY, A. W.; HOLT, W. V. Monitoring ovarian function in scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) by measurement of fecal 20- β progesterone metabolites. **Zoo Biology**, New York, v. 14, p. 239-250, 1995.

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

STEVENS, C. E.; HUME, I. D. Digesta transit and retention. In: STEVENS, C. E., HUME, I. D. (Eds). **Comparative physiology of the vertebrate digestive system**. 2 ed., Cambridge: University Press, 1995. p 118-151.

STOOPS, M. A.; ANDERSON, G. A.; LASLEY, B. L.; SHIDELE, S. E. Use of fecal steroid metabolites to estimate the pregnancy rate of a free-ranging herd of tule elk. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 63, n. 2, p. 561-569, 1999.

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

THOMPSON, K. V.; MASHBURN, K. L.; MONFORT, S. L. Characterization of estrous cyclicity in the Sable antelope (*Hippotragus niger*) through fecal progestagen monitoring. **General and Comparative Endocrinology**, Duluth, v. 112, p. 129-137, 1998.

TOMÁS, W. M.; BECCACECI, M. D.; PINDER, L. Cervo-do-pantanal. In: Duarte, J. M. B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 1997. p. 24-40.

TOMÁS, W. M. Comportamento do cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). In: **CONGRESSO DE ETOLOGIA**, 10., 1992, Jaboticabal. Proceedings...p.163-166.

VERME, L. J.; OZAGA, J. J. Sex ratio of white-tailed deer and the estrus cycle. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 45, p. 710-715, 1981.

VERME, L. J. Reproductive patterns of white-tailed deer related to nutritional plane. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 33, p. 881-887, 1969.

VERME, L. J. Reproduction studies on penned white-tailed deer. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 29, p. 74-78, 1965.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; CLARKE, C. M. Assessing stress and population genetics through noninvasive means. In: AGUIRRE, A. A., OSTFELD, R. S., TABOR, G. M., HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Eds.). **Conservation medicine – ecological health in practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 130-144.

WASSER, S. K.; VELLOSO A. L.; RODDEN, M. D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 59, n. 4, p. 889-894, 1995.

WEMMER, C. Deer- Status survey and conservation action plan. **IUCN**, Gland, Switzerland: 1-106, 1998.

WHITE, P. J.; GARROT, R. A.; KIRKPATRICK, J. F.; BERKELEY, E. V. Diagnosing pregnancy in free-ranging elk using fecal steroid metabolites. **Journal of Wildlife Diseases**, Copenhagen, v. 31, n. 4, p. 514-522, 1995.

WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology Supplement**, New York, v. 1, p. 17-20, 1989.

WILDT, D. E.; RALL, W. F.; CRITSER, J. K.; MONFORT, S. L.; SEAL, U. S. Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation. **BioScience**, Washington, v. 47, n. 10, p. 689-698, 1997.

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

WILLARD, S. T.; SASSER, R. G.; JAQUES, J. T.; WHITE, D. R.; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Early pregnancy detection and the hormonal characterization of embryonic-fetal mortality in fallow deer (*Dama dama*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 861-869, 1998.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; MONAGHAN, S.; HAMON, M.; HEAP, R. Function specialization of the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. **Placenta**, London, v. 17, p. 75-86, 1996.

ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Livro de registro genealógico da população cativa de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Jaboticabal: FUNEP, 2008. CD ROM.

CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTINAS FECAIS DURANTE O CICLO ESTRAL, GESTAÇÃO E PERÍODO PÓS-PARTO EM CERVOS-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*) EM CATIVEIRO

RESUMO – Seis fêmeas de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) tiveram o ciclo estral monitorado por 90 dias. O perfil hormonal obtido das amostras fecais colhidas diariamente indicou que a duração média do ciclo estral foi de $21,3 \pm 1,3$ dias (6,4d fase inter-luteal e 14,8d fase luteal; $n=16$ ciclos estrais). As concentrações médias de progestinas fecais para as fases inter-luteal e luteal do ciclo estral foram de $834 \pm 311 \text{ ng g}^{-1}$ e $3979 \pm 1611 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente, e o valor limite entre elas foi 1457 ng g^{-1} . Não houve diferença significativa na concentração de estrógenos fecais ao longo do ciclo estral, e os valores mais elevados da razão estrógenos:progestinas correlacionaram-se com o estro comportamental. As fêmeas tiveram o estro sincronizado com cloprostenol e foram fertilizadas por um macho intacto. Nesta espécie o corpo lúteo mostrou-se pouco responsivo ao cloprostenol até o sexto dia do ciclo estral, período anteriormente observado como referente à fase inter-luteal. Metade das fêmeas tornou-se gestante após o tratamento com cloprostenol e outras duas fêmeas foram fertilizadas em ciclos estrais naturais. Das cinco fêmeas que se tornaram gestantes, quatro levaram a gestação a termo em um período médio de 253 ± 4 dias. Durante as 11 primeiras semanas de gestação as concentrações de progestinas fecais ficaram praticamente constantes, aumentando significativamente após este período, o que possibilitou que o diagnóstico presuntivo de gestação fosse possível ($>15250 \text{ ng g}^{-1}$). No período de 60 dias pós-parto em que os animais foram analisados, 75% (3/4) deles apresentaram estro e retomaram a atividade ovariana.

Palavras-chave: *Blastocerus dichotomus*, cervo-do-pantanal, ciclo estral, gestação, hormônio fecal, pós-parto

Introdução

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) é o maior cervídeo neotropical e possui grande especificidade por ambientes úmidos (DUARTE, 1996; PINDER, 1996; TOMAS et al., 1997). Sua distribuição geográfica original foi drasticamente reduzida devido à expansão da atividade humana, sendo que aproximadamente 65% das áreas ocupadas pela espécie foram perdidas nas últimas quatro décadas (WEBER e GONZALEZ, 2003). Atualmente ela encontra-se ameaçada de extinção ou extinta em algumas regiões específicas e em um contexto geral é classificada como vulnerável (WEMMER, 1998; IUCN, 2001).

Os conhecimentos relacionados a essa espécie são escassos, e as lacunas existentes, principalmente no que se refere à sua reprodução, tornam-na mais susceptível em casos de catástrofes ou de uma ameaça eminente, nas quais medidas de conservação mais intensivas devam ser adotadas. Em 1998 foi criado o programa de conservação desta espécie em cativeiro, visando manter um estoque genético apto a ser utilizado para reintrodução. Seu sucesso depende de um manejo que garanta fluxo genético entre as instituições envolvidas no programa e a maximização da diversidade genética da população (DUARTE, 2001; ZANETTI e DUARTE, 2008). Sabe-se que em populações pequenas a perda de variabilidade genética ocorre principalmente devido a deriva genética e endogamia, e que o uso de técnicas de reprodução assistida pode potencializar a reprodução, garantir a formação de bancos genômicos atualizados e facilitar o manejo reprodutivo, evitando assim tais perdas (WILDT et al., 1997; WILDT e WEMMER, 1999).

A utilização de técnicas de reprodução assistida, no entanto, depende do entendimento de alguns aspectos referentes à biologia reprodutiva da espécie, tais como o início da puberdade, sazonalidade reprodutiva, ciclicidade ovariana, função luteal e gestação (DUARTE e GARCIA, 1995). O estabelecimento de métodos eficientes para a manipulação do ciclo estral, como técnicas para sincronização do estro, são fundamentais para a realização de inseminação artificial e transferência de embriões (PICKARD et al., 2001), que têm grande potencial para auxiliar os programas

de conservação. No entanto, até o momento o conhecimento sobre a biologia reprodutiva na espécie é escasso e não há descrição de manipulação do ciclo estral em cervos-do-pantanal.

O estabelecimento de métodos confiáveis para acessar os eventos reprodutivos de uma espécie permite não só a avaliação do uso das biotécnicas reprodutivas, como também o manejo e monitoramento reprodutivo de populações cativas e selvagens. Esse monitoramento pode ser útil para estudos ecológicos e principalmente, para avaliação da saúde reprodutiva de pequenas populações, por auxiliar na identificação de problemas na concepção, perda embrionária e aborto, sendo assim, um importante instrumento para a análise do sucesso reprodutivo, da dinâmica populacional e da saúde da população, fatores esses que podem determinar a continuidade da espécie em longo prazo (WASSER et al., 1995; BORJESSON et al., 1996).

Uma estratégia comumente adotada é a utilização de espécies menos ameaçadas como modelo para tais estudos, no entanto, a extrapolação dos resultados muitas vezes não é válida, principalmente no caso de cervídeos, que apresentam variações genéticas, morfológicas e biológicas bastante marcantes para poderem se adaptar aos diferentes habitats nos quais estão distribuídos (ASHER et al., 1999). Assim, a realização de experimentos em espécies ameaçadas muitas vezes se faz necessária para a produção de dados que efetivamente poderão ser aplicados para a conservação dessas espécies.

Parte do conhecimento relacionado à fisiologia reprodutiva da espécie pode ser conseguido a partir da caracterização do perfil dos hormônios esteróides reprodutivos, que é uma alternativa para o monitoramento das fases do ciclo reprodutivo. No entanto, a utilização de métodos tradicionais, baseados em contenção e colheita periódicas de sangue para aferição dos níveis desses hormônios pode ser inadequada, devido à grande resistência desses animais à manipulação e sensibilidade ao estresse. Quando submetidos a tais condições, pode ocorrer interrupção ou falha na reprodução, prejuízos catabólicos aos animais e aumento das chances de traumas e de desenvolvimento de outras injúrias (STEPHENS et al., 1980; LASLEY et al., 1989; MONFORT et al., 1990; MORROW e MONFORT, 1998; HAMASAKI et al., 2001;

MONFORT, 2002; SCHOENECKER et al., 2004;). Dessa forma, a utilização de métodos não-invasivos para o monitoramento da atividade reprodutiva em espécies selvagens possibilita que estudos sejam desenvolvidos com tais espécies, através da dosagem dos metabólitos dos hormônios esteróides, que são excretados nas fezes, urina e saliva. As facilidades conferidas pela utilização de fezes, tornam-na uma alternativa prática e segura. Sendo assim, os objetivos desse estudo foram (1) validar a dosagem de hormônios esteróides reprodutivos e seus metabólitos fecais para o monitoramento reprodutivo na espécie, (2) caracterizar alguns parâmetros relacionados à fisiologia reprodutiva de fêmeas de cervos-do-pantanal; (3) fornecer métodos adequados para a diferenciação das fases do ciclo reprodutivo; (4) avaliar o efeito da administração de cloprostenol (análogo sintético da prostaglandina $F_{2\alpha}$) nesta espécie, buscando uma maior compreensão sobre sua fisiologia e sobre a dinâmica do corpo lúteo.

Material e métodos

Animais

Seis fêmeas e um macho de cervo-do-pantanal fizeram parte do experimento (Tabela 1). Todos os animais eram oriundos da população afetada pela Usina Hidrelétrica de Porto Primavera no Rio Paraná, entre os Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. O grupo experimental foi mantido nas instalações do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal – São Paulo – Brasil. No início do estudo, as fêmeas foram isoladas do macho por seis meses e houve três meses destinados ao condicionamento dos animais ao manejo (que será descrito a seguir), o que garantiu que nenhuma fêmea estivesse gestante durante o monitoramento do ciclo estral. A dieta e o manejo alimentar foram padronizados, com o alimento oferecido na baia às 17:00 horas. Este foi composto por aproximadamente 1 kg de concentrado (ração eqüina - Omolene® - níveis de garantia: umidade [máx.] - 13%; proteína bruta [mín.] - 15%; extrato etéreo

[mín.] - 6%; matéria fibrosa [máx.] - 10%; matéria mineral [máx.] - 10%; cálcio [máx.] - 1%; fósforo [mín.] - 0,45% e energia disponível [mín.] - 3200kcal/kg), 2 kg de volumoso (soja ou soja-perene) e água *ad libitum*.

Tabela 1 - Dados dos animais que constituíram o grupo experimental.

ANIMAL	IDADE (ANOS)	PESO (Kg)	PROCEDÊNCIA	HISTÓRICO REPRODUTIVO	COMPORTAMENTO
F36	8 (~03/1998)	74,9	NATUREZA ^b	PLURÍPARA	REATIVA ^c
F105	8 (~05/1998)	81,2	NATUREZA	PLURÍPARA	REATIVA
F261	6 (16/05/2000)	89,3	CATIVEIRO	PLURÍPARA	REATIVA
F262 ^a	5 (15/03/2001)	87,0	CATIVEIRO	PLURÍPARA	POUCO REATIVA ^d
F269	3 (03/03/2003)	63,1	CATIVEIRO	NULÍPARA	MUITO REATIVA ^e
F270	3 (15/10/2003)	62,5	CATIVEIRO	NULÍPARA	POUCO REATIVA
M52	12 (~12/1995)	~110	NATUREZA	-	REATIVO

^aFêmea lactante; ^bCapturados na bacia do Rio Paraná; ^cNão permitiam o toque (exceto quando em estro), mas toleravam bem o manejo; ^dPermitiam o toque; ^eNão permitia o toque e tolerava o manejo com restrições.

Monitoramento do ciclo estral

Durante três meses as fêmeas foram submetidas a um manejo misto que consistia em serem transferidas diariamente - entre 7:00 e 9:00 horas - das baias individuais para o piquete, sendo pesadas antes da soltura. As baias individuais mediam 4x4 metros e o piquete 30x50 metros, e nesse as fêmeas permaneciam juntas. À tarde - entre 17:00 e 18:00 horas - elas eram reconduzidas às baias, onde o alimento era oferecido. Nestes dois períodos de manejo as fêmeas eram observadas para identificação de sintomas de estro. Estes se caracterizavam pela fêmea permitir a aproximação (mesmo quando esta era reativa), apresentar reflexo de parada à pressão exercida no dorso pelo examinador, secreção vulvar mucóide abundante (sem observação de descargas vaginais) e hiperemia vulvar (Figura 1). A ingestão do alimento concentrado foi monitorada neste período.



Figura 1 - Aspecto da vulva durante o estro. Presença de secreção mucóide abundante e hiperemia da mucosa vaginal.

Manipulação do ciclo estral e fertilização das fêmeas

Buscando um entendimento maior a respeito do ciclo estral na espécie, as fêmeas foram submetidas a dois tratamentos de sincronização do ciclo estral (n=3 animais por tratamento) constituídos por duas aplicações de análogo sintético da prostaglandina $F_{2\alpha}$, o cloprostenol sódico (2ml – 530ug IM – Ciosin® – Shering Plough Coopers®), com intervalos variáveis. No primeiro tratamento, o intervalo entre as aplicações foi de 12 dias e no segundo, a aplicação foi feita com 6 dias de intervalo. As fêmeas foram examinadas quanto ao estro duas vezes ao dia (às 8:00 e às 17:00 horas), e o estro foi detectado por um macho intacto após a segunda administração do fármaco. Depois da cópula (Figura 2), a fêmea continuou sendo posta em contato com o macho no piquete até que deixasse de estar sexualmente receptiva. As fêmeas que não apresentaram estro após o tratamento receberam uma dose adicional de cloprostenol (2ml-530µg IM) aproximadamente 15 dias depois da primeira administração, e o mesmo manejo realizado anteriormente foi adotado, com a detecção de estro e cópula sendo realizadas pelo macho. O dia do ciclo estral em que cada fêmea se encontrava durante o tratamento foi considerado para a análise.

Após o tratamento de sincronização, as fêmeas que retornaram ao estro foram colocadas novamente com o macho intacto e tiveram pelo menos duas cópulas observadas.



Figura 2 - Cópula em cervos-do-pantanal subsequente ao tratamento de sincronização do estro (F262).

Monitoramento da gestação e do período pós-parto

As fêmeas foram mantidas no piquete durante a gestação, e no dia anterior a colheita de fezes elas eram presas nas baias individuais para o controle da massa corpórea, da ingestão alimentar (tanto do alimento concentrado quanto do volumoso) e para facilitar a colheita das amostras fecais. Aproximadamente quinze dias antes do parto as fêmeas foram mantidas somente nas baias, para ter um controle maior sobre os partos e facilitar o manejo dos filhotes.

Após o parto, as fêmeas foram mantidas em baias individuais e foram inspecionadas quanto ao estro duas vezes ao dia (8:00h e 18:00h).

Colheita e processamento das amostras fecais

As amostras fecais frescas foram colhidas diariamente pela manhã - entre 8:00 e 10:00 horas - durante o monitoramento e manipulação do ciclo estral. Durante a

gestação, a frequência de colheita foi de duas amostras semanais (terça-feira e sexta-feira), que se iniciaram imediatamente após a cópula e estenderam-se até o parto. No período pós-parto as amostras foram colhidas em dias alternados por 60 dias. Após a colheita, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas com nome, número do animal e data da colheita e congeladas a -20 °C até as análises.

Para a extração dos metabólitos (progestinas e estrógenos) das amostras fecais, utilizou-se o método descrito por GRAHAM et al. (2001). Sucintamente, a 0,5g da amostra liofilizada e triturada foram adicionados 5 ml de metanol 80%. A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos, por 12 horas em homogeneizador horizontal e novamente em vortex por 15 segundos. Após centrifugação a 1500rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi separado e constituiu o extrato final.

Dosagens hormonais

Os extratos fecais tiveram as concentrações de progestinas e estrógenos mensuradas por EIA, e as dosagens foram feitas no Laboratório de Farmacologia Animal da FCAV/ UNESP Jaboticabal. Foram utilizados os anticorpos CL425 e R4972 (Quidel Corporation – San Diego – USA), respectivamente para progestinas e estrógenos. A reatividade cruzada do anticorpo CL425 foi descrita por GRAHAM et al. (2001) como: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona) 100,0%; 4-pregnen-3 α -ol-20-ona 188,0%; 4-pregnen-3 β -ol-20-ona 172,0%; 4-pregnen-11 α -ol-3,20-diona 147,0%; 5 α -pregnan-3 β -ol-20-ona 94,0%; 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona 64,0%; 5 α -pregnan-3,20-diona 55,0%; 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona 12,5%; 5 β -pregnan-3,20-diona 8,0%; 4-pregnen-11 β -ol-3,20-diona 2,7%; 5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona 2,5%; 5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol (pregnanediol) <0,1%; outros metabólitos <0,1%. A reatividade do anticorpo R4972 foi descrita como sendo: estradiol-17 β 100%, estrona 3,3%; progesterona 0,8%; testosterona 1,0%; androstenediona 1,0%; outros esteróides <1,0% (C. MUNRO, comunicação pessoal). Estes anticorpos foram escolhidos por apresentarem alta reatividade cruzada com os metabólitos excretados nas fezes de *Blastocerus dichotomus*- 5 α - e 5 β - pregnanes e estradiol-17 β (POLEGATO e DUARTE, 2004). Todos os extratos fecais foram diluídos em tampão de diluição, na diluição de 1:500

(durante o ciclo estral e início da gestação), 1:1500 (no meio da gestação) ou 1:2500 (no fim da gestação) para progestinas e 1:32 (durante o ciclo estral) para estradiol-17 β e dosados em duplicata. A validação das dosagens hormonais foi feita como descrito por BROWN et al. (2004), (1) pela significativa recuperação dos hormônios exógenos adicionados às amostras fecais devidamente diluídas ($y=1,149x-2,2556/ R^2=0,99$ e $y=1,088x+1,6021/ R^2=0,99$ para progestinas e estrógenos, respectivamente), o que determinou que nenhuma substância presente na amostra diluída (extrato fecal e tampão de diluição) interferiu na ligação do hormônio com o anticorpo do ensaio; (2) pela observação de uma disposição paralela entre a curva-padrão e a formada pelo pool de extratos fecais preparados por diluição seriada em tampão de diluição ($R^2=0,9914$ e $R^2=0,9744$, respectivamente para progestinas e estrógenos fecais), o que determinou que ambos os hormônios, o da curva-padrão e o da amostra, se ligaram de forma similar ao anticorpo do ensaio e conseqüentemente, que os valores da curva-padrão puderam ser utilizados como referência para os das amostras fecais; e (3) pela relevância fisiológica dos resultados obtidos quando as diferentes fases do ciclo reprodutivo foram comparadas. Os coeficientes de variação intra- e interensaio foram avaliados para dois controles internos (um com alta e o outro com baixa concentração hormonal). Os coeficientes de variação intraensaio foram <10% para todos os hormônios e controles avaliados. Os coeficientes de variação interensaio foram de 10,1% (~35% de ligação e n=57 placas) e 12,1% (~75% de ligação e n=57 placas) para os progestinas e 7,4% (~20% de ligação e n=29 placas) e 13,9% (~50% de ligação e n=29 placas) para os estrógenos. A sensibilidade do ensaio foi de 0,78ng g⁻¹ (93,7% de ligação) e 1,95ng g⁻¹ (89,5% de ligação) para progestinas e estrógenos, respectivamente. As concentrações de progestinas e estrógenos estão expressas em nanograma por grama de fezes secas (ng g⁻¹ fezes).

Análise dos dados

Para a análise dos dados do ciclo estral, os três menores valores de progestinas de cada ciclo estral foram considerados basais e a partir deles calculou-se a média e o desvio padrão (DP). Com base em modificações feitas a partir do modelo proposto por

THOMPSON et al. (1998), valores acima do limite (média+2DP) foram considerados indicativos de fase luteal e valores abaixo deste foram considerados indicativos de fase inter-luteal. Para o cálculo da duração do ciclo estral, o primeiro dia em que o nível de progestinas fecais atingiu valor indicativo de fase inter-luteal foi considerado o primeiro dia do ciclo (D1).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. Comparações entre as fases do ciclo estral (fase inter-luteal e luteal), os diferentes meses da gestação e o anestro foram realizados através de análise de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste Scott-Knott. As transformações sugeridas para as variáveis (concentração de progestinas fecais, massa corpórea da fêmea e ingestão de alimentos) foram feitas quando necessário. A correlação entre as variáveis foi feita utilizando-se o teste de correlação de Pearson. Todas as análises foram feitas com o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e o nível de significância para todos os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Foram avaliados dezesseis ciclos estrais completos, cuja duração média, aferida através dos dados comportamentais e dos perfis hormonais, foi de $21,3 \pm 1,3$ dias (variando entre 19-23 dias). A fase inter-luteal do ciclo teve duração média de $6,4 \pm 1,2$ dias, enquanto a duração da fase luteal foi de $14,8 \pm 1,3$ dias (Figura 3). Nesta média estão inclusos dados de todas as fêmeas, com exceção da F269 que permaneceu em anestro a partir do 12º dia de monitoramento. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na duração do ciclo estral entre as fêmeas e nem entre diferentes ciclos da mesma fêmea. Duas das fêmeas estudadas (F105 e F270) exibiram estro comportamental regularmente e outras três (F36, F261 e F262) de forma esporádica, e em todos os casos, o comportamento reprodutivo foi correlacionado com as dosagens hormonais (Figura 4). Dos 20 estros observados pelo perfil dos progestinas fecais, 14 foram também detectados através do comportamento (70%). A eficiência de detecção

do estro comportamental aumentou nos períodos finais do monitoramento, concomitantemente com o aumento no número de dias em que os animais foram manejados. A duração do estro comportamental variou de 1-2 dias (n=14 estros).

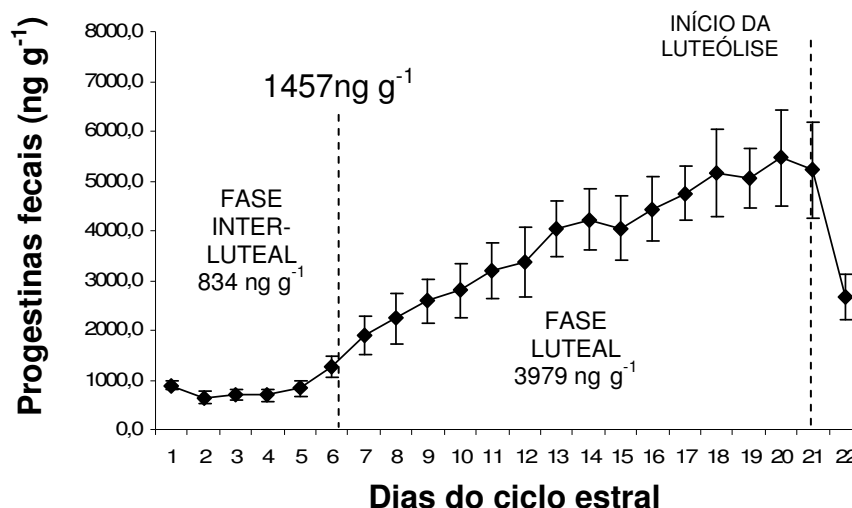


Figura 3 – Concentração de progestinas fecais (média $\pm$ EPM; n=16) durante o ciclo estral em cinco fêmeas de cervo-do-pantanal.

A massa corpórea das fêmeas e a ingestão alimentar não se alteraram significativamente ao longo do ciclo estral ($p > 0,05$). No entanto, estas duas variáveis correlacionaram-se positivamente ($r = 0,37$; $p < 0,001$).

Através do perfil individual das progestinas fecais, foi possível determinar que as concentrações médias observadas para as fases inter-luteal e luteal do ciclo estral foram 834 ± 311 ng g⁻¹ (393-1431 ng g⁻¹) e 3979 ± 1611 ng g⁻¹ (1498-11364 ng g⁻¹), respectivamente. Com base nos critérios anteriormente definidos, a concentração de 1457 ng g⁻¹ constituiu-se o valor limite entre estas duas fases. As concentrações fecais de estradiol-17 β (E₂) não diferiram ao longo do ciclo estral ($p > 0,05$), no entanto, a razão entre as concentrações deste hormônio (E₂) e as de progestinas (P) – E₂/P – diferiu ($p < 0,05$). Houve uma correlação negativa entre a concentração de progestinas e a razão E₂/P ($r = -0,39$; $p < 0,001$). Os maiores valores observados para a razão E₂/P coincidiram com o comportamento de estro ou ocorreram um dia depois do estro comportamental (Figura 4).

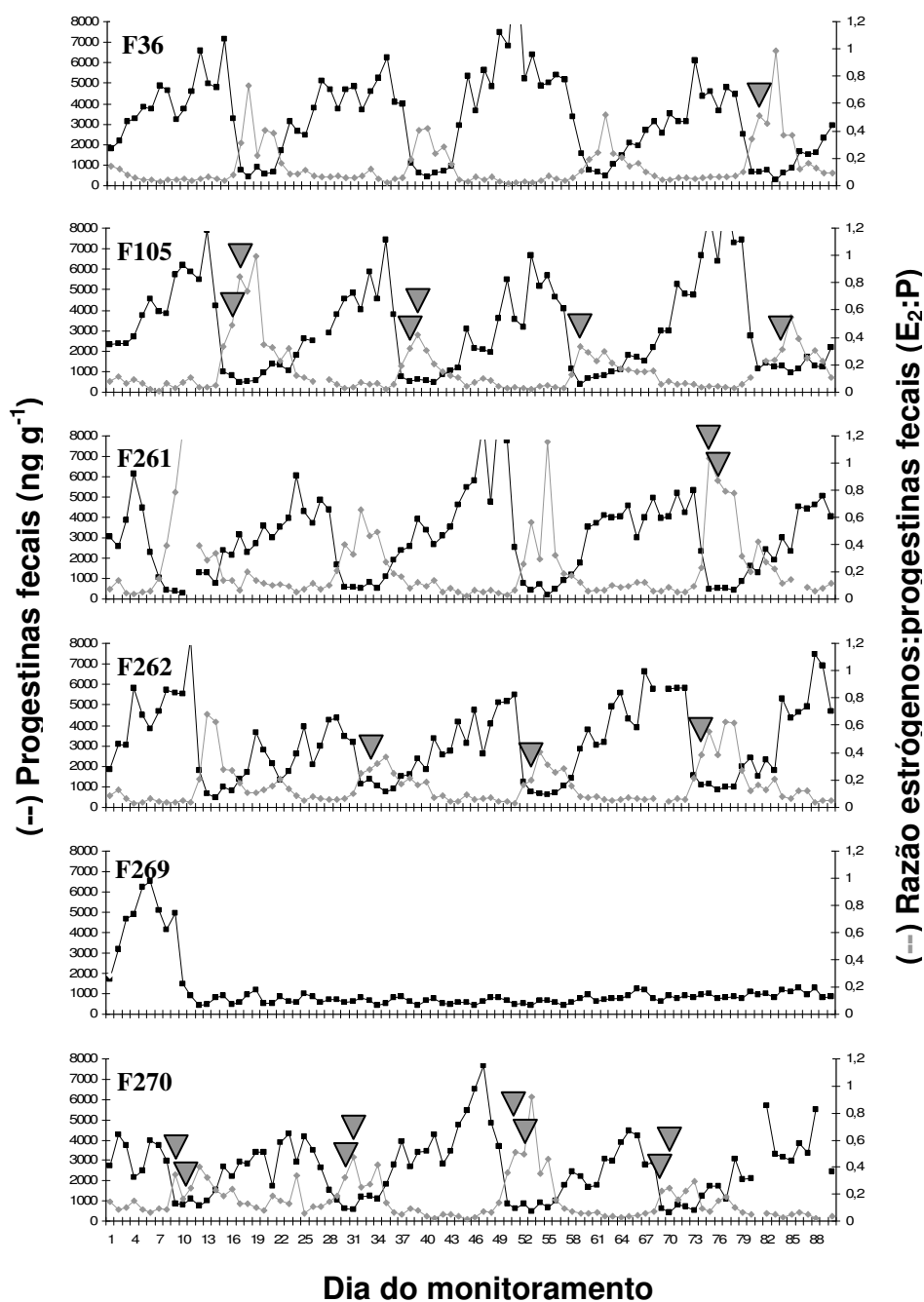


Figura 4 – Monitoramento do ciclo estral através da mensuração das progestinas (--) e da razão estrógenos:progesterinas fecais (--) em seis fêmeas *Blastocerus dichotomus*. As setas indicam os dias de detecção do estro comportamental.

Cloprostenol sódico se mostrou adequado para promover luteólise em fêmeas cíclicas de cervo-do-pantanal (Figura 5). Quando utilizado até o 6º dia do ciclo estral o fármaco não desencadeou resposta luteolítica efetiva. Todas as fêmeas que responderam ao fármaco exibiram estro comportamental, que teve início em média 58 horas após sua administração (variação de 42-64 horas). A F269, que estava em anestro, não respondeu ao tratamento.

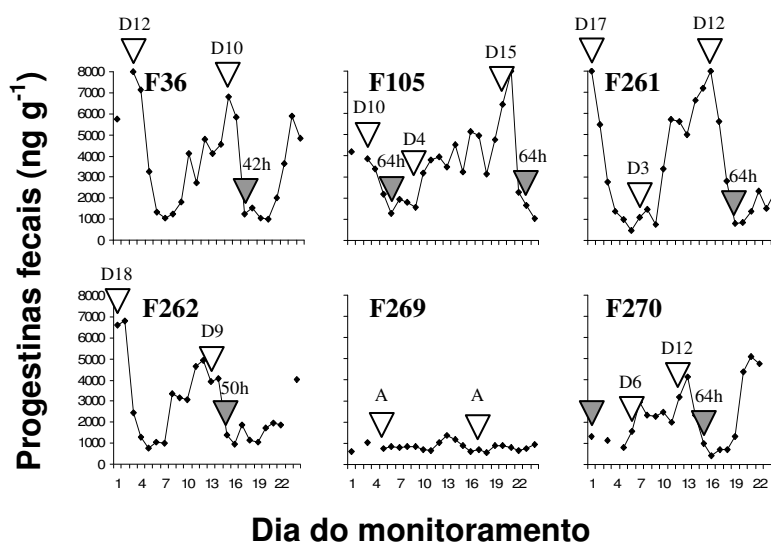


Figura 5 – Sincronização do estro em cervos-do-pantanal com cloprostenol (setas brancas; dia do ciclo estral em que cada fêmea se encontrava no momento da administração do fármaco) e dias de detecção do estro comportamental (setas cinzas; tempo, em horas, entre a administração do fármaco e a detecção do estro comportamental).

Três fêmeas tornaram-se gestantes após o tratamento com cloprostenol (F105, F262 e F270) e outras duas foram fertilizadas em estros naturais (F36 e F261). De acordo com os dados endócrinos, constatou-se que a F105 foi fertilizada (após a cópula houve o prolongamento da atividade luteínica por aproximadamente 60 dias, o que não ocorreu anteriormente- durante o monitoramento do ciclo estral não houve nenhum caso de persistência de CL), mas abortou ainda no início da gestação (Figura 6). Das quatro fêmeas que levaram a gestação a termo, duas adoeceram no seu terço final

(F261 e F270), o que causou um aumento de aproximadamente uma semana no período gestacional (Tabela 2). A duração média da gestação foi de 253 ± 4 dias.

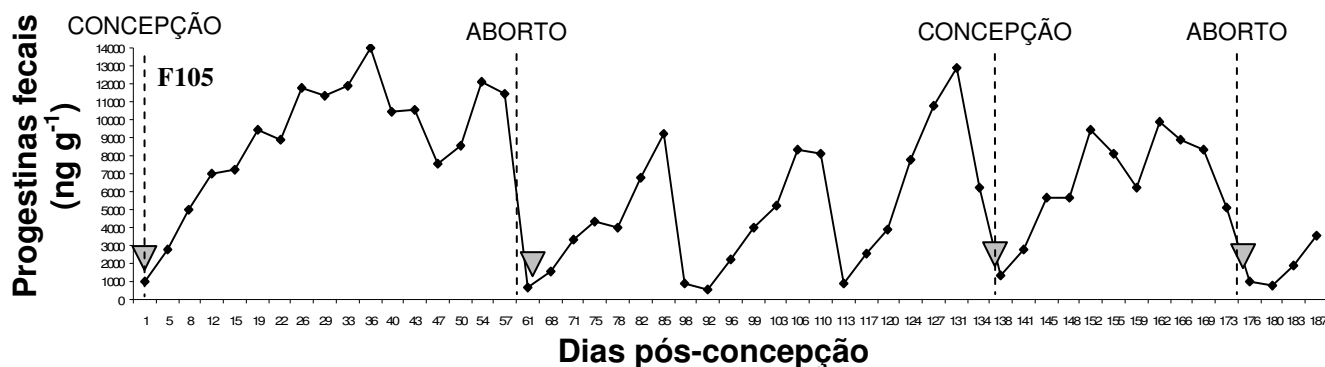


Figura 6 – Prováveis gestações e abortos sofridos pela F105. As setas indicam os dias de estro comportamental.

Tabela 2 – Características referentes à fertilização, à gestação e aos filhotes de fêmeas de cervo-do-pantanal.

Animal	Fertilização		Gestação	Filhote	
	Estro manipulado	Estro natural	Duração (dias)	Sexo	Massa corpórea (Kg)
F36	N	S	249	F	4,1
F105	S	-	Aborto	-	-
F261*	N	S	257	M	4,5
F262	S	-	250	F	4,9
F269	N	-	-	-	-
F270*	S	-	257	M	2,4

* Animais que adoeceram no terço final da gestação

S=ocorrência do evento; N=ausência do evento; F=fêmea e M=macho.

Pela caracterização endócrina da gestação foi possível observar que as concentrações de progesterina fecal permaneceram compatíveis com valores referentes à fase luteal do ciclo estral aproximadamente até a 11^a semana de gestação e depois começaram a aumentar progressivamente (Figura 7). No 4^o mês de gestação

a concentração de progestinas praticamente dobrou com relação aos meses anteriores e no 8º mês chegou a um máximo, sendo em média seis vezes superior ao observado para as suas fases iniciais.

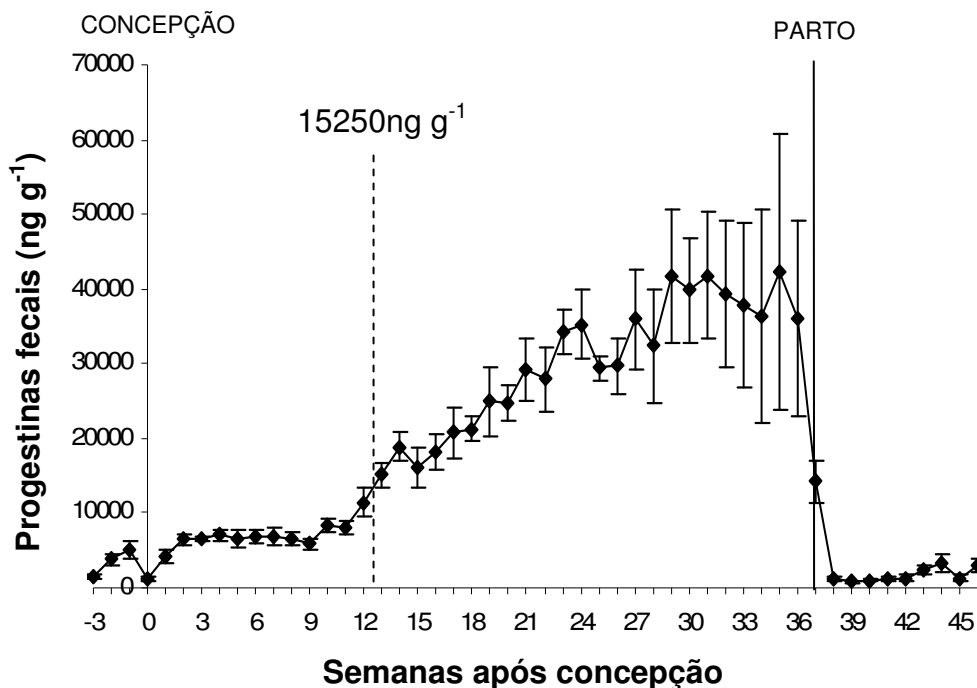


Figura 7 – Concentração de progestinas fecais (média $\pm$ EPM; n=4 fêmeas) antes da concepção, durante a gestação e após o parto em cervos-do-pantanal.

Os dois animais que adoeceram foram excluídos da análise da ingestão de alimento e dos dois últimos meses da evolução da massa corpórea. Este procedimento foi adotado porque os animais apresentaram anorexia ou hiporexia por um período prolongado, além de uma acentuada diminuição na massa corpórea em consequência da doença. Com relação à ingestão de alimentos, não houve diferença entre fêmeas gestantes e não gestantes. No entanto, a ingestão de volumoso tendeu a diminuir conforme a gestação se estendeu. Houve uma correlação negativa entre a massa corpórea das fêmeas e a ingestão de alimento volumoso ($r=-0,56$; $p<0,0001$) (Figura 8). A porcentagem de acréscimo na massa corporal das fêmeas diferiu entre os meses de gestação ($p<0,05$) e correlacionou-se fortemente ($r=0,81$, $p<0,0001$) com a

concentração de progestinas fecais durante a gestação (Figura 9). Essa variável pôde ser utilizada como um “marcador” fenotípico de gestação, e aumentos maiores do que 8,6% na massa corpórea da fêmea, quando comparados ao seu estado anterior não gestante, foram indicativos de gestação, e ocorreram a partir do 5º mês de gestação.

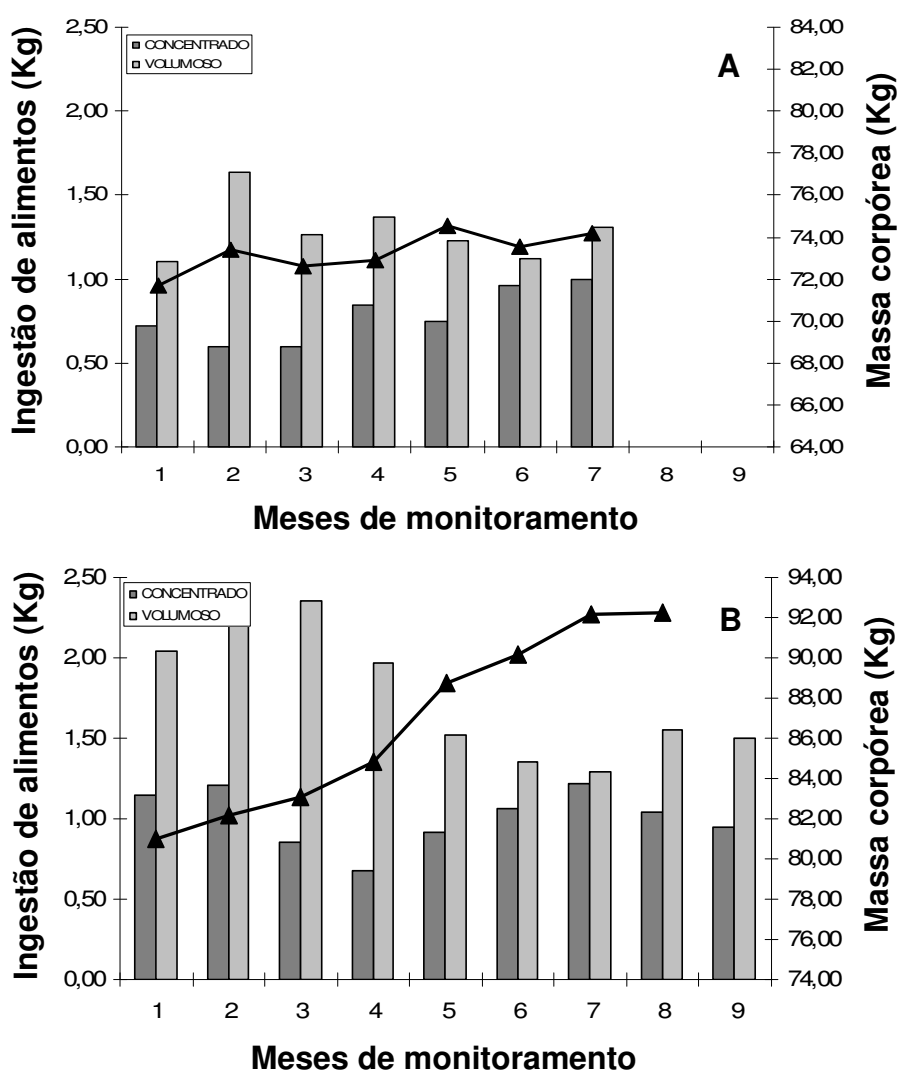


Figura 8 – Comparação entre fêmeas não gestantes (**A**) e gestantes (**B**) de cervo-do-pantanal no que diz respeito à média da ingestão de alimentos e da massa corpórea. Correlação negativa entre a massa corpórea da fêmea e a ingestão de alimento volumoso ao longo da gestação ($r=-0,56$; $p<0,0001$).

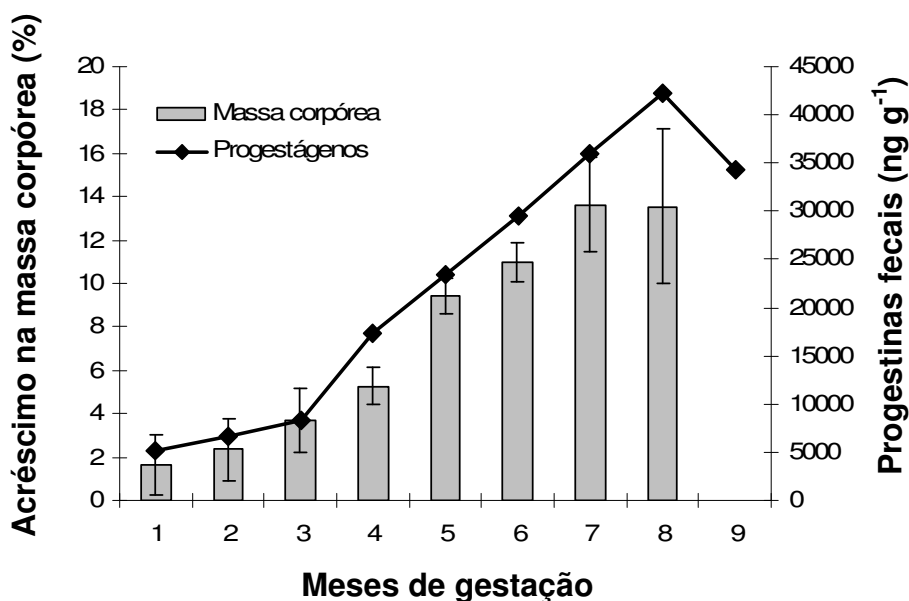


Figura 9 – Correlação entre a porcentagem de acréscimo na massa corpórea (média $\pm$ EPM) e a concentração de progestinas fecais (média) durante a gestação em fêmeas de cervo-do-pantanal ($r=0,81$; $p<0,0001$).

Pequenos fragmentos placentários foram encontrados na baia de apenas um animal após o parto, o que sugere que placentofagia seja um comportamento padrão para esta espécie. Os níveis fecais de progestinas começaram a diminuir no final da gestação (variando de uma semana a um mês antes do parto) e atingiram níveis basais somente depois do parto (4-8 dias). No período de análise depois do parto, três dos quatro animais estudados voltaram a apresentar um padrão cíclico na excreção de progestinas fecais o que demonstra a retomada da atividade ovariana e confirma a existência de estro pós-parto para a espécie (F262 e F270 - Figura 10). Uma característica comum destes animais foi a observação de um ciclo mais curto e com menor concentração de progestinas fecais antecedendo ciclos normais. As principais características dos períodos peri-parto e pós-parto foram altamente influenciadas pelo fator indivíduo para todas as variáveis analisadas (retorno dos progestinas fecais aos níveis basais e tempo para retomada da atividade reprodutiva).

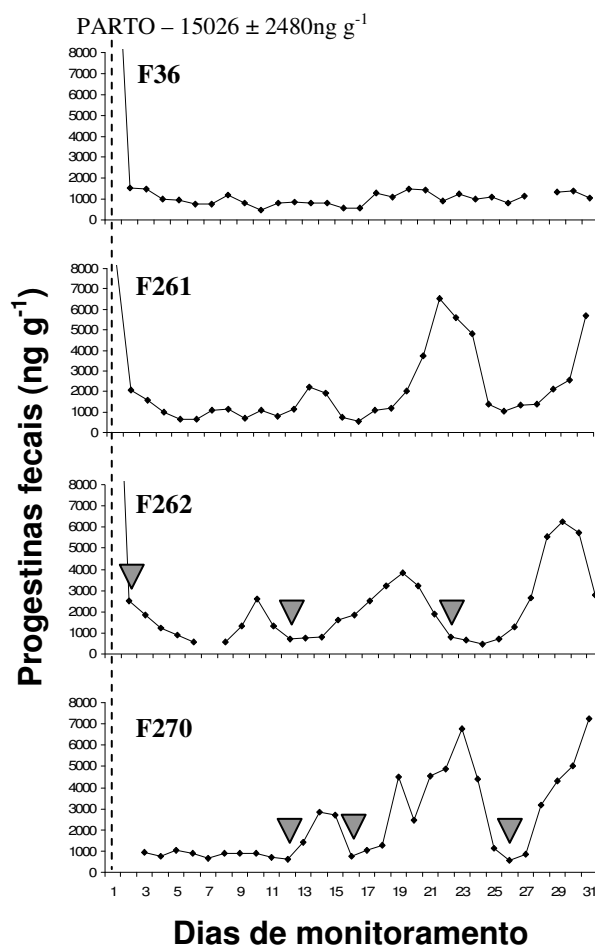


Figura 10 – Perfil de excreção dos progestinas fecais no período pós-parto em quatro fêmeas de cervo-do-pantanal. As setas indicam estro comportamental.

Houve diferença significativa ($p < 0,0001$) na concentração de progestinas fecais entre as fases do ciclo reprodutivo (Figura 11). Com base nestes dados foi possível diferenciar animais gestantes de não gestantes a partir 4º mês de gestação, no entanto, foi impossível diferenciar animais em fase inter-luteal do ciclo estral e em anestro e animais na fase luteal do ciclo e no 1º, 2º e 3º meses de gestação. Assim, o diagnóstico de gestação feito a partir das dosagens hormonais pode ser direcionado a partir do 4º mês de gestação para esta espécie. A concentração de progestinas fecais $\geq 15250 \text{ ng g}^{-1}$ foi indicativa de gestação.

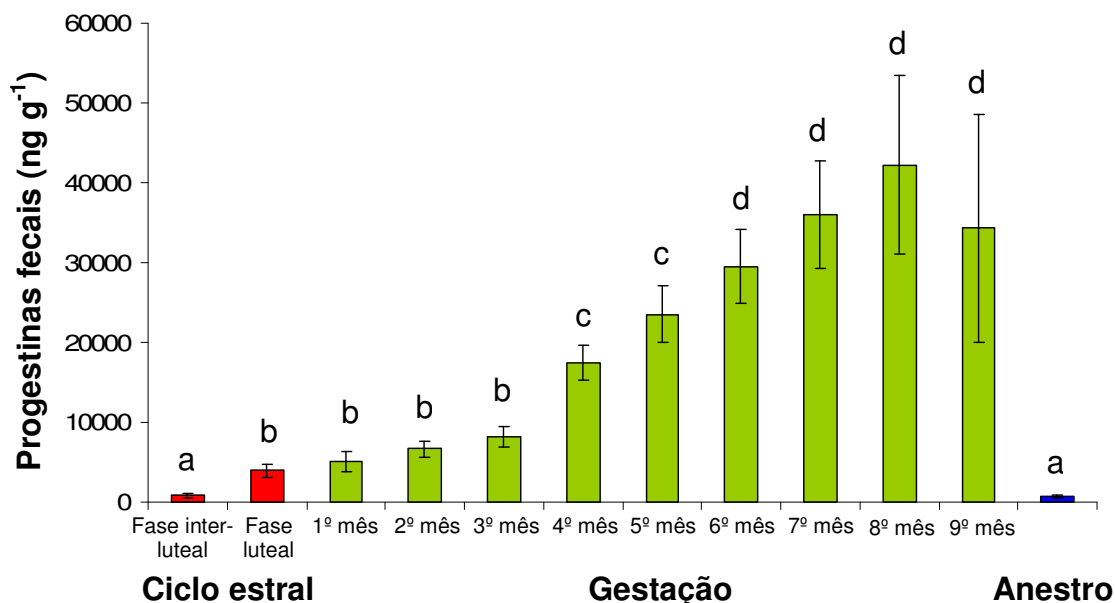


Figura 11 – Concentração de progestinas fecais (média $\pm$ EPM) nas diferentes fases do ciclo reprodutivo de cervos-do-pantanal. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,0001$).

Discussão

O uso de análises hormonais realizadas a partir das fezes mostrou-se uma alternativa eficiente para o monitoramento dos eventos reprodutivos em cervos-do-pantanal. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que esta técnica tem potencial para esclarecer o status reprodutivo na espécie, por possibilitar a caracterização e diferenciação das fases do ciclo reprodutivo. Devido ao seu caráter não-invasivo, pode ser aplicada tanto para o monitoramento de outras populações cativas, quanto para o de populações que estejam inseridas em ambientes naturais, mesmo se tratando de uma espécie bastante sensível ao estresse.

A duração média do ciclo estral obtida neste estudo em cervos-do-pantanal, de 21,3 dias (19-25 dias), mostrou-se ligeiramente inferior à observada anteriormente para a espécie (24 dias – DUARTE e GARCIA, 1997; SCHWARZENBERGER e DREBEN,

1998), e próxima à de outras espécies de cervídeos com tamanho corpóreo similar (17-21 dias em *Axix axix*- CHAPPLE et al., 1993; 13-22 dias em *Cervus unicolor* e 15-24 dias em *Cervus elaphus* – ASHER et al., 1997; 14-23 dias em *Cervus eldi thamin* – MONFORT et al., 1990; 17-21 dias em *Cervus nippon taiouanus* – LIU et al., 2002). Não houve diferença na duração do ciclo estral entre ciclos de uma mesma fêmea ou entre fêmeas de cervo-do-pantanal. Sabe-se que alguns fatores ambientais e sociais podem influenciar o comportamento e a fisiologia reprodutiva em ungulados, e um dos fatores mais importantes é a presença do macho. Esse fator pôde tornar a fêmea capaz de ajustar a duração de seu ciclo estral para dominar a atenção do macho e demonstrar sua dominância sobre outras fêmeas do grupo (MORROW et al., 1999; THOMPSON, 1995). Adicionalmente, a presença direta ou indireta do macho foi capaz de adiantar o pico pré-ovulatório de LH em *Cervus eldi thamin*, o que sugere que uma maior concentração de estros no grupo possa melhorar o desempenho reprodutivo dos machos, aumentar a probabilidade de prenhez e reduzir a energia e o tempo gastos esperando a fêmea estar receptiva (HOSACK et al., 1999). Portanto, o fato das fêmeas deste experimento terem sido mantidas isoladas dos machos, pode ter influenciado na exibição de ciclos estrais com duração relativamente constante.

A diferença entre as fases luteal e inter-luteal do ciclo estral foi evidenciada pelo monitoramento das progestinas fecais, no entanto, os resultados desse estudo sugerem que o momento da ovulação só pôde ser indicado indiretamente com a obtenção dos níveis de estrógenos fecais. Não foram observadas diferenças na concentração de estrógenos fecais entre as fases do ciclo estral, mas a razão estrógenos:progestinas fecais pareceu ser importante para a determinação do comportamento de estro. Existe a indicação de que os estrógenos podem induzir fêmeas adultas a expressar os comportamentos de estro ou maternal, e que a progesterona acentua o papel do estrógeno no comportamento sexual (KEVERNE et al., 1983). Assim, a razão estrógenos:progestinas pareceu ser mais efetiva do que a análise isolada dos hormônios esteróides para prever ovulação, como sugerido anteriormente em *Gazella dama mhorr* (PICKARD et al., 2001) e descrito em humanos (LENTON et al., 1989). Nesse aspecto, a aquisição de dados comportamentais, que se correlacionaram

fortemente com o perfil hormonal, assegurou a acurácia do monitoramento feito através dos hormônios esteróides reprodutivos e de seus metabólitos nas fezes e deu suporte aos dados endócrinos obtidos.

A fase inter-luteal do ciclo estral também está relacionada a um período de refratariedade do CL, que foi evidenciado pela resposta fisiológica da fêmea à administração de cloprostenol. O cloprostenol foi adequado para promover luteólise em cervos-do-pantanal, sendo, portanto, um importante composto para ser utilizado na manipulação do ciclo estral dessa espécie. No entanto, esse fármaco tem sua ação diretamente relacionada à presença de um CL funcional (ASHER et al., 1993; WHITLEY e JACKSON, 2004). Assim, o cloprostenol não foi capaz de promover a luteólise em cervo-do-pantanal quando o tratamento foi feito em animais que estavam em anestro, como foi observado para a fêmea F269, ou quando a administração foi feita até o 6º dia do ciclo estral, período no qual o CL está ausente ou hipofuncional. Este resultado é similar ao observado para *Cervus elaphus*, que se mostraram pouco sensíveis à ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ até o 6º dia do ciclo estral (ASHER et al., 1995) e contrastam com o observado para ovinos, nos quais a luteólise consegue ser induzida a partir do 3º dia do ciclo estral (RUBIANES et al., 2003). Esse período de refratariedade do CL coincide com a fase inter-luteal do ciclo estral (que tem duração média de 6,4 dias na espécie), na qual o CL, ainda em formação, secreta pequena quantidade de progesterona e é formado basicamente por células luteais pequenas, que são pouco responsivas à $\text{PGF}_{2\alpha}$ (BERISHA e SCHAMS, 2005).

Os animais apresentaram estro comportamental em média 58 horas após o término do tratamento de sincronização. Todos os animais que responderam ao cloprostenol (exibindo estro comportamental) tiveram ovulação e formação de corpo lúteo, monitorados pelos níveis de progestinas fecais. A possibilidade de monitoramento hormonal durante a manipulação do ciclo estral garante um melhor entendimento dos processos fisiológicos ocorridos e evita dúvidas na interpretação dos dados. Embora estes resultados sejam preliminares e haja a necessidade de mais estudos para a determinação dos efeitos e alterações mais detalhadas que este fármaco pode produzir no ciclo estral, eles já demonstram a aplicabilidade do cloprostenol para a manipulação

do ciclo estral em cervos-do-pantanal. O tempo para início do estro comportamental variou entre 42 e 64 horas e esta variação está relacionada ao estágio folicular presente no momento da indução da luteólise (RUBIANES et al., 2000; BARROS e ERENO, 2004). Se um folículo dominante estiver se desenvolvendo no momento da indução da luteólise, o estro e a ovulação ocorrem em um curto período de tempo, ao contrário do que acontece se o folículo dominante estiver regredindo nesse momento, o que obriga a emergência de uma nova onda de crescimento folicular e a seleção de outro folículo dominante, prolongando o início do estro (MENCHALA et al., 2004). Este período foi similar ao descrito anteriormente para outras espécies de cervídeos como *Mazama gouazoubira* (40-69 horas, ZANETTI e DUARTE, 2006) e *Dama dama* (42-64 horas, JABBOUR et al., 1993).

Após a sincronização com cloprostenol, a taxa de prenhez foi de 50% (3/6), e embora tenha sido baixa, foi superior à observada para *Orix dammah* e *Dama dama* quando utilizado um tratamento similar, seguido por inseminação artificial (37,5% - MORROW et al., 2000; 40,7% - JABBOUR et al., 1993). Nesse caso, no entanto, a diferença na metodologia empregada pode ter influenciado a disparidade nos resultados encontrada entre os estudos. O período médio de gestação de 253 dias observado para a espécie foi inferior ao descrito anteriormente (271 dias; FRÄDRICH, 1985) e é compatível com o de outras espécies uníparas de cervídeos de tamanho corpóreo similar (*Cervus elaphus*: ASHER et al., 2005; *Cervus elaphus nannodes*: STOOPS et al., 1999; *Cervus eldi thamin*: MONFORT et al., 1990; *Cervus nippon*: HAMASAKI et al., 2001; *Dama dama*: WILLARD et al., 1998; *Rangifer tarandus tarandus*: ROPSTAD et al., 2005). Esse período, no entanto, pode se prolongar caso a fêmea sofra uma restrição alimentar severa e em alguns casos pode levar ao nascimento de filhotes com massa corpórea abaixo do normal (VERME, 1965). Devido à correlação que existe entre a mortalidade do filhote e sua massa corpórea ao nascimento, as fêmeas podem espoliar significativamente suas reservas energéticas para tentar assegurar que o filhote nasça com uma massa corpórea adequada (GARCÍA et al., 2006). Essa maleabilidade na resposta fisiológica pôde ser observada para as duas fêmeas que adoeceram no terço final da gestação (F261 e F270), e que

tiveram a gestação estendida de forma compensatória. A F270 mesmo tendo a massa corpórea gravemente reduzida e prolongando o período de gestação, produziu um filhote pequeno (2,4 Kg), que morreu um dia depois do nascimento.

Embora tenha havido algumas modificações nas características da gestação para as duas fêmeas que adoeceram, o padrão de excreção de progestinas fecais foi similar para todos os animais do estudo. Com base nos dados hormonais, o diagnóstico presuntivo de gestação em *Blastocerus dichotomus* pode ser direcionado a partir do segundo trimestre de gestação. Esses resultados são similares aos observados para outras espécies de cervídeos (*Capreolus capreolus*: SEMPÉRÉ, 1977; *Cervus elaphus nelsoni*: WHITE et al., 1995; GARROT et al., 1998; *Cervus elaphus nannodes*: STOOPS et al., 1999; *Cervus eldi thamin*: MONFORT et al., 1990; *Dama dama*: WILLARD et al., 1998) e se devem ao fato de que durante a gestação, a placenta sintetiza progesterona na maioria das espécies de cervídeos. Em *Rangifer tarandus tarandus*, células binucleares características foram encontradas na interface entre o feto e a mãe (FLOOD et al., 2005) e sabe-se que essas células são esteroidogênicas em bovinos, ovinos e caprinos (REIMERS et al., 1985; GOSS e WILLIAMS, 1988; WOODING et al., 1996). A esteroidogênese é evidentemente mais rápida nos tecidos luteais do que na placenta, portanto, no início da gestação, quando a massa placentária é pequena, a importância desta fonte de síntese e secreção de progesterona é limitada. A partir do meio da gestação a massa placentária torna-se muito maior do que a massa lútea e é provável que a placenta seja uma fonte fisiologicamente significativa de síntese de esteróides a partir desse período (FLOOD et al., 2005). Adicionalmente, foi relatado que o feto possui uma importância significativa na secreção de esteróides ovarianos em uma série de espécies. Esta secreção está biologicamente relacionada ao desenvolvimento das glândulas mamárias e à inibição da lactação (MOLLETT et al., 1976) e seria uma estratégia de competição entre o feto e o filhote lactente, com a qual o feto asseguraria quantidades maiores de energia sendo direcionadas para o seu crescimento (FLOOD et al., 2005).

A forte correlação observada entre o aumento percentual da massa corpórea na fêmea gestante e o aumento na concentração de progestinas fecais ao longo da

gestação evidenciou que ambos são desencadeados pelo mesmo fator, o crescimento do feto. Em *Capreolus capreolus*, o desenvolvimento embrionário e o estabelecimento da placenta desencadearam um aumento na concentração sanguínea de progesterona que se correlacionou positivamente com o tamanho do concepto (SEMPÉRÉ et al., 1989). O aumento no tamanho do concepto teve duas conseqüências diretas: o aumento concomitante na massa corpórea da fêmea gestante, que serviu como um “marcador” fenotípico de gestação para a espécie e trouxe uma alternativa direta e prática para ser utilizada em condições de cativeiro; e o aumento no requerimento energético da fêmea, o que aparentemente fez com que essa apresentasse uma maior seletividade do alimento ingerido. A redução, ainda que não significativa, na ingestão de alimento volumoso observada nesse estudo, parece ser uma estratégia adotada pela espécie para garantir a ingestão de alimentos mais energéticos nos períodos finais da gestação. O espaço ocupado pelo útero, que contém o feto em estágio avançado de desenvolvimento, acaba restringindo a distensão do rúmen e limitando o volume de alimento ingerido pela fêmea. Associado a isso, é sabido que a exigência energética da fêmea no final da gestação e início da lactação é maior do que nos demais estágios do ciclo reprodutivo, devido ao rápido crescimento do feto e do filhote nestes períodos (ROBBINS, 1983; BRONSON, 1989).

O estro pós-parto, cuja ocorrência já havia sido descrita anteriormente para a espécie (FRADRICH, 1995), parece estar relacionado à abundância de alimentos e à estabilidade do habitat (ROBBINS, 1983) e foi observado em três dos quatro animais que levaram a gestação a termo. A retomada da atividade ovariana pôde ser caracterizada através do perfil hormonal e apresentou algumas particularidades, como o aparecimento de ciclos mais curtos e com uma menor amplitude na excreção de progestinas fecais que antecederam ciclos estrais normais. Esses ciclos podem estar relacionados à influência luteolítica do útero em involução, que libera $\text{PGF}_{2\alpha}$ de forma crescente e prolongada, e da incompleta restauração na liberação de gonadotrofinas, que provoca crescimento e maturação folicular insuficientes e ovulação de folículos com reduzido número de células na granulosa, assim como descrito anteriormente para ovinos (SCHIRAR et al., 1989). Outra característica do período pós-parto foi a resposta

individualizada na expressão de suas principais variáveis (retorno dos progestinas fecais aos níveis basais e retomada da atividade ovariana). Essas diferenças podem estar relacionadas a novos fatores ambientais, como a presença do filhote e o alto requerimento energético em virtude da lactação, que possuem um impacto significativo na função reprodutiva da fêmea. Sabe-se que as espécies de mamíferos possuem suas estratégias reprodutivas moldadas pelas condições ambientais (BRONSON, 1989) e, quando estas condições não são restritivas, os animais podem expressar com maior flexibilidade suas necessidades individuais.

Conclusões

Considerando os objetivos delineados, a metodologia utilizada e os resultados obtidos pode-se concluir que:

- (1) O uso de ensaio imunoenzimático (EIA) para a dosagem de progestinas fecais mostrou-se um método prático e eficiente para a caracterização e diferenciação das fases do ciclo reprodutivo, e pode auxiliar na conservação *in situ* e *ex situ* da espécie.
- (2) Alguns parâmetros relacionados à fisiologia reprodutiva da espécie foram elucidados, como a duração do ciclo estral e de suas fases luteal e inter-luteal, o período de gestação e a ocorrência de estro pós-parto, bem como o perfil de progestinas fecais foi estabelecido para o ciclo estral, a gestação e o período pós-parto da espécie.
- (3) Esse estudo contribui para um maior entendimento sobre a biologia e a fisiologia reprodutiva na espécie *Blastocerus dichotomus* e disponibiliza métodos úteis para o monitoramento das diferentes fases do ciclo reprodutivo, como a dosagem dos hormônios esteróides e seus metabólitos fecais e o uso da massa corpórea como um “marcador” fenotípico para a espécie.

(4) Cloprostenol sódico foi eficiente em produzir luteólise quando utilizado na presença de um CL funcional. Assim, animais em anestro ou na fase inter-luteal do ciclo estral não responderam à administração do fármaco.

Referências bibliográficas

ASHER, G. W.; FISHER, M. W.; BERG, D. K.; VELDHUIZEN, F. A.; MORROW, C. J. Luteolytic potency of a prostaglandin analog at different stages of the estrous-cycle in red deer (*Cervus elaphus*) hinds. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.103, n. 2, p. 307-314, 1995.

ASHER, G. W.; FISHER, M. W.; FENNESSY, P. F.; MACKINTOSH, C. G.; JABBOUR, H. N.; MORROW, C. J. Oestrus Synchronization, Semen Collection and Artificial Insemination of Farmed Red Deer (*Cervus elaphus*) and Fallow Deer (*Dama dama*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 33, p. 241-265, 1993.

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*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 111, p. 91-99, 1997.

ASHER, G. W.; MONFORT, S. L.; WEMMER, C. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v. 54, p. 143-156, 1999.

ASHER, G. W.; SCOTT, I. C.; O'NEILL, K. T.; LITTLEJOHN, R. P. Influence of the level of nutrition during late pregnancy on reproductive productivity of red deer. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, p. 285-296, 2005.

BARROS, C. M.; ERENO, R. L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 32, p. 23-34, 2004. Suppl.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 29, p. 305-317, 2005.

BORJESSON, D. L.; WALTER, M. B.; GARDINER, I. A.; DEFORGE, J.; LASLEY, B. Pregnancy detection in Bighorn sheep (*Ovis canadensis*) using a fecal-based enzyme immunoassay. **Journal of Wildlife Diseases**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 67-74, 1996.

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

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

CHAPPLE, R. S.; ENGLISH, A. W.; MULLEY, R. C. Characterization of the oestrous cycle and duration of gestation in chital hinds (*Axis axis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 98, p. 23-26, 1993.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: Funep, 1996. 8p.

DUARTE, J. M. B. O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: Resultado de dois anos de pesquisa. Jaboticabal: FUNEP, 2001. CD ROM.

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

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Tecnologia da Reprodução para Propagação e Conservação de Espécies Ameaçadas de Extinção. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 228-238.

FLOOD, P. F.; TYLER, N. J. C.; READ, E. K.; RODWAY, M. J.; CHEDRESE, P. J. Ovarian and placental production of progesterone and oestradiol during pregnancy in reindeer. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, p. 147-162, 2005.

FRÄDRICH, H. Erfahrungen mit dem sumpfhirsch (*Blastocerus dichotomus*) im Zoo Berlin. **Zoologische Garten NF**, Berlin, v. 65, p. 81-100, 1995.

GARCÍA, A. J.; LANDETE-CASTILLEJOS, T.; CARRIÓN, D.; GASPAR-LÓPES, E.; GALLEGU, L. Compensatory extension of gestation length with advance of conception in red deer (*Cervus elaphus*). **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 305, p. 55-61, 2006.

GARROTT, R.; MONFORT, S. L.; WHITE, P. J.; MASHBURN, K. L.; COOK, J. G. One-sample pregnancy diagnosis in elk using fecal steroid metabolites. **Journal of Wildlife Diseases**, Copenhagen, v. 34, n. 1, p. 126-31, 1998.

GOSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. In vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and parturition. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 83, p. 565-573, 1988.

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 Biology**, New York, 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. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, p. 195-198, 2001.

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

IUCN, 2001, IUCN Red List Categories and Criteria, Cambridge, UK.

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. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 98, p. 495-502, 1993.

KEVERNE, E. B.; LEVY, F.; POINDRON, P.; LÍNDSEY, D. R. Vaginal stimulation: an important determinant of maternal bonding in sheep. **Science**, Washington, v. 219, p. 81-83, 1983.

LASLEY, B. L.; TOEDSSON, M.; BRAVO, W.; HAGGERTY, M. A. Estrogen conjugate measurements to monitor ovarian activity. **Theriogenology**, Stoneham, v. 31, n. 1, p. 127-39, 1989.

LENTON, E. A.; KING, H.; JOHNSON, J.; AMOS, S. Assessment of a dual analytic enzyme linked immunosorbent assay for urinary oestrone-3-glucuronide and pregnandiol-3-glucuronide. **Human Reproduction**, Oxford, v. 4, p. 378-380, 1989.

LIU, B. T.; CHENG, S. P.; HUANG, M. C.; YU, J. Y. L. Serum progesterone changes in luteal cyclicity and duration of estrous cycle in formosan sika deer (*Cervus Nippon taiouanus*). **Zoological Science**, Tokyo, v. 19, p. 1033-1037, 2002.

MENCHACA, A.; MILLER, V.; PINCZAK, A.; LACA, M.; RUBIANES, E. Prostaglandin F2 α treatment associated with timed artificial insemination in ewes. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v. 39, p. 352-355, 2004.

MOLLETT, T. A.; ERB, R. E.; MONK, E. L.; MALVEN, P. V. Changes in estrogen, progesterone, prolactin and lactation traits associated with injection of estradiol-17 β and progesterone in lactating cows. **Journal of Animal Science**, Sanvy, v. 42, p. 655-663, 1976.

MONFORT, S. L.; WEMMER, C.; KEPLER, T. H.; BUSH, M.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Monitoring ovarian function and pregnancy in Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) by evaluating urinary steroid metabolite excretion. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, p. 271-281, 1990.

MONFORT, S. L. Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations. In: HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; RODGER, J. C.; WILDT, D. E. **Reproductive science and integrated conservation**, 1. ed. Cambridge: 2002. p. 147-165.

MORROW, C. J.; WILDT, D. E.; MONFORT, S. L. Reproductive seasonality in the female scimitar-horned orix (*Orix dammah*). **Animal Conservation**, Cambridge, v. 2, p. 261-268, 1999.

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

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

PICKARD, A. R.; ABÁIGAR, T.; GREEN, D. I.; HOLT, W. V.; CANO, M. Hormonal characterization of the reproductive cycle and pregnancy in the female Mohor gazelle (*Gazella dama mhor*). **Reproduction**, Cambridge, v. 122, p. 571-580, 2001.

PINDER, L. Marsh deer *Blastocerus dichotomus* population estimate in the Paraná River, Brazil. **Biological Conservation**, Essex, v. 75, p. 87-91, 1996.

POLEGATO, B. F.; DUARTE, J. M. B. **Validação de método endócrino não-invasivo para o monitoramento da fisiologia reprodutiva e da atividade dos glicocorticóides em cervídeos neotropicais**. 2004. Trabalho de graduação - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

REIMERS, T. J.; ULLMAN, M. B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. **Biology of Reproduction**. Columbus, v. 33, p. 1227-1236, 1985.

ROBBINS, C. T. **Wildlife feeding and nutrition**. New York: Academic Press, 1983. 343p.

ROPSTAD, E.; VIEBERG, V.; SÄKKINEN, H.; DAHL, E.; KINDAHL, H.; HOLAND, O.; BECKERS, J. F.; ELORANTA, E. Endocrine of pregnancy and early pregnancy

detection by reproductive hormones in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 1775-1788, 2005.

RUBIANES, E. Control farmacológico del ciclo estral em caprinos y ovinos. In: **ANAIS CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES**, 2000, São Paulo, p. 255-282.

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

SCHIRAR, A.; MEUSNIER, C.; PALY, J.; LEVASSEUR, M. C.; MARTINET, J. Resumption of ovarian activity in post-partum ewes: role of the uterus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 19, p. 79-89, 1989.

SCHOENECKER, K. A.; LYDA, R. O.; KIRKPATRICK, J. Comparison of three fecal metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis Canadensis*). **Journal of Wildlife Diseases**, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 273-281, 2004.

SCHWARZENBERGER, F.; DREBEN, W. Faecal progesterone metabolites for monitoring ovarian function in marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). In: **INTERNATIONAL DEER BIOLOGY CONGRESS**, 4., 1998, Kaposvár. Proceedings...p. 153-155.

SEMPÉRÉ, A. Plasma progesterone levels in the roe deer *Capreolus capreolus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 50, p. 365-366, 1977.

SEMPÉRÉ, A. J.; RENAUD, G.; BARITEAU, F. Embryonic development measured by ultrasonography and plasma progesterone concentrations in roe deer (*Capreolus capreolus*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 20, p. 155-164, 1989.

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

STOOPS, M. A.; ANDERSON, G. A.; LASLEY, B. L.; SHIDELER, S. E. Use of fecal steroid metabolites to estimate the pregnancy rate of a free-ranging herd of tule elk. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 63, n. 2, p. 561-569, 1999.

THOMPSON, K. V.; MASHBURN, K. L.; MONFORT, S. L. Characterization of estrous cyclicity in the Sable antelope (*Hippotragus niger*) through fecal progesterone monitoring. **General and Comparative Endocrinology**, Duluth, v. 112, p. 129-137, 1998.

THOMPSON, K. V. Flehmen and birth synchrony among female sable antelope, *Hippotragus niger*. **Animal Behaviour**, London, v. 50, p. 475-484, 1995.

TOMÁS, W. M.; BECCACECI, M. D.; PINDER, L. Cervo-do-pantanal. In: Duarte, J. M. B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 1997. p. 24-40.

VERME, L. J. Reproduction studies on penned white-tailed deer. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 29, p. 74-78, 1965.

WASSER, S. K.; VELLOSO A. L.; RODDEN, M. D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 59, n. 4, p. 889-894, 1995.

WEBER, M. & GONZÁLEZ, S. Latin America deer diversity and conservation: a review on status and distributions. **Écoscience**, Quebec, v. 10, p. 443-454, 2003.

WEMMER, C. Deer- Status survey and conservation action plan. **IUCN**, Gland, Switzerland: 1-106, 1998.

WHITE, P. J.; GARROT, R. A.; KIRKPATRICK, J. F.; BERKELEY, E. V. Diagnosing pregnancy in free-ranging elk using fecal steroid metabolites. **Journal of Wildlife Diseases**, Copenhagen, v. 31, n. 4, p. 514-522, 1995.

WHITLEY, N. C.; JACKSON, D. J. Un update on estrus synchronization in goats: a minor species. **Journal of Animal Science Supplement**, Sanvy, v. 82, p. 270-276, 2004.

WILDT, D. E.; RALL, W. F.; CRITSER, J. K.; MONFORT, S. L.; SEAL, U. S. Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation. **BioScience**, Washington, v. 47, n. 10, p. 689-698, 1997.

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

WILLARD, S. T.; SASSER, R. G.; JAQUES, J. T.; WHITE, D. R.; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Early pregnancy detection and the hormonal characterization of embryonic-fetal mortality in fallow deer (*Dama dama*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 861-869, 1998.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; MONAGHAN, S.; HAMON, M.; HEAP, R. Function specialization of the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. **Placenta**, London, v. 17, p. 75-86, 1996.

ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Comparação de dois métodos para sincronização do ciclo estral em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). In: **CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SILVESTRES**, 10., 2006, Águas de São Pedro. Resumen...p. 41.

ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Livro de registro genealógico da população cativa de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Jaboticabal: FUNEP, 2008. CD ROM.

CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÕES

O presente estudo trouxe contribuições importantes para o entendimento da espécie *Blastocerus dichotomus*. Os dados referentes à reprodução foram enfocados e elucidaram, ainda que de forma parcial, a biologia e a fisiologia reprodutiva da espécie. Estes dados, no entanto, abrem um caminho de muitas possibilidades para estudos futuros, tanto que visem a manipulação reprodutiva em cativeiro, quanto o monitoramento de populações em seus ambientes naturais.

A caracterização hormonal do ciclo estral fornece subsídios para o manejo reprodutivo em cativeiro. Através do monitoramento das progestinas fecais é possível diferenciar as fases do ciclo estral (luteal e inter-luteal) e prever o período de receptividade sexual da fêmea, uma vez que a duração média do ciclo estral foi definida. Além disso, a identificação de animais com problemas reprodutivos (como o anestro, por exemplo) foi viabilizada, assim como a avaliação do uso de biotécnicas reprodutivas. Como a espécie encontra-se ameaçada e possui um programa de conservação em cativeiro, tais conhecimentos poderão otimizar o seu manejo reprodutivo e favorecer o desenvolvimento de novas tecnologias que garantam o fluxo genético necessário para a manutenção da variabilidade genética e do vigor da população cativa de cervos-do-pantanal.

Os conhecimentos relacionados ao ciclo estral auxiliaram na avaliação da resposta fisiológica das fêmeas de cervo-do-pantanal à administração de cloprostenol. Como se trata do primeiro relato de manipulação do ciclo estral para a espécie, os resultados, ainda que preliminares, abrem uma gama de possibilidades e já apontam para algumas limitações da técnica, como o período de refratariedade observado no início do ciclo estral. A manipulação do ciclo estral é fundamental para a otimização do manejo em cativeiro, e pensando na dificuldade e custo da movimentação de animais para garantir o fluxo genético dentro do programa de conservação, o uso de biotécnicas ligadas à reprodução, como iseminação artificial e transferência de embriões, pode ser uma alternativa viável e atraente. O cloprostenol também se destacou por ser de

simples administração e exigir pouca manipulação do animal, o que é vantajoso quando se trata de cervídeos.

Um dos métodos com maior potencial de uso para populações de vida livre é o diagnóstico presuntivo de gestação feito de forma não-invasiva, através da concentração de progestinas fecais. Esse método possibilita o desenvolvimento de estudos sobre dinâmica populacional e a avaliação da saúde reprodutiva de populações pequenas, que são mais impactadas pela perda de variabilidade genética, e por isso, mais susceptíveis à diminuição da fertilidade. A metodologia empregada, com a dosagem das progestinas de duas amostras fecais por semana, mostrou-se adequada para diagnosticar gestação a partir de aproximadamente 30 dias pós-cópula e para detectar abortos através do perfil hormonal. Devido ao maior número de colheitas necessárias, ela tem sua importância restrita ao cativeiro. Outra alternativa interessante para o cativeiro é a avaliação do acréscimo na massa corpórea das fêmeas, e o uso dessa variável como um indicador fenotípico de gestação prático, simples e rápido.

O período de gestação observado nesse estudo (253 dias) foi inferior ao descrito anteriormente para a espécie (271 dias). Ele deve ser considerado principalmente para garantir um maior monitoramento dos partos, que é um período bastante crítico devido à fragilidade dos filhotes ao nascimento.

Portanto, os objetivos traçados para o estudo foram atingidos e em alguns aspectos (como no que se relaciona ao comportamento reprodutivo e manipulação do ciclo estral) foram superados. O controle imposto ao experimento favoreceu a aquisição de dados bastante confiáveis e altamente aplicáveis no manejo reprodutivo da espécie. O estudo obteve êxito em elucidar alguns pontos cruciais para a reprodução em cervos-do-pantanal, e a metodologia aplicada permitiu o monitoramento das diferentes fases do ciclo reprodutivo nesta espécie, que é bastante resistente à manipulação e susceptível ao estresse.