

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

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM
CERVOS-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*)

David Javier Galindo Huamán
Médico Veterinário

2017

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

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM
CERVOS-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*)**

David Javier Galindo Huamán

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

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

2017

Galindo, David Javier
G156a Avaliação de Protocolos de Superovulação em Cervos-do-Pantanal
(*Blastocerus dichotomus*) / David Javier Galindo. -- Jaboticabal, 2017
x, 53 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte
Banca examinadora: Eveline dos Santos Zanetti, Maria Emilia
Franco Oliveira
Bibliografia

1. Cervídeos neotropicais. 2. Biotecnologia reprodutiva. 3.
Conservação. 4. eCG. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:599.735.34:591.16

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM CERVOS-DO-PANTANAL
(*Blastocerus dichotomus*)

AUTOR: DAVID JAVIER GALINDO HUAMÁN

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

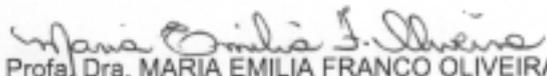
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:



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



Coordenadora técnica EVELINE DOS SANTOS ZANETTI
Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal / Promissão, SP



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

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DAVID JAVIER GALINDO HUAMÁN – Nascido em 18 de fevereiro de 1989, na cidade de Jesús María, Lima, Lima, Peru. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Nacional Maior de São Marcos (FMV-UNMSM), em março de 2007; foi parte do grupo de estudos “Taller de Biotecnología Reproductiva” (TBR, 2009-2012) e do “Taller de Etología Animal” (TEA, 2010-2012), chegando a ser presidente do primeiro e membro fundador do segundo; foi membro de órgãos de representação estudantil como o “Centro Federado de Estudiantes” (CEF) em 2009 e o “Consejo de Facultad” (com direito a bolsa) em 2010; concluiu curso superior em Medicina Veterinária em novembro de 2012. Realizou monitoria, *ad honorem*, nas disciplinas de Anatomia Animal e Bases Antômicas para Cirurgia Veterinária da FMV-UNMSM, entre janeiro e março de 2013, na condição de formado (bacharel vinculado). Em fevereiro de 2014 ingressou na equipe de reprodução animal do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Jaboticabal; nesta mesma unidade, iniciou o curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, em março de 2015, com o tema apresentado nesta dissertação.

“Hay golpes en la vida, tan fuertes... ¡Yo no sé!
Golpes como del odio de Dios; como si ante ellos,
la resaca de todo lo sufrido
se empozara en el alma... ¡Yo no sé!

Son pocos; pero son... Abren zanjas oscuras
en el rostro más fiero y en el lomo más fuerte.
Serán tal vez los potros de bárbaros Atilas;
o los heraldos negros que nos manda la Muerte.

Son las caídas hondas de los Cristos del alma
de alguna fe adorable que el Destino blasfema.
Esos golpes sangrientos son las crepitaciones
de algún pan que en la puerta del horno se nos quema.

Y el hombre... Pobre... ¡pobre! Vuelve los ojos, como
cuando por sobre el hombro nos llama una palmada;
vuelve los ojos locos, y todo lo vivido
se empoza, como charco de culpa, en la mirada.

Hay golpes en la vida, tan fuertes... ¡Yo no sé!”

Los Heraldos Negros, César Vallejo, 1918

Dedico

A Deus todo poderoso, que sempre me guia e guarda na sua glória, por permitir sempre que eu me sinta amado e seguro em sua eterna companhia.

Ao meu avô Roberto Galindo Moreno, que o Senhor tenha ele em sua glória.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Javier Galindo e Maria Cristina Huamán, pelo amor, apoio, compreensão, ligações, educação e sobretudo, por me ensinarem aquele carinho e respeito pela vida que fez com que eu vire o profissional que hoje sou.

Às minhas irmãs Ana, Giuliana e Lorena, pelo amor, sorrisos, chatices e eternas saudades.

Aos meus avós Andrés Huamán, Modesta León e Otilia Ruiz, por serem a base fundamental da minha criação e educação, por estarem tão presentes mesmo ausentes, por apoiarem, entenderem e “não entenderem” tudo o que eu fiz, faço e farei da minha vida.

Às famílias Galindo e Huamán, pelo exemplo de união e amor a família.

Ao Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte, pelo exemplo profissional, a orientação e a confiança depositada em mim para fazer parte da grande família do NUPECCE.

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e a Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira pela amizade, ensinamentos e auxílio técnico no desenho dos protocolos e colheitas de embriões, assim como monitoramento deste trabalho.

À Gabriela Siqueira, pelo auxílio nas colheitas de embriões, amizade e confiança, pelas piadas discriminatórias por eu ser peruano (brincadeira), e por ser uma boa chefe.

À Lincy Camacho, pelo auxílio nas colheitas de embriões, pelo carinho e amizade, pelas brigas de irmãos, pelas dicas e conselhos.

À Luciana Diniz, pela amizade, carisma, karaokê na sala da repro (show ao vivo) e demais momentos.

À Rozana Wendler da Rocha, pelas anestésias para as colheitas de embriões, a parceria dentro e fora do NUPECCE, e pela grande amizade.

À Cláudia Herédias, pela amizade e “socorro técnico” nas dosagens hormonais.

À Mar Roldan, pelas correções da bibliografia e sobretudo pela grande amizade e confiança dentro e fora do NUPECCE.

Agradeço a todos os integrantes e ex-integrantes (equipe, técnicos e tratadores) do NUPECCE, pela ajuda, companheirismo, carinho, dedicação, conselhos, incentivos, brincadeiras, churrascos, estágios e demais. Por proporcionarem um ambiente tão saudável de se trabalhar. De alguma forma, direta ou indireta, todos vocês contribuíram para a finalização desse trabalho.

Ao Jefferson Yunis e Alex Cueva, por me zoarem o tempo todo para terminar o mestrado e pela grande amizade.

À Carmen Arias, pela amizade, carinho e apoio de sempre, tanto aqui como desde Peru.

À Aline Kawanami, pelas caronas para terminar as dosagens (realmente, carona para todo!), pela amizade sincera e o carinho.

Ao Wallynson Almeida, pela amizade e convivência “original” ao longo do mestrado todo.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP pela estrutura, oportunidade e diversos momentos.

À CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

Às diferentes instituições que colaboraram na logística e transferência dos animais: o Bosque e Zoo Fábio Barreto, o Zoológico Municipal de Piracicaba, o Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, e em especial ao Centro de Conservação do Cervos-do-Pantanal, onde morei por quase um mês e aprendi muito do manejo desta espécie.

Ao Fundo Brasileiro para a Biodiversidade (FUNBIO) pelo financiamento deste estudo, o qual está vinculado ao Projeto de Pesquisa Temático “O futuro da conservação de pequenas populações ameaçadas: banco genômico e reintrodução de embriões de cervos-do-pantanal”.

E por último, mas não menos importante, aos animais deste estudo: Amaporã, Juninho, Sema, Bianca, Preciosa, Valentina e a sempre bonzinha da Belinha.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 O cervo-do-pantanal.....	4
2.2 Genética da conservação: A história da reintrodução do cervo-do-pantanal.....	7
2.3 Projeto de ação: Reintrodução de embriões de cervo-do-pantanal.....	9
2.4 Fisiologia Reprodutiva do <i>Blastocerus dichotomus</i>	10
2.5 Superovulação.....	12
2.6 Monitoramento Endócrino Não Invasivo.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 Animais.....	18
4.2 Local de estudo.....	19
4.3 Tratamentos hormonais.....	21
4.4 Detecção do estro e fertilização.....	23
4.5 Avaliação da resposta ovariana e colheita de embriões.....	24
4.6 Avaliação dos embriões.....	25
4.7 Colheita de fezes.....	25
4.8 Extração de metabólitos fecais	27
4.9 Validação das dosagens hormonais.....	27
4.10 Ensaio Imunoenzimático (EIA).....	28
5. ANÁLISE DOS DADOS.....	28
6. RESULTADOS.....	28

6.1 Estro e resposta ovariana.....	28
6.2 Colheita de embriões.....	31
6.3 Perfis endócrinos.....	31
7. DISCUSSÃO.....	35
8. CONCLUSÃO.....	40
Referências Bibliográficas	41
APÊNDICE.....	52



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

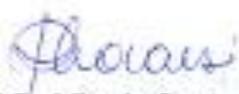


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 13721/15 do trabalho de pesquisa intitulado "Protocolo de superovulação em cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*)", sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de agosto de 2015.

Jaboticabal, 07 de agosto de 2015.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM CERVO-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*)

RESUMO – O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) é uma espécie emblemática dentro dos cervídeos neotropicais. Nas últimas décadas, suas populações têm sofrido declínio notório devido, principalmente, à destruição do seu habitat. Isto causa a perda da diversidade genética, que junto à depressão endogâmica (pelo isolamento de pequenas populações) pode levar à extinções locais. Nesse contexto, as técnicas de reprodução assistida podem auxiliar no processo de manutenção da diversidade genética nestas populações isoladas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi elaborar um protocolo de superovulação para cervo-do-pantanal em cativeiro. Assim, foram testados protocolos sucessivamente (A, B, C) até que fossem obtidos resultados satisfatórios. Para que se pudesse chegar a um protocolo viável, foram testadas três combinações farmacológicas. Tratamento A: CIDR[®] durante sete dias, seguido de 0,5 mg de BE e 0,11 mg de GnRH no dia 0, 800UI de eCG no dia 5 após inserção do CIDR[®], 530 µg de PGF_{2α} no dia 7 e 0,11 mg de GnRH logo após a detecção do estro, para a indução da ovulação. Tratamento B: CIDR[®] durante oito dias, seguido de 0,5 mg de BE e 0,11 mg de GnRH no dia 0, 1200UI de eCG no dia 5 após inserção do CIDR[®], 530 µg de PGF_{2α} no dia 8 e 0,11 mg de GnRH logo após a detecção do estro, para a indução da ovulação. Tratamento C: CIDR[®] durante oito dias, seguido de 0,5 mg de BE e 0,11 mg de GnRH no dia 0, 1200UI de eCG no dia 5 após inserção do CIDR[®], 530 µg de PGF_{2α} no dia 8 e 2,5 mg de LH, entre 12-18 horas após a detecção do estro para a indução da ovulação. A detecção de estro foi realizada com o auxílio de um macho, sendo permitida a cópula. Oito dias após a cópula foi realizada a contagem dos CL e folículos anovulatórios mediante laparotomia mediana ventral, assim como a colheita de embriões. O Tratamento A resultou em 2 CL. O Tratamento B resultou em 1 CL e 8 folículos anovulatórios. O Tratamento C resultou em 10, 3 e 11 CL, e 0, 1 e 5 folículos anovulatórios para as fêmeas 3, 4 e 5, respectivamente. Além disso foi realizada a colheita de 2, 2 e 5 embriões das fêmeas FBD3, FBD4 e FBD5, respectivamente. Obtendo uma taxa de recuperação de 37,5% (9/24), dos quais dois eram embriões viáveis para transferência. Todos os tratamentos foram efetivos na sincronização do estro. O Tratamento C, com a aplicação i.m. de 1200UI de eCG e de LH, como indutor da ovulação, teve a melhor resposta em termos de superovulação, assim como de colheita de embriões.

Palavras-chave: biotecnologia reprodutiva, cervídeos neotropicais, conservação, eCG

EVALUATION OF SUPEROVULATION PROTOCOLS IN MARSH DEER (*Blastocerus dichotomus*)

ABSTRACT – The marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) is an emblematic species within the neotropical deer. In the last decades, their populations have suffered a notable decline due, mainly, to the destruction of their habitat. This causes loss of genetic diversity, which together with inbreeding depression (by the isolation of many small populations) can lead this species to local extinctions. In this context, assisted reproduction techniques can help in the process of maintaining genetic diversity in these isolated populations. Thus, the aim of this study was to elaborate a superovulation protocol for captive marsh deer. Therefore, protocols were successively tested (A, B, C) until satisfactory results were obtained. To be able to achieve a viable protocol, three pharmacological combinations were tested. Treatment A: CIDR® for 7 days, followed by 0.5 mg of EB and 0.11 mg of GnRH on D0, 800IU of eCG on day 5 after CIDR® insertion, 530 µg PGF_{2α} on day 7, and 0.11 mg of GnRH soon after estrus detection, for ovulation induction. Treatment B: CIDR® for 8 days, followed by 0.5 mg of EB and 0.11 mg of GnRH on D0, 1200IU of eCG on day 5 after CIDR® insertion, 530 µg PGF_{2α} on day 8, and 0.11 mg of GnRH soon after estrus detection, for ovulation induction. Treatment C: CIDR® for 8 days, followed by 0.5 mg of EB and 0.11 mg of GnRH on D0, 1200IU of eCG on day 5 after CIDR® insertion, 530 µg PGF_{2α} on day 8, and 0.25 mg of LH, between 12-18 hours post estrus detection, for ovulation induction. Estrus detection was performed with the aid of a male, and copulation was allowed. Eight days after copulation, CL and anovulatory follicles were counted through median ventral laparotomy, as well as the collection of embryos. Treatment A resulted in 2 CL. Treatment B resulted in 1 CL and 8 anovulatory follicles. Treatment C resulted in 10, 3 and 11 CL, and 0, 1 and 5 anovulatory follicles for hinds FBD3, FBD4, and FBD5, respectively. In addition, 2, 2 and 5 embryos were harvested from hinds FBD3, FBD4 and FBD5, respectively. Obtaining a recovery rate of 37.5% (9/24), of which two were viable embryos for transfer. All treatments were effective in synchronizing estrus. Treatment C, with an i.m. application of 1200IU of eCG and LH, as ovulation inducer, had the best response in terms of superovulation, as well as embryo collection.

Keywords: conservation, eCG, neotropical deer, reproductive biotechnology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica do cervo-do-pantanal. Fonte: IUCN, 2016.....6
- Figura 2.** Ciclo estral de fêmeas de cervo-do-pantanal, apresentado em concentração de progestinas fecais (média \pm EPM; n=16). Fonte: Polegato, 2008.....11
- Figura 3.** Fêmea de cervo-do-pantanal e cocho com ração e abóbora dentro de um piquete no Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal.....19
- Figura 4.** Instalações do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos. (A) corredor entre baias, (B) piquete, (C) baia.....20
- Figura 5.** Esquemas dos Tratamentos A: CIDR[®] (7 dias) + BE + GnRH (D0) + 800UI eCG (D5) + PGF_{2 α} (D7) + GnRH logo após a detecção do estro; Tratamento B: CIDR[®] (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2 α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro; e Tratamento C: CIDR[®] (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2 α} (D8) + LH entre 12-18h após a detecção do estro; realizados na espécie *Blastocerus dichotomus*.....22
- Figura 6.** Cornos e corpo uterino junto a ovário direito da fêmea FBD2 da espécie *Blastocerus dichotomus*, submetida ao Tratamento B: CIDR[®] (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2 α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro. Note-se a presença de folículos anovulatórios (setas pretas).....30
- Figura 7.** Cornos e corpo uterino junto a ovário esquerdo da fêmea FBD5, da espécie *Blastocerus dichotomus*, submetida ao Tratamento B: CIDR[®] (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2 α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro. Observa-se a presença de folículos anovulatórios (setas brancas) e corpos lúteos (setas pretas).....30

Figura 8. Estruturas recuperadas da fêmea FBD5, da espécie *Blastocerus dichotomus*, após Tratamento C: CIDR® (8 dias) + BE +GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + LH 12-18h após a detecção do estro. As setas pretas indicam duas estruturas viáveis para Transferência de Embrionária.....31

Figura 9. Perfil das concentrações de progestinas fecais da fêmea FBD1, da espécie *Blastocerus dichotomus*, após receber o Tratamento A: CIDR® (7 dias) + BE +GnRH (D0) + 800UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D7) + GnRH logo após a detecção do estro.....32

Figura 10. Perfil das concentrações de progestinas fecais da fêmea FBD2, da espécie *Blastocerus dichotomus*, após receber Tratamento B: CIDR® (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro.....33

Figura 11. Perfil das concentrações de progestinas fecais das fêmeas FBD3, FBD4 e FBD5, da espécie *Blastocerus dichotomus*, após receber o Tratamento C: CIDR® (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + LH entre 12-18h após a detecção do estro).....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolos de superovulação em cervídeos neotropicais.....	14
Tabela 2. Identificação das fêmeas da espécie <i>Blastocerus dichotomus</i> utilizadas nos Tratamentos de superovulação A, B e C.....	18
Tabela 3. Dados do estro e resposta ovariana de cinco fêmeas da espécie <i>Blastocerus dichotomus</i> , submetidas a três diferentes tratamentos de superovulação (Tratamento A: CIDR® (7 dias) + BE + GnRH (D0) + 800UI eCG (D5) + PGF _{2α} (D7) + GnRH logo após a detecção do estro; Tratamento B: CIDR® (8 dias) + BE (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF _{2α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro; Tratamento C: CIDR® (8 dias) + BE (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF _{2α} (D8) + LH 12-18h após a detecção do estro.....	29
Tabela A. Tabela com três diferentes tratamentos de superovulação testados dentro da proposta do projeto “O futuro da conservação de pequenas populações ameaçadas: banco genômico e reintrodução de embriões de cervos-do-pantanal” entre os anos de 2013 – 2014.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	benzoato de estradiol
CCCP	Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal
CESP	Companhia Energética de São Paulo
CIDR[®]	Controlled internal drug release
CL	corpo lúteo
CR	críticamente em perigo
DNA	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
eCG	equine chorionic gonadotropin (gonadotrofina coriônica equina)
EEJ	Estação Ecológica de Jataí
EIA	enzyme immunoassay (ensaio imunoenzimático)
FSH	follicle-stimulating hormone (hormônio folículo-estimulante)
g	força-g
GnRH	gonadotropin-releasing hormone (hormônio liberador de gonadrofinas)
IUCN	International Union for Conservation of Nature (União Internacional para a Conservação da Natureza)
LH	hormônio luteinizante
MOTE	Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões
NUPECCE	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos
PBS	phosphate buffered saline (solução salina em tampão fosfato)
PCR	polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PF	Progestinas Fecais

PGF_{2α}.....cloprostenol sódico (análogo da prostaglandina)

SFB.....soro fetal bovino

SOV.....superovulação

SSR.....sequências simples repetidas

UHE.....Usina Hidrelétrica

VU.....vulnerable (vulnerável)

1. INTRODUÇÃO

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) é a maior espécie de cervídeo da América do Sul e um dos maiores mamíferos brasileiros (DUARTE et al., 2012). Esta emblemática espécie cumpre um papel ecológico fundamental como espécie bandeira do bioma que ocupa, a várzea. Atraindo os esforços de conservação para ela e seu habitat, beneficiando outras espécies menos visíveis ou atrativas da flora e fauna das várzeas (POLEGATO, 2008; DUARTE et al., 2012). Na atualidade, o cervo-do-pantanal ocorre em áreas neotropicais restritas e é classificada na categoria de vulnerável (VU) pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2016).

Várias populações de cervo-do-pantanal encontram-se em risco de extinção devido principalmente à drenagem de várzeas com fins agrícolas e a construção de Usinas Hidrelétricas (UHEs). Nas últimas décadas, a grande destruição do habitat onde ocorria a espécie, fez com que várias populações ficassem isoladas geograficamente, além de diminuir consideravelmente o número de indivíduos e levar à extinção regional em alguns casos. Isto pode levar à diminuição da variabilidade genética e perda do vigor (como resultado da deriva genética e da endogamia crescente em populações isoladas), afetando o desempenho reprodutivo, diminuindo a habilidade para evoluir em resposta as mudanças ambientais e aumentando o risco de extinção (ROLDAN et al., 2006; FERREIRA, 2011).

Nesse contexto, as biotécnicas reprodutivas aparecem como uma ferramenta útil para a conservação das espécies em risco de extinção, auxiliando o manejo genético e mantendo a variabilidade genética das populações de cativeiro e vida livre (ZÚCCARI; SERENO, 2006). Contudo, para isto ser possível, é necessário ter conhecimento básico da fisiologia reprodutiva das espécies a fim de permitir o desenvolvimento de técnicas reprodutivas específicas para estas, ou ainda a adaptação de técnicas e protocolos reprodutivos desenvolvidos para espécies semelhantes como ruminantes domésticos ou cervídeos de criação comercial (COMIZZOLI; MERMILLOD; MAUGET, 2000). Motivo pelo qual deve se procurar a utilização de protocolos que diminuam o manejo dos animais, uma vez que os cervídeos são animais com uma alta sensibilidade a estímulos estressores e de difícil

manipulação, fatores que podem alterar sua fisiologia reprodutiva e conseqüentemente sua resposta ante estas técnicas (DIAS, 1997; BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998). No caso particular do cervo-do-pantanal, o conhecimento de aspectos reprodutivos, assim como em outras áreas, não está totalmente elucidado. Porém, hoje em dia, é conhecido que as fêmeas de cervo-do-pantanal são poliéstricas, não estacionais e uníparas, com uma duração de ciclo estral de $21,3 \pm 1,3$ dias (POLEGATO, 2008).

Entre as biotécnicas reprodutivas, temos a superovulação (SOV), técnica muito utilizada nos programas de fertilização *in vitro* e transferência de embriões (BAINBRIDGE; DEAKIN; JABBOUR, 1998). A SOV visa gerar um superestímulo de desenvolvimento folicular que resulte em múltiplas ovulações (a diferença de uma única ovulação por ciclo estral em espécies uníparas), mediante a aplicação de hormônios exógenos, e obter um número correspondente de embriões viáveis (ZÚCCARI; SERENO, 2006). No entanto, a variabilidade na resposta superovulatória e as baixas taxas de fertilização e colheita de embriões ainda são os principais fatores limitantes para os programas de “Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões” (MOTE) nos cervídeos (FENNESSY et al., 1989, 1994; MORROW et al., 1994; POLLARD; PLANTE; BRINGANS, 2007; ZANETTI, et al. 2014). Semelhante ao que acontece com os pequenos ruminantes, onde a variabilidade na resposta superovulatória associada a resposta folicular variável, regressão antecipada do corpo lúteo (CL) e falha na fertilização, tem resultado ser um fator limitante nos programas de MOTE (MENCHACA et al., 2010). Apesar disso, a SOV já foi realizada com sucesso em diversas espécies de cervídeos, como *Cervus elaphus* (ASHER et al., 2000), *Dama dama* (FENNESSY et al., 1994; ASHER et al., 1995), *Mazama gouazoubira* (ZANETTI; DUARTE, 2012; ZANETTI et al., 2014), *Mazama americana* (CURSINO et al., 2014), entre outras. Assim, entre os diferentes protocolos de SOV desenvolvidos até hoje, são dois os hormônios comumente utilizados para a estimulação folicular, o hormônio folículo-estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica equina (eCG), os quais permitem o desenvolvimento e crescimento de não um, mas vários folículos ovarianos até o estágio de folículos pré-ovulatórios com subsequentes ovulações múltiplas, sempre que aplicados no momento do recrutamento folicular na emergência de uma onda folicular (ERENO et al., 2010).

Entre estes dois hormônios, o eCG só precisa de uma única dose para o tratamento de superestímulo folicular (HUNTER; ADAMS; ROWSON, 1955; AVERILL; ROWSON, 1958; DUARTE; GARCIA, 1995; ZANETTI, 2009), a diferença do FSH que precisa de múltiplas doses cada 12 horas pelo período de 3-4 dias (ZANETTI, 2009). Dessa forma, o uso de eCG visa a diminuição da manipulação dos animais e subsequentemente dos fatores de estresse, sendo conhecido que o estresse pode levar a falhas para reproduzir ou uma reprodução deficiente (DIAS, 1997; KERSEY; DEHNHARD, 2014).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta ovulatória a três protocolos de superovulação em fêmeas de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) mantidas em cativeiro, mediante a presença e número de CL e folículos anovulatórios, a quantificação de concentrações de progestinas fecais durante cada tratamento e a produção de embriões.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O cervo-do-pantanal

O cervo-do-pantanal, também conhecido como guaçu-puçú, e suaçuapara no Brasil, e como “ciervo de los pantanos” ao longo da sua distribuição em outros países da América do Sul, é uma espécie emblemática das várzeas. Os indivíduos adultos chegam a medir entre 153 - 191 cm de comprimento de cabeça e corpo, 12 - 16 cm de comprimento de cauda, 110 - 127 cm de altura de ombro e ter um peso de 80 - 150 kg, sendo os machos relativamente maiores as fêmeas (PINDER; GROSSE, 1991). A morfologia da espécie está caracterizada por pernas longas e escuras, orelhas grandes com abundantes pelos brancos em seu interior, focinho preto e a coloração do dorso, que varia entre castanha avermelhada brilhante no verão a uma cor marrom mais escura no inverno, e uma coloração branca no ventre. Os machos apresentam chifres robustos com um padrão de ramificação dicotômica com até 10 pontas cada, conforme sua idade e o nível de sua alimentação (DUARTE et al., 2012). Diferentemente de outras espécies de cervídeos, em que os filhotes nascem com pintas brancas pelo corpo, os filhotes de cervo-do-pantanal nascem com pelagem semelhante ao padrão encontrado nos adultos (DUARTE et al., 2012).

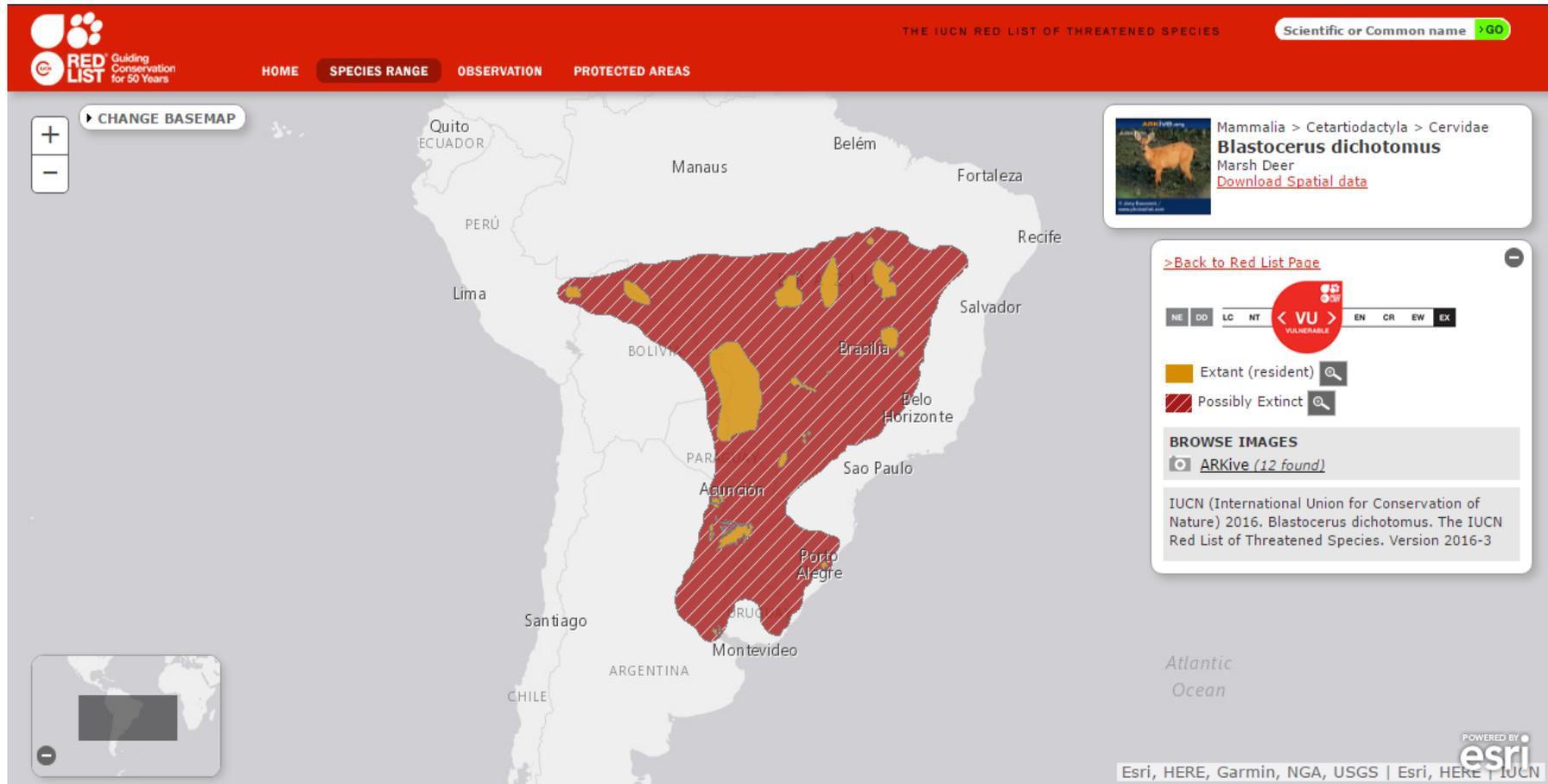
O cervo-do-pantanal era encontrado originalmente desde o sul da Amazônia do Peru até o centro e sul do Brasil, incluindo os territórios da Bolívia, Paraguai e norte da Argentina (SCHALLER; VASCONCELOS, 1978). Pinder e Grosse (1991) sugeriram que esta espécie habitava todas as principais bacias de drenagem do sul da Amazônia e do Paraná (EISENBERG; REDFORD, 1999). Na atualidade, a espécie sobrevive em áreas restritas dentro do Brasil, Argentina, Paraguai, Bolívia e Peru (PIOVEZAN et al., 2010). No Uruguai a espécie é considerada extinta, sendo o último registro datado no país, de 1958 (XIMENEZ; LANGGUTH. PRADERI, 1972; IUCN, 2016). Similarmente, esta espécie desapareceu de grande parte de sua área de ocorrência na Argentina, Paraguai e Peru. Neste último, só existia uma pequena população de menos de 30 indivíduos (TOMAS; BECCACECI; PINDER, 1997). Duarte et al. (2012) relataram no “Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção” que no Brasil, as maiores concentrações de cervos-do-

pantanal *in situ* podem ser observadas apenas no Pantanal brasileiro (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), na região da Ilha do Bananal, rio Araguaia (Mato Grosso e Tocantins), no rio Guaporé (Rondônia) e nas várzeas remanescentes do Rio Paraná (Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo) (Figura 1).

No Brasil, a distribuição da espécie encontra-se bastante reduzida e fragmentada, constando na categoria VU da “Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais” (IUCN). Isto se deve ao declínio contínuo da população, à perda de habitat no passado e à perspectiva de perda de habitat no futuro, com base em ameaças diretas e indiretas (IUCN, 2016). Além disso, ela também é considerada como VU pela “Lista Nacional das espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção” (MMA, 2014) e como criticamente em perigo (CR) pela lista estadual de São Paulo (PERCEQUILLO; KIERULFF, 2009). E embora não existam estudos científicos sobre a diminuição da população no Pantanal (MOURÃO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2002), a espécie pode ser considerada em declínio ao longo da sua distribuição geográfica, devido basicamente à destruição do seu habitat, pressão de caça e suscetibilidade às doenças do gado (TOMAS; BECCACECI; PINDER, 1997; EISENBERG; REDFORD, 1999).

A drenagem de zonas úmidas para fins agrícolas e a construção de UHEs, têm sido as principais causas da destruição e perda do habitat desta espécie, causando o desaparecimento de subpopulações, como aconteceu com as UHEs de Ibitinga, Nova Avanhandava e Três Irmãos. Por outro lado, a drenagem das várzeas também provoca profundas alterações no regime de alagamento das zonas úmidas, o que pode causar perturbações nas comunidades de plantas aquáticas e consequentemente reduzir a capacidade de carga desses habitats para o cervo-do-pantanal (TOMAS; BECCACECI; PINDER, 1997; TOMAS; SALIS, 2000; IUCN, 2016).

Além disso, com exceção do Brasil, são escassas as informações de populações em cativeiro nos outros países da América do Sul. No Brasil, as populações *ex situ* de cervo-do-pantanal tiveram seu início com diversos projetos de conservação. O primeiro deles surgiu como resultado da construção da UHE Três Irmãos, no Rio Tietê em 1991 (CHARITY; TOMAS; BUSCHINELLI, 1989). Do total de animais resgatados, 60 foram destinados ao cativeiro e se converteram em fundadores do Programa de Manejo em Cativeiro para a espécie, o qual foi conduzido



Legenda

- Distribuição atual
- Possivelmente extinto

Figura 1. Distribuição geográfica do cervo-do-pantanal. Fonte: IUCN, 2016.

pela Companhia Energética de São Paulo (CESP). Os animais foram divididos em dois grupos, os quais foram encaminhados para duas instituições em São Paulo: o Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal (CCCP), em Promissão, e o Zoológico de Ilha Solteira (DUARTE, 2001a). Já no ano 1998, como resposta à construção da UHE de Porto Primavera, no Rio Paraná, foi conduzido o projeto “O Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera”, no qual foram resgatados e levados para cativeiro um total de 113 animais. Durante o período de quarentena vieram a óbito 33.63% da população, tendo como as maiores causas de óbitos as relacionadas ao estresse crônico dos animais, o qual inibiu o apetite (caquexia) e deprimiu o sistema imune destes, levando a infecções secundárias importantes (septicemia e pneumonia) (DUARTE, 2001b). Um total de 62 animais foram distribuídos em treze instituições, entre zoológicos e instalações privadas de conservação, incrementando o número de animais dentro do programa de conservação em cativeiro (DUARTE, 2001a), embora estas duas populações tenham sido isoladas reprodutivamente. Zanetti e Duarte (2008) indicaram que a população em cativeiro para esta espécie no Brasil estava estimada em 114 cervos-do-pantanal (52 machos e 62 fêmeas).

2.2 Genética da conservação: A história da reintrodução do cervo-do-pantanal

Os principais efeitos diretos da perda de habitat têm sido a fragmentação e o isolamento das populações de cervos-do-pantanal (TOMAS; BECCACECI; PINDER, 1997), os quais podem afetar a demografia e a genética da espécie. Esse isolamento e diminuição das populações faz com que os índices de endogamia incrementem devido a acasalamentos consanguíneos resultando em uma perda da variabilidade genética que pode comprometer a performance reprodutiva das populações e os mecanismos de adaptação a eventos ambientais que ameacem a sua existência, assim como a expressão de genes deletérios (FERREIRA, 2011).

Devido a isto é importante mencionar o desenvolvimento de poderosas técnicas moleculares para estimar a diversidade genética em espécies de cervídeos neotropicais nas últimas décadas (GONZÁLEZ et al., 2010). O sequenciamento de DNA, o uso de marcadores nucleares como os microssatélites SRR (Sequências Simples Repetidas) junto com a tecnologia do PCR e o uso de softwares de análise

de dados em genética de populações, são ferramentas importantes na detecção da variabilidade genética em indivíduos, dentro e entre populações. Nesse sentido, e fazendo uso destas técnicas moleculares, Ferreira (2011) avaliou a variabilidade genética entre uma população de cervo-do-pantanal reintroduzida na Estação Ecológica de Jataí (EEJ) – Município de Luiz Antônio, São Paulo e sua população original, na Bacia do Rio Paraná. Essa população teve sua origem na reintrodução de 5 animais (2 machos e 3 fêmeas), resgatados da área afetada pela construção da UHE de Porto Primavera (Rio Paraná), em dezembro de 1998 e que foram monitorados até abril de 2000 com a utilização de rádio-colares, como parte do projeto “O Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera”. Posteriormente foram reintroduzidos mais 3 animais (1 macho e 2 fêmeas) em agosto de 2001, com uma população estimada entre 15 - 20 indivíduos 10 anos depois da última reintrodução (FIGUEIRA et al., 2001; FERREIRA, 2011).

Dessa forma, foi avaliada quanto da variabilidade genética foi mantida entre a população reintroduzida na EEJ e a população base de Porto Primavera nos últimos 10 anos. Também se estimou quanto da mesma seria mantida ao longo prazo (100 anos). Assim, a população reintroduzida apresentou grande perda de diversidade genética em relação a sua população de origem nos primeiros 10 anos após a reintrodução; porém, os índices de diversidade genética e endogamia foram estáveis. Além disso, a partir de um estudo de viabilidade populacional por meio do programa Vortex, foi sugerido a inserção de 2-3 indivíduos num intervalo de 4 em 4 gerações dentro da EEJ, para evitar uma depressão endogâmica futura. Podendo ser este o caso de outras pequenas populações isoladas geograficamente e que tenham sofrido um declínio populacional por múltiplos fatores.

Por isso, é importante desenvolver mecanismos para reduzir a depressão por endogamia e que também possam permitir a proliferação da espécie, na tentativa de manter intacta sua variabilidade genética (ROLDAN et al., 2006). Entendendo também, que a depressão endogâmica causada por altas taxas de endogamia está relacionada com a redução da capacidade reprodutiva, sendo assim, populações pequenas ou em declínio são mais propensas à extinção (FERREIRA, 2011).

2.3 Projeto de ação: Reintrodução de embriões de cervo-do-pantanal

No ano de 2013 foi concebido o projeto “O futuro da conservação de pequenas populações ameaçadas: banco genômico e reintrodução de embriões de cervos-do-pantanal”, o qual foi financiado pelo Fundo Brasileiro para a Biodiversidade (FUNBIO) que é a secretaria executiva do Comitê da conta do “Tropical Forest Conservation Act” (TFCA), que visa a troca de dívidas contraídas por países junto aos Estados Unidos da América por investimentos na conservação e no uso sustentável das florestas. Este projeto surgiu no intuito de auxiliar a população de cervos-do-pantanal da EEJ, e desenvolver um método opcional à translocação de indivíduos, como sugerido por Ferreira (2011), para a introdução de uma nova genética na população local existente a cada 4 gerações. Contudo, o processo de translocação de indivíduos pode acarretar grandes riscos como a possibilidade de transmissão de doenças para a população receptora por parte dos indivíduos translocados; assim como a inviabilidade do uso de animais de cativeiro, os quais não conseguiriam reconhecer nem fugir dos predadores, buscar alimento ou disputar por territórios. Para isto, objetivou-se realizar a estimativa da população de cervo-do-pantanal na EEJ por meio de levantamento aéreo e DNA fecal, assim como coletar embriões de fêmeas em cativeiro para a implantação de um banco de embriões da espécie e, posteriormente, implantá-los em fêmeas de vida livre da população da EEJ.

Nesse sentido, foram realizados todos os esforços para o desenvolvimento do projeto por parte da equipe multidisciplinar do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da UNESP, FCAV, Câmpus Jaboticabal juntamente com outras instituições pertencentes ao Programa de Conservação *ex situ* do Cervo-do-Pantanal. Contudo, apesar da vasta experiência em estudos e projetos de ação em temas de conservação de cervídeos da equipe, foi evidenciada a ainda falta de um maior conhecimento da fisiologia reprodutiva do cervo-do-pantanal, em termos da aplicação de protocolos de superovulação. Os quais, em primeira instância, foram extrapolados de trabalhos com outra espécie de cervídeo neotropical, o *Mazama gouazoubira* (DUARTE; GARCIA, 1995; ZANETTI; DUARTE; 2012; ZANETTI et al., 2014), e que não obtiveram os resultados esperados. Isso, associado à dificuldade da aplicação dos hormônios dentro de cada tratamento, devido às limitações

relacionadas a infraestrutura para manejo e contenção dos animais em algumas instituições participantes do projeto, assim como o fato de trabalhar com indivíduos de uma espécie ameaçada de extinção (VU segundo a IUCN) e a subsequente dificuldade para dispor de um grande número de animais (tanto *ex situ* como *in situ*), fez com que a metodologia fosse repensada mais de uma vez. Todos estes pontos foram a base para a planificação e desenvolvimento do presente estudo. Os dados das primeiras tentativas para estabelecer um protocolo de SOV para o *Blastocerus dichotomus* são apresentados no Apêndice A.

2.4 Fisiologia Reprodutiva do *Blastocerus dichotomus*

Como explicado previamente, é preciso ter um melhor conhecimento da fisiologia reprodutiva da espécie. Com a finalidade de tornar possível o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas específicas para esta ou a adaptação de técnicas e protocolos reprodutivos inicialmente desenvolvidos para ruminantes domésticos e cervídeos criados comercialmente (COMIZZOLI; MERMILLOD; MAUGET, 2000). Bem como, dar um auxílio na preservação e melhora do desempenho reprodutivo das diferentes populações de cervo-do-pantanal, procurando alternativas para evitar o declínio dessas populações. Além disso, os protocolos devem ser delineados de forma que minimizem a manipulação dos animais (BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998), evitando ao máximo estímulos que disparem o estresse neles (DIAS, 1997), no intuito de diminuir toda alteração da fisiologia reprodutiva. Tendo sido já sugerido, que a presença de estímulos estressores reduz a fertilidade das fêmeas por meio da interferência dos mecanismos que regulam os tempos precisos dos eventos dentro de uma fase folicular normal, como a alteração na frequência dos pulsos de LH, o que resulta numa inadequada maturação folicular e falhas na ovulação, levando a casos de subfertilidade (DOBSON; SMITH, 2000). Um interessante exemplo é o trabalho desenvolvido por Cherry et al (2016), no qual observaram uma relação entre a subfertilidade numa população de fêmeas de veado-de-cauda-branca e o estresse induzido pela presença de predadores, nesse caso pontual coiotes, no Joseph W. Jones Ecological Research Center, em Georgia, Estados Unidos da América.

Por outro lado, dentro do conhecimento básico do cervo-do-pantanal, sabe-se que as fêmeas não apresentam sazonalidade reprodutiva, são animais poliéstricos e geram um filhote por gestação. Duarte et al. (2012) mencionaram que não existem registros de partos gemelares nos animais mantidos em cativeiro. A duração média do ciclo estral é de $21,3 \pm 1,3$ dias e é dividido em uma fase inter-luteal e uma fase luteal (Figura 2). A fase inter-luteal tem uma duração de $6,4 \pm 1,2$ dias que vai desde a luteólise do CL até a ovulação e é caracterizada pela manifestação do estro, com duração de 1-2 dias, quando a fêmea está receptiva à cópula. Enquanto a fase luteal

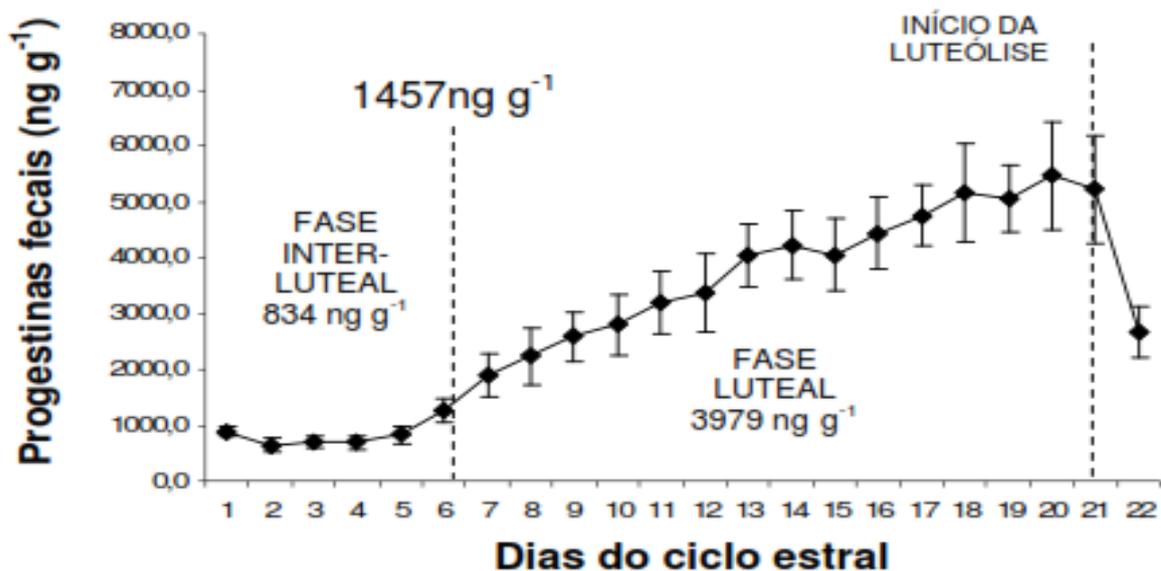


Figura 2. Ciclo estral de fêmeas de cervo-do-pantanal, apresentado em concentração de progesterina fecal (média \pm EPM; n=16). Fonte: Polegato, 2008.

tem uma duração de $14,8 \pm 1,3$ dias e é caracterizada por ter um CL ativo após ovulação e a rejeição à cópula. A gestação tem duração média de 253 dias, embora existam relatos de período gestacional de 271 dias relacionado a uma restrição alimentar severa (FRÄDRICH, 1995; POLEGATO, 2008). Em cativeiro tem sido descrita a apresentação de estro pós-parto, com o aparecimento de ciclos mais curtos que antecederam ciclos estrais normais, observados por meio da dosagem hormonal (POLEGATO, 2008). Até hoje não há referência de estudos de dinâmica folicular nesta espécie. No caso dos machos, sabe-se que não há sincronia no ciclo de troca dos

chifres, com pouca ou nenhuma influência do fotoperíodo e que estes podem ser férteis mesmo com os chifres encapados (PEREIRA, 2010).

2.5 Superovulação

A manutenção de populações cativas de fauna silvestre é importante para a conservação de espécies com alto risco de extinção na natureza, sempre que esta permite obter um conhecimento básico da biologia, fisiologia e ecologia destas (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004). Nesse contexto, as biotécnicas reprodutivas aparecem como grande alternativa de auxílio ao manejo genético e na manutenção da variabilidade genética das espécies. Com isto, busca-se a obtenção de uma população com boa qualidade genética, que após reintrodução na natureza auxilie populações ameaçadas ou em perigo de extinção (ZÚCCARI; SERENO, 2006).

Assim, entre estas biotécnicas está a SOV, a qual tem como objetivo estimular o desenvolvimento de um grande número de folículos ovarianos por onda folicular, bem como de ovulações, mediante a aplicação de gonadotrofinas exógenas, obtendo-se assim um maior número de oócitos disponíveis para a fertilização e, conseqüentemente, de embriões a cada ciclo estral (ZÚCCARI; SERENO, 2006). Isto faz com que a SOV seja uma técnica muito utilizada nos programas de MOTE dos cervídeos (FENNESSY et al., 1989, 1994; WALDHALM et al., 1989; MORROW et al., 1994; POLLARD; PLANTE; BRINGANS, 2007; ZANETTI, et al. 2014). Contudo, ainda existe uma grande variabilidade de resposta superovulatória vinculada a baixas taxas de fertilização e colheita de embriões devido a diversos fatores, entre os quais podemos mencionar protocolos, doses e hormônios utilizados (THOMPSON; ASHER, 1988; ASHER et al., 1995; D'ALESSANDRO; MARTEMUCCI; TAIBI, 2005; ZANETTI; DUARTE, 2012; ZANETTI et al., 2014), idade do animal, genética (ASHER et al., 2000), sazonalidade reprodutiva (MCCORKELL; WOODBURY; ADAMS, 2013), condição folicular no início do tratamento de SOV (GONZALEZ-BULNES et al., 2002; DE ROOVER et al., 2005; VEIGA-LOPEZ et al., 2005), nutrição, manejo, estado sanitário e lactacional (STROUD; HASLER, 2006), entre outros. Isto termina sendo muito parecido com os resultados obtidos até hoje em pequenos ruminantes, onde também existe uma alta variabilidade na resposta ovulatória, limitante que dá como

resultado regressão antecipada do CL, resposta folicular variável, falhas na ovulação, fertilização e taxa de recuperação e qualidade embrionária (BUCKRELL et al., 1990; VEIGA-LOPEZ et al., 2005; MENCHACA et al., 2010). No entanto, estudos recentes sobre o controle da indução da emergência de onda folicular em *C. elaphus* (MCCORKELL; WOODBURY; ADAMS, 2006; 2008) trazem uma nova perspectiva para os protocolos de sincronização e SOV, uma vez que a variabilidade na resposta superovulatória também está relacionada à fase da onda folicular no momento de início do tratamento superovulatório como já foi observado em bovinos (NASSER et al., 1993).

Apesar disso, a SOV já foi realizada com sucesso em diversas espécies de cervídeos, como *Cervus elaphus*, com produção de 1,8 a 3,7 CL em animais não selecionados pelas suas características reprodutivas (ASHER et al., 2000) e 5 a 11 CL em animais selecionados para os programas de TE (FENNESSY et al., 1989, 1994; ASHER et al., 1992, 1995, 2000; ARGO et al., 1994; BAINBRIDGE et al., 1995; SOLER et al., 2007). Protocolos de SOV em *Dama dama*, com produção média de 6 a 10 CL (FENNESSY et al., 1994; MORROW et al., 1994; ASHER et al., 1995) e em *Elaphurus davidianus* com produção média de 3,8 CL (ARGO et al., 1994). Já entre os cervídeos neotropicais, contamos com o *Odocoileus virginianus*, com uma produção média de 3,1 CL (WALDHALM et al., 1989), com o *Mazama gouazoubira*, com uma produção de 1 a 7 CL (DUARTE e GARCIA, 1995; ZANETTI; DUARTE, 2012; ZANETTI et al., 2014) e o *Mazama americana* (CURSINO et al., 2014), sendo que nesta última espécie não foi avaliada a presença de CL, senão que foi realizada aspiração folicular, obtendo-se um total de 26 oócitos aspirados ($8,67 \pm 3,06$ por fêmea, n=3) (Tabela 1).

Entre os diferentes protocolos de SOV desenvolvidos e adaptados para cervídeos, são dois os hormônios majormente utilizados, o FSH e o eCG. Zanetti et al. (2014) avaliaram protocolos de SOV a base de uma única aplicação de eCG (700UI) e múltiplas doses de FSH no *M. gouazoubira*, obtendo uma maior quantidade de produção de CL para o primeiro ($7 \pm 1,8$ CL) e uma mínima resposta para o segundo ($2,6 \pm 0,8$ CL), porém suficiente para ser considerada SOV. Assim, foi sugerida uma relação entre a baixa taxa de ovulações no tratamento de SOV com FSH e o estresse induzido no manejo e contenção física em caixa para a aplicação

Tabela 1. Protocolos de superovulação em cervídeos neotropicais.

Espécie	Protocolo de superovulação	Ovulação (CL)	Estímulo		Método de fertilização	Método de colheita e/ou contagem CL ou folículos	Taxa de colheita	Referência
			Total (CL + folículo)					
Veado-galheiro	Esponja com acetato de medroxiprogesterona 10 ou 14 dias ou PGF _{2α} (14 dias após estro) + 1000UI eCG	3,1	-		Cópula natural	Laparotomia	68%	Waldhalm et al., 1989.
Veado-mateiro^a	CIDR 8 dias + 0,25 ml E2 (dia 0) + 8 doses iguais FSH (130 mg – início dia 4)	-	-		-	Laparotomia no último dia do protocolo	8,7 (aspiração) + 35 (slicing)	Cursino et al., 2014.
Veado-catingueiro	Esponja com acetato de medroxiprogesterona 13 ou 14 dias (troca dia 7) + 700UI eCG (dia 13 ou 14) + hCG dia 16, 17 ou no momento da IA	-	-		Cópula natural	Laparotomia, dia 7 ^b ou 8 ^b	-	Duarte e Garcia, 1995
	CIDR 7,5 dias + 0,25 ml E2 (dia 0) + 8 doses iguais FSH (130 mg – início dia 4,5) + PGF _{2α} (dia 7,5)	2,6	10,2		Cópula natural	Laparoscopia, dia 7 ^b ou dia 9 ^c – 10 ^c	-	Zanetti et al., 2014.
	CIDR 8 dias + 0,25 ml E2 (dia 0) + 700UI eCG (dia 4) + PGF _{2α} (dia 8)	7	11.5		Cópula natural	Laparoscopia, dia 7 ^b ou dia 9 ^c – 10 ^c	-	

CIDR = controlled internal drug release; CL = corpo lúteo; E2 = benzoato de estradiol; eCG = gonadotrofina coriônica equina; FSH = hormônio folículo-estimulante; hCG = gonadotrofina coriônica humana; IA = inseminação artificial; PGF_{2α} = prostaglandina F_{2α}.

^a Protocolo realizado para colheita de oócitos.

^b Número de dias após a IA ou primeira cópula natural.

^c Número de dias após terminado o tratamento.

Adaptada de Zanetti e Duarte, 2014.

dos hormônios, o que poderia ter gerado mudanças na pulsabilidade do LH e subsequentes falhas na ovulação (DIAS, 1997; DOBSON; SMITH, 2000; MCCORCKEL; WOODBURY; ADAMS, 2013). Por outro lado, apesar dos benefícios da sua aplicação única, em termos de manejo e contenção dos animais, e sua adequada resposta superovulatória, o tratamento superovulatório com eCG não foi considerado um protocolo definitivo para o *M. gouazoubira*, por apresentar numerosos folículos anovulatórios e um 66,7% dos animais (4 fêmeas) com regressão prematura do CL (ZANETTI et al., 2014).

2.6 Monitoramento Endócrino Não Invasivo

As técnicas não invasivas de monitoramento endócrino têm tido um desenvolvimento notável nas últimas décadas, o qual tem sido de grande importância para estudos reprodutivos em espécies silvestres, tanto de cativeiro como de vida livre. Estas ferramentas permitem avaliar com precisão o estado endócrino das espécies, como a produção e secreção de hormônios relacionados a quadros de estresse (PALME et al., 2005), e possibilitam a obtenção de um conhecimento básico de sua fisiologia reprodutiva (SCHWARZENBERGER et al., 1996). Dessa forma, facilitam a utilização de biotécnicas reprodutivas e a implementação de programas de conservação *ex situ* e *in situ* das espécies silvestres, assim como estudos sobre suas interações sociais e ecológicas (SCHWARZENBERGER et al., 1996; SCHWARZENBERGER, 2007).

Nesse sentido, a principal vantagem do monitoramento hormonal não invasivo é a não necessidade de contenção física ou química para coletar amostras (MONFORT et al., 1990), evitando assim toda fonte de estresse desde que é conhecido que estressores relacionados com o manejo animal resultam na secreção adrenal de progesterona. O que pode potencialmente interferir nos parâmetros reprodutivos, como a alteração da frequência dos pulsos de LH e subsequentes falhas na maturação folicular e ovulação (MONFORT et al., 1990; DOBSON; SMITH, 2000), tornando-se um ponto vital no manejo de fauna silvestre. Além de que matrizes de coleta não invasiva, como as fezes, podem ser coletadas sem perturbar ao animal; permitindo assim uma amostragem frequente, mesmo durante longos períodos de

tempo (PALME et al, 2005), sem que signifique um risco para o animal ou o pesquisador.

Mediante a dosagem hormonal de metabólitos fecais, tem sido possível aumentar o conhecimento das características reprodutivas e fisiológicas das diferentes espécies de cervídeos. Pavitt et al. (2015), observaram variações relacionadas à estação do ano e à idade de machos de *Cervus elaphus* para metabólitos de andrógenos e corticoides. Também encontraram uma relação positiva entre concentrações altas de glicocorticoides fecais com o tamanho do harém na temporada reprodutiva (setembro-novembro), devido a que os machos tendem se envolver em confrontos mais agressivos, na procura de obter um grande harém. Por outro lado, Mithileshwari et al. (2016) realizaram o monitoramento da prenhez de fêmeas de *Moschus chrysogaster* mediante a dosagem de progestinas fecais e avaliaram esta técnica como método de diagnóstico de prenhez; sendo que o imunoenensaio enzimático para pregnanodiol-3-glucuronídeo, foi encontrado como o mais apropriado para esta espécie. Além disso, a dosagem hormonal não invasiva também tem sido utilizada em estudos com diversas espécies de cervídeos neotropicais, entre elas o cervo-do-pantanal (POLEGATO, 2008; CHRISTOFOLETTI; PEREIRA; DUARTE, 2010), o veado-campeiro (PEREIRA; DUARTE; NEGRÃO, 2005a,b), o veado-catingueiro (PEREIRA et al. 2006, CHRISTOFOLETTI; PEREIRA; DUARTE, 2010) e o veado-mateiro (CRIVELARO et al. 2009; VERSIANI; PEREIRA; DUARTE, 2009; KREPSCHI et al., 2013). Propiciando estudos com a sincronização do estro (*M. gouazoubira* – ZANETTI, POLEGATO; DUARTE, 2010; *M. americana* – CURSINO et al. 2014; *B. dichotomus* – POLEGATO, 2008) e a SOV (*M. gouazoubira* – ZANETTI; DUARTE, 2012; ZANETTI et al., 2014), que podem ser utilizadas como modelos e pontos de partida para que as biotécnicas reprodutivas sejam aplicadas na conservação destas e outras espécies de cervídeos ameaçadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a resposta ovariana a três protocolos de superovulação em cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em cativeiro.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença e número de corpos lúteos e folículos anovulatórios, em fêmeas superovuladas com diferentes protocolos.
- Quantificar as concentrações de progestinas fecais durante os tratamentos superovulatórios.
- Avaliar o número de embriões coletados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Como explicado previamente, o presente estudo surgiu em resposta às dificuldades enfrentadas com os protocolos de sincronização do estro e SOV do projeto “O futuro da conservação de pequenas populações ameaçadas: banco genômico e reintrodução de embriões de cervos-do-pantanal”. Nesse contexto e ante os resultados prévios poucos favoráveis (Apêndice A), foi proposta a realização deste estudo. Dessa forma, foram avaliados 3 (três) tratamentos de SOV com eCG para o *Blastocerus dichotomus*, os quais foram sendo adaptados por “tentativa a erro” de um tratamento a outro, no intuito de chegar a um protocolo eficiente em termos superovulatórios e assim poder cumprir com as metas traçadas no projeto temático. Os tratamentos não levaram em consideração as estações do ano, pois *B. dichotomus* não apresenta sazonalidade reprodutiva (POLEGATO, 2008).

4.1 Animais

Foram utilizados sete animais adultos da espécie *B. dichotomus*, sendo cinco fêmeas entre 3 e 15 anos de idade (Tabela 2), com pesos entre 80,0 e 95,0 kg e diferentes estados reprodutivos (uma nulípara, uma primípara e três multíparas), e dois machos inteiros de 2 e 5 anos de idade, pesos entre 100,0 e 120,0 kg. O animal MBD1 (macho mais novo) não tinha fertilidade comprovada no momento do experimento, enquanto o animal MBD2 (macho mais velho) contava com fertilidade comprovada mediante sua prole pré e pós experimento. Nenhuma fêmea foi submetida a outras biotécnicas, nem procedimentos cirúrgicos prévios. Uma semana prévia aos tratamentos foi realizado o período de adaptação ao manejo, com exceção do Tratamento 1, onde não houve tal período. A identificação da fase do ciclo estral de cada fêmea não foi realizada prévio ao experimento, porém nenhuma estava prenhe de acordo com os registros reprodutivos de cada instituição. Todos os animais pertencem a instituições vinculadas ao Programa de Conservação *ex situ* do Cervo-do-Pantanal e alguns deles foram transferidos e mantidos provisoriamente nas instalações do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Tabela 2. Identificação das fêmeas da espécie *Blastocerus dichotomus* utilizadas nos Tratamentos de superovulação A, B e C.

Tratamento	Identificação	Idade	Histórico Reprodutivo	Instituição de Procedência
Tratamento A	FBD1	5 anos	Multípara	CCCP
Tratamento B	FBD2	5 anos	Primípara	Zoológico Municipal de Piracicaba
	FBD3	6 anos	Multípara	Bosque e Zoo Fábio Barreto
Tratamento C	FBD4	15 anos	Multípara	NUPECCE
	FBD5	3 anos	Nulípara	Zoológico Municipal de Piracicaba

4.2 Local de estudo

Tratamento A

O tratamento foi realizado entre os meses de novembro e dezembro de 2014 nas instalações do CCCP, Promissão, SP. Os animais foram mantidos isolados em piquetes individuais de 20 m x 60 m, com contato auditivo e olfatório com machos e fêmeas coespecíficos expostos a flutuações normais no fotoperíodo. O alimento foi oferecido nos piquetes todas as manhãs. A dieta foi composta por aproximadamente 1 kg de concentrado (ração equina Essence Traditional – Presence®; 15% de proteína bruta, 7% de extrato etéreo, 10% de fibra bruta), 500 g de abóbora (*Abobra tenuifolia*), 250 g de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) e água *ad libitum* (Figura 3).

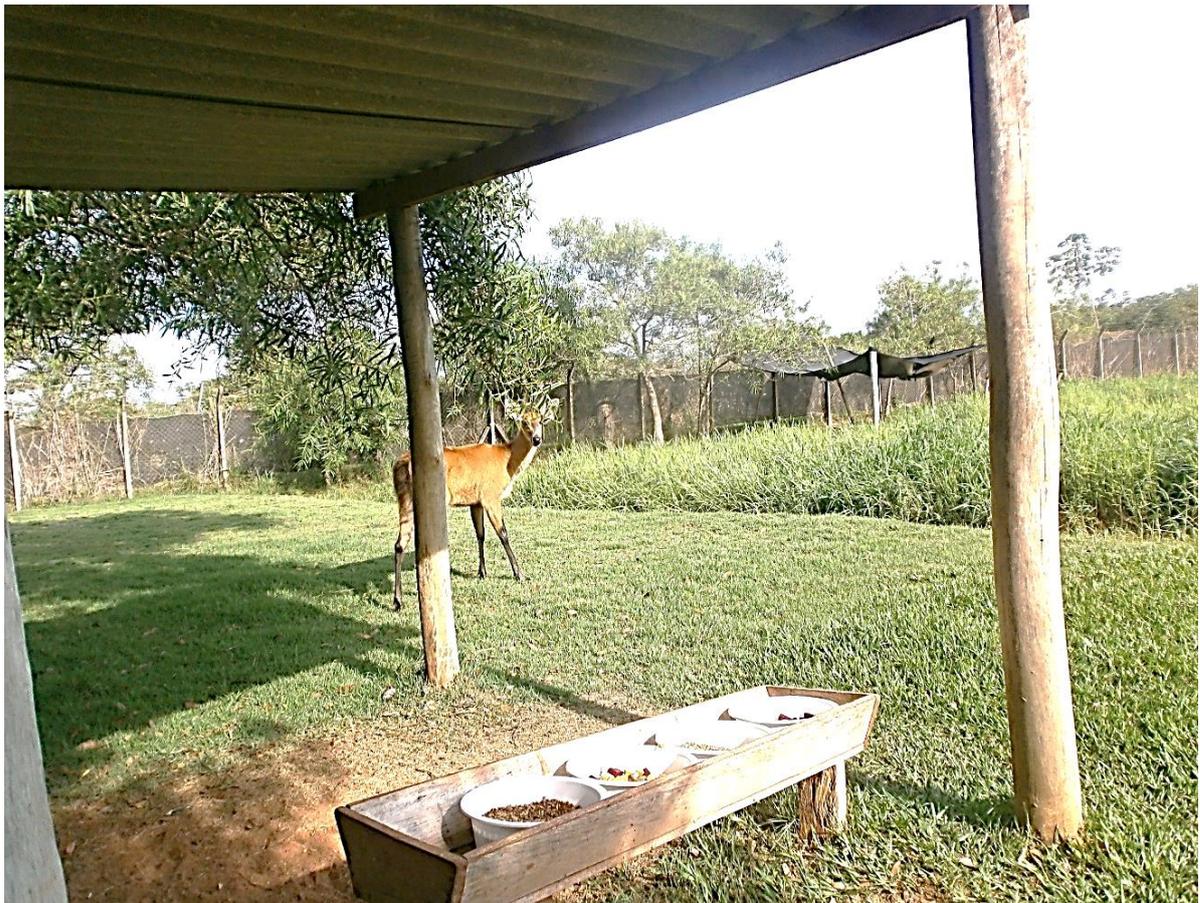


Figura 3. Fêmea de cervo-do-pantanal e cocho com ração e abóbora dentro de um piquete no Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal.

Tratamentos B e C

Os tratamentos foram realizados entre os meses de abril e junho de 2015 nas instalações do NUPECCE, Jaboticabal, SP. Os animais foram isolados em baias individuais de 4.0 m x 4.0 m, com contato auditivo e olfatório com machos e fêmeas coespecíficos expostos a flutuações normais no fotoperíodo ao serem soltos diariamente em um piquete de 20 m x 30 m. A dieta e o manejo foram padronizados com o alimento sendo oferecido nas baias em dois tempos, às 9:00 e 17:00 horas. A dieta foi composta por aproximadamente 1 kg de concentrado (ração equina Equi Tech 12MA – Presence®; 12% de proteína bruta, 4% de extrato etéreo, 10% de fibra bruta) fornecido diariamente pela manhã, 2 kg/animal/dia de alimento volumoso: soja perene (*Neonotonia wightii*), rami (*Boehmeria nivea*) ou ramos de amoreira (*Morus alba*), de acordo com sua disponibilidade no campo, no fim de tarde (sempre molhados, com finalidade de mantê-los por mais tempo aceitáveis pelos animais), e água *ad libitum* (Figura 4).



Figura 4. Instalações do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos. (A) corredor entre baias, (B) piquete, (C) baia.

4.3 Tratamentos hormonais

Tratamento A

Em dia aleatório (D0), o estro da fêmea foi sincronizado por meio da inserção de um dispositivo intravaginal impregnado com 0,33 g de progesterona, desenvolvido para ovinos e caprinos (CIDR[®] - Tipo T - *Controlled Internal Drug Release*[®] - Pfizer[®] - EUA) que foi mantido por 7 dias. Ainda no D0, foram realizadas aplicações i.m. de 0,5 mg de benzoato de estradiol (BE) (Sincrodiol[®] - Ourofino Saúde Animal Ltda - Brasil) e de 0,11 mg de diacetato tetraidratado de gonadorelina (GnRH) (CYSTORELIN[®] - Merial[®] - USA). A fêmea também recebeu uma aplicação de 800UI de eCG (Folligon[®], Intervet[®] do Brasil Veterinária Ltda) 5 dias após a inserção do CIDR[®] (D5), com intuito de induzir a SOV. No momento da retirada do CIDR[®] (D8) foi realizada uma aplicação de 530 µg de cloprostenol sódico (PGF_{2α}) (Ciosin[®] - Shering Plough Coopers[®] - Brasil). Logo após a detecção do estro, foi realizada uma aplicação i.m. de 0.11 mg de GnRH para induzir a ovulação (Figura 5).

Tratamento B

Em dia aleatório (D0), o estro da fêmea foi sincronizado por meio da inserção de um CIDR[®] que foi mantido por 8 dias. Ainda no D0, foram realizadas aplicações i.m. de 0,5 mg de BE e de 0,11 mg de GnRH. A fêmea também recebeu uma aplicação de 1200UI de eCG 5 dias após a inserção do CIDR[®] (D5). No momento da retirada do CIDR[®] (D8) foi realizada uma aplicação de 530 µg de PGF_{2α}. Logo após a detecção do estro, foi realizada uma aplicação i.m. de 0.11 mg de GnRH para induzir a ovulação (Figura 5).

Tratamento C

Em dia aleatório (D0), os estros das fêmeas foram sincronizados por meio da inserção de um CIDR[®] que foi mantido por 8 dias. Ainda no D0, foram realizadas aplicações i.m. de 0,5 mg de BE e de 0,11 mg de GnRH. As fêmeas também

receberam uma aplicação de 1200UI de eCG 5 dias após a inserção do CIDR[®] (D5). No momento da retirada do CIDR[®] (D8) foi realizada uma aplicação de 530 µg de PGF_{2α}. Entre 12 -18 horas após a detecção do estro, foi realizada a aplicação i.m. de 2,5 mg de hormônio luteinizante de pituitária suína (LH) (LUTROPIN[®]-V - Bioniche[®] - Canadá) (Figura 5).

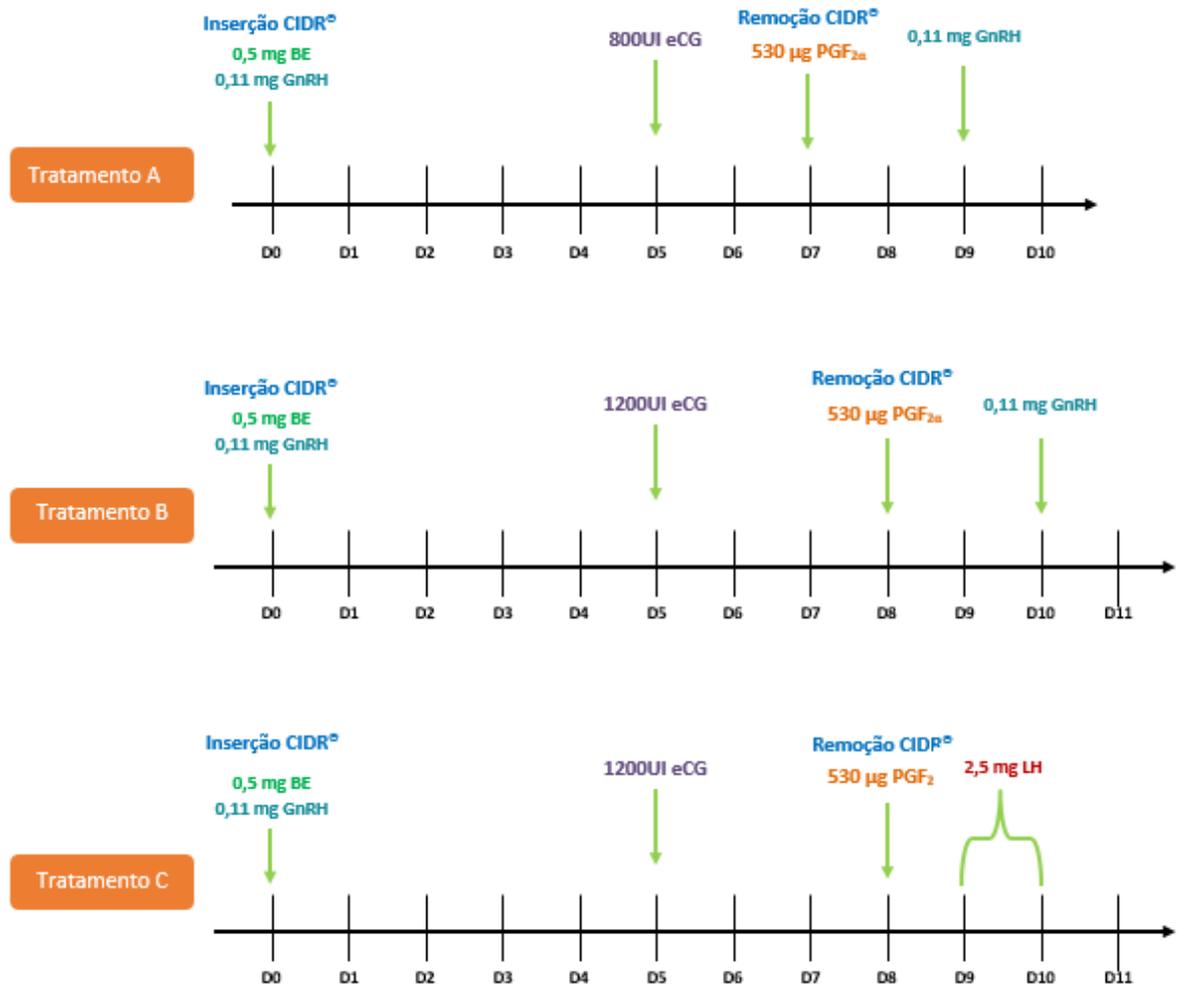


Figura 5. Esquemas dos Tratamentos A: CIDR[®] (7 dias) + BE + GnRH (D0) + 800UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D7) + GnRH logo após a detecção do estro; Tratamento B: CIDR[®] (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro; e Tratamento C: CIDR[®] (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + LH entre 12-18h após a detecção do estro; realizados na espécie *Blastocerus dichotomus*.

No Tratamento A, a inserção e retirada do CIDR[®], e aplicações de BE e GnRH no primeiro dia de tratamentos e a aplicação de PGF_{2α} no último dia do tratamento, foram realizadas durante contenção química da fêmea com a associação i.m. de 1 mg/kg de Azaperone (Stresnil[®], Janssen Pharmaceutica, Bélgica) e 0.5 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Sedomin[®], König do Brasil Ltda. Brasil) (FERRARI, 2015) aplicada com dardo a distância mediante o uso de uma arma anestésica JM-standard (Dan-Inject). A aplicação do eCG foi realizada mediante uso de dardo e zarabatana.

Nos Tratamento B e C, a inserção do CIDR[®], e aplicações de BE e GnRH no primeiro dia de tratamento, foram realizadas durante a contenção química das fêmeas com a associação i.m. de 1 mg/kg de Azaperone (Stresnil[®], Janssen Pharmaceutica, Bélgica) e 0.5 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Sedomin[®], König do Brasil Ltda. Brasil) (FERRARI, 2015) aplicada com dardo a distância mediante o uso de uma arma anestésica. As outras aplicações hormonais, assim como a retirada do CIDR[®] foram realizadas com o auxílio de uma caixa-brete com uma pequena janela para restrição e manipulação dos animais (DUARTE; UHART; GALVES, 2010).

4.4 Detecção do estro e fertilização

No tratamento A, os sinais de estro foram determinados duas vezes por dia (30 minutos cada vez) a partir de um dia após a retirada do CIDR[®]. Para isso, tentativas de aproximação foram realizadas para testar o reflexo de parada à pressão na fêmea, como descrito por Polegato (2008). Uma vez confirmado o estro da fêmea, foi aplicado o indutor da ovulação e logo após, a fêmea FBD1 foi conduzida até o piquete do macho MBD1, para permitir a cópula. Foram observadas 2 cópulas em um período de 25 minutos, sendo que a fêmea ficou até um dia depois no piquete do macho para assegurar o maior número de cópulas possíveis.

Para o caso dos Tratamentos B e C, os sinais de estro foram determinados duas vezes por dia (10 minutos cada vez) a partir de um dia após a retirada do CIDR[®]. Para isso, cada fêmea foi solta junto a um macho MBD2 no piquete e foi observada sua resposta à tentativa de monta por parte deste. O estro comportamental foi definido como o período em que as fêmeas permitiam a cópula (PEREIRA et al., 2006). Para o caso do Tratamento B, uma vez detectado o estro da fêmea, esta foi recolhida e

colocada na caixa-brete para aplicação do indutor da ovulação, depois solta novamente no piquete. Para o Tratamento C, uma vez detectado o estro de cada fêmea, foi esperado entre 12-18 horas para realizar a aplicação do indutor da ovulação. Esta foi realizada antes de soltar as fêmeas pela manhã ou ao recolhê-las no período da tarde. Entre os dois períodos de observação (manhã e tarde) os animais eram deixados soltos no piquete, no intuito de aproveitar o maior número de cópulas, para depois ser levados até suas respectivas baias. Uma exceção foi o caso da fêmea FBD5 (tratamento C), que no dia da detecção do estro, depois de ser recolhida para a baia permaneceu em contato com o macho (as portas das baias permaneceram abertas, permitindo o acesso ao corredor entre baias para assegurar o maior número de cópulas possíveis).

4.5 Avaliação da resposta ovariana e colheita de embriões

A resposta superovulatória foi avaliada pela contagem de CL tanto no ovário direito como no ovário esquerdo e o estímulo folicular total pela contagem de CL e folículos persistentes (grandes folículos anovulatórios) (BLANCO; SIMONETTI; RIVERA, 2003) 8 dias após a cópula mediante procedimento cirúrgico de laparotomia mediana ventral, tal que animais com dois ou mais CL foram classificadas como responsivas a superovulação (ZANETTI et al., 2014). Embora o foco do presente trabalho não tenha sido a produção nem avaliação de embriões, esta foi realizada dentro da proposta do projeto “O futuro da conservação de pequenas populações ameaçadas: banco genômico e reintrodução de embriões de cervos-do-pantanal”, do qual este estudo faz parte.

Para o procedimento cirúrgico as fêmeas foram submetidas a jejum alimentar e hídrico de 24 horas. A contenção química foi feita com a administração da associação de 7.0 mg/kg de Cloridrato de Cetamina (Vetaset® - Fort Dodge - Brasil) e 1 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Rompun® - Bayer - Brasil) por meio de dardo a distância. Em seguida, foram intubadas com sonda endotraqueal nº 9 e mantidas sob anestesia geral inalatória em plano anestésico cirúrgico com isoflurano (Isoflurano Genérico - Instituto Biochimico Ind. Farm.Ltda. - Brasil). Após posicionamento em decúbito dorsal, foi realizada a canulação da veia cefálica para a administração de

fluidoterapia na taxa de 10 ml/kg/h com solução de NaCl 0,9%. A preparação do campo cirúrgico foi feita com a tricotomia da região abdominal, antissepsia cirúrgica (Álcool 70% e Iodo-povidona) e colocação de panos de campo estéreis. A lavagem dos cornos e das tubas uterinas foi realizada de acordo ao descrito por Duarte e Garcia, (1995), com exceção do Tratamento A, onde só foi realizada lavagem uterina. Para a lavagem foi usada uma solução salina em tampão fosfato (PBS) (Nutricell Nutrientes Celulares® - Campinas - Brasil) associada a 1% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell Nutrientes Celulares® - Campinas - Brasil) (ZANETTI, 2009) e aquecida a 37°C. Ao final do procedimento, para o fechamento da ferida cirúrgica foi realizada a sutura com fio nylon 2-0. No pós-operatório imediato os animais receberam uma aplicação i.m. de 40.000 UI/Kg de penicilina benzatina e 500 mg de fenilbutazona, i.v. As fêmeas receberam uma aplicação de 530µg de Ciosin®, para induzir a luteólise dos múltiplos corpos lúteos e prevenir a implantação de embriões que, eventualmente, permaneceram após a avaliação.

4.6 Avaliação dos embriões

Para avaliação dos embriões, o líquido obtido pela lavagem dos cornos e das tubas uterinas foi analisado em estereomicroscópio com aumento de 10x. Os embriões colhidos foram lavados em PBS acrescido de 10% SFB para retirada de debris celulares e classificados (com aumento de 50x) de acordo com o estágio de desenvolvimento (número de células e morfologia), seguindo como referência os padrões utilizados para embriões bovinos (STRINFELLOW; SEIDEL, 1998).

4.7 Colheita de fezes

Tratamento A

A colheita de fezes foi realizada a partir de um dia depois da inserção do CIDR® e não desde 2 dias antes de iniciar o tratamento como aconteceu com as demais fêmeas. Devido em parte a questões de logística por parte dos funcionários do CCCP, que não podiam adiar a data de início do experimento, e ao fato da fêmea FBD1 se

encontrar em um piquete em companhia de outras fêmeas, sendo que só foi transferida para um novo piquete no dia de início do tratamento. A fêmea foi contida quimicamente para a inserção do CIDR® e aplicações de hormônios, impossibilitando a colheita de fezes nesse dia. Até o dia 10 do tratamento, só foi possível a coleta de uma amostra por dia devido a diversos fatores, como a alta reatividade da fêmea ante a presença de pessoas (uma vez que sentia a presença de pessoas no piquete começava correr se afastando), a grande extensão do piquete (40 m x 80 m, aproximadamente) que dificultava a observação da defecação, fatores climáticos (fortes chuvas nesse período do experimento) e estresse do animal pela aplicação dos outros hormônios, assim como a necessidade de realizar mais uma contenção química para poder retirar o CIDR® (dia 7). A partir do dia 11 até o dia do procedimento cirúrgico, foi possível a coleta de fezes duas vezes por dia, uma no período da manhã (8:00 - 9:30) e outra no período da tarde (16:00 –17:30), que foi possível após a habituação ao manejo. O intuito de realizar duas coletas por dia, era para observar possíveis flutuações entre as concentrações de progestinas fecais. Assim, foram coletadas fezes frescas a forma de evitar ter que procurar pelo piquete todo e coletar fezes antigas. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos, previamente identificados com o número do animal, data e hora. Logo após a colheita, o material foi congelado (-20° C) e mantido nesta temperatura até o seu processamento.

Tratamento B e C

As fezes das fêmeas foram colhidas diariamente desde 2 (dois) dias antes do início do tratamento de sincronização/superovulação até o dia da laparotomia mediana ventral (dia da colheita de embriões). As fezes foram colhidas diariamente entre 8:00 - 9:30 horas e entre às 16:00 –17:30 horas. As fêmeas foram retiradas das baias e soltas no piquete, até ser observada a defecação. Dessa forma foi garantida a colheita de amostras (fezes) frescas. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos, previamente identificados com o nome do animal, data e hora. Logo após a colheita, o material foi congelado (-20° C) e mantido nesta temperatura até o seu processamento.

4.8 Extração de metabólitos fecais

Todas as amostras colhidas foram secadas em estufa (Mod. 320-SE[®] - Fanem[®] Ltda - São Paulo - Brasil) a 56°C por aproximadamente 72 horas (YAMAUCHI et al., 1997; HAMASAKI et al., 2001). As amostras secas foram trituradas com auxílio de um martelo de borracha, diminuindo a influência da água nas dosagens hormonais, favorecendo a homogeneização destas nos casos de disfunções gastroentéricas, como diarreia e constipação, e facilitando o manuseio e armazenamento das amostras (BROWN; WILDT, 1997).

Os metabólitos esteroides foram extraídos das amostras fecais como descrito por Graham et al. (2001). Sucintamente, foram pesados 0,5g da amostra processada e adicionados em um tubo de 5mL de metanol a 80%. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos, 12 horas em agitador horizontal (Mod. AP22[®] - Phoenix Ltda – Araraquara - Brasil) e novamente em vórtex por 10 segundos. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 400 g por 20 minutos, o sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para análises posteriores.

4.9 Validação das dosagens hormonais

O teste de validação proposto por Brown, Walker e Steinman (2004), o paralelismo, foi utilizado para averiguar a eficácia das dosagens dos hormônios e seus metabólitos nas fezes do cervo-do-pantanal. Sendo que o Teste de Paralelismo permite determinar se o ensaio está realmente medindo o que deveria estar medindo, ao mostrar se as ligações entre os hormônios das amostras e o anticorpo, seguem uma distribuição semelhante a este último com a curva padrão. Além disso, proporciona a diluição amostral a ser utilizada no ensaio, sendo que é escolhida a diluição mais próxima ao 50% de ligação na curva. Para isto foi elaborado um “pool” com todos os extratos das amostras fecais, seguido de uma diluição seriada deste em EIA buffer, que foi desde o “pool” (1:1) até 1:33554432. A curva-padrão e a curva formada pelo “pool” de amostras diluídas foram comparadas e se validou este teste através da observação de uma disposição paralela entre elas. A diluição que apresentou aproximadamente 50% de ligação entre o anticorpo e as progestinas

fecais foi de 1:4096. Sendo então utilizada aquela diluição para trabalhar com as amostras na dosagem hormonal.

4.10 Ensaio Imunoenzimático (EIA)

As dosagens foram realizadas por meio de EIA, com a colaboração do Laboratório de Endocrinologia do NUPECCE - FCAV/UNESP Jaboticabal, utilizando o anticorpo CL425 (California University – Davis – CA - USA) para progestinas. Este anticorpo foi escolhido por apresentar alta reatividade cruzada com os metabólitos excretados nas fezes de *Blastocerus dichotomus* - 5 α - e 5 β - pregnanes (POLEGATO, 2004). Todos os extratos de progestinas fecais (PF) foram diluídos em tampão de diluição (1:4096) e dosados em duplicata. Durante as dosagens hormonais foram utilizados como controles internos os coeficientes de variação intra- (<10%) e inter-ensaio (7,8% e 5,5% de ligação para o controle baixo e alto, respectivamente) para o, que asseguraram a acurácia, a repetibilidade e a comparabilidade dos dados obtidos com EIA. As concentrações de progestágenos foram expressas em nanograma por grama de fezes secas (ng/g fezes).

5. ANÁLISE DOS DADOS

Só foi utilizada estatística descritiva para apresentar os dados de cada animal, devido ao reduzido número de animais, também como aos riscos e dificuldades de trabalhar com uma espécie classificada como em risco de extinção.

6. RESULTADOS

6.1 Estro e resposta ovariana

Os resultados para estro e resposta superovulatória são mostrados na Tabela 3. Todas as fêmeas manifestaram estro comportamental e copularam com o macho. O tempo para o início do comportamento do estro após a retirada do CIDR® foi de 48 horas para o Tratamento A, 48 horas para o Tratamento B e uma média \pm erro padrão

da média de $32 \pm 4,62$ horas para o Tratamento C. A fêmea FBD3 (Tratamento C) foi a única a manifestar comportamento estral um dia depois da inserção do CIDR®.

Dos 3 tratamentos o único que não resultou em SOV foi o Tratamento B, embora tenha induzido um superestímulo de desenvolvimento folicular, sendo contados oitos folículos anovulatórios (Figura 6). Os animais do Tratamento C tiveram uma melhor resposta de estimulação de desenvolvimento folicular com uma média de $8 \pm 2,52$ CL, de $2 \pm 1,53$ folículos anovulatórios e $10 \pm 3,46$ estruturas ovarianas (estímulo folicular total) (Figura 7).

Tabela 3. Dados do estro e resposta ovariana de cinco fêmeas da espécie *Blastocerus dichotomus*, submetidas a três diferentes tratamentos de superovulação (Tratamento A: CIDR® (7 dias) + BE + GnRH (D0) + 800UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D7) + GnRH logo após a detecção do estro; Tratamento B: CIDR® (8 dias) + BE (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro; Tratamento C: CIDR® (8 dias) + BE (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + LH 12-18h após a detecção do estro.

Tratamentos	A			B		C	
Animais	FBD1	FBD2	FBD3	FBD4	FBD5		
Período entre remoção do CIDR® e início do estro (horas aprox.)	48	48	32	24	40		
Nº de CL	2	1	10	3	11		
Nº de folículos anovulatórios	0	8	0	1	5		
Estímulo folicular total	2	9	10	4	16		
Estruturas recuperadas	0	0	2 ^a	2 ^b	5 ^c		

CIDR® = Controlled drug release; CL = corpo lúteo

^a estruturas não fecundadas

^b embriões degeneradas

^c 2 estruturas viáveis, 2 estruturas não fecundadas, 1 estrutura com bloqueio de divisão celular.

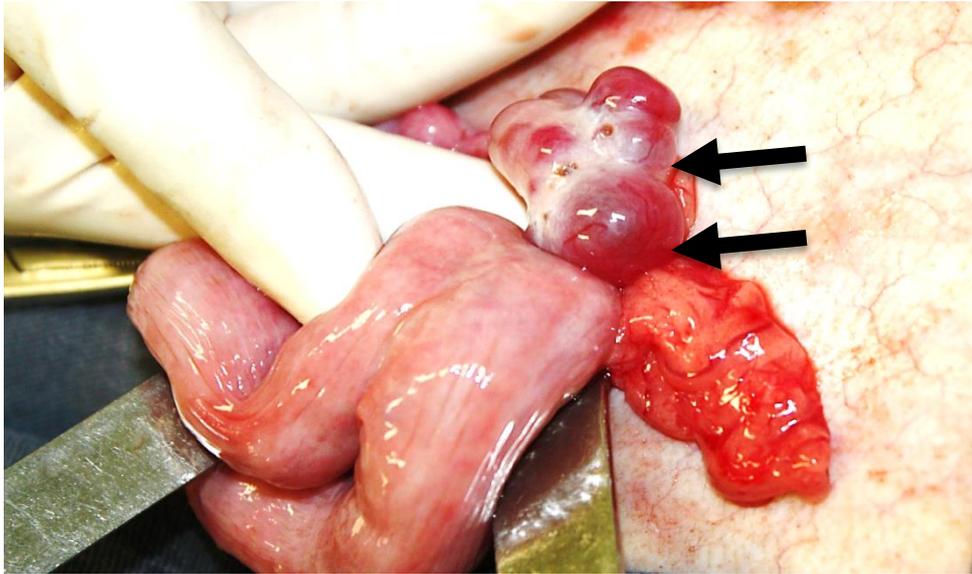


Figura 6. Cornos e corpo uterino junto a ovário direito da fêmea FBD2 da espécie *Blastocerus dichotomus*, submetida ao Tratamento B: CIDR® (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro. Note-se a presença de folículos anovulatórios (setas pretas).

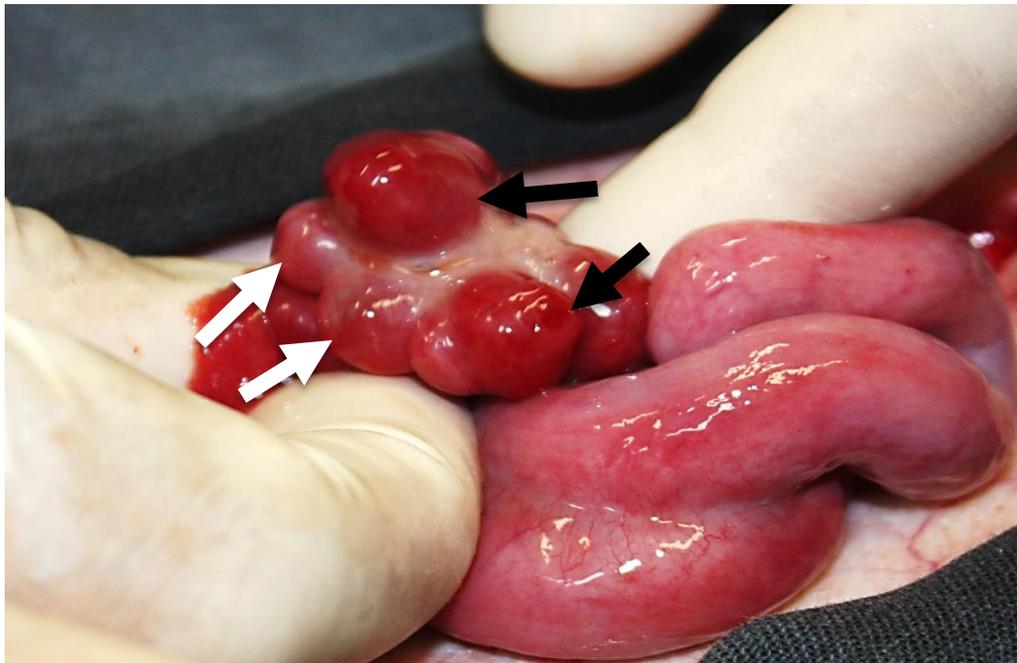


Figura 7. Cornos e corpo uterino junto a ovário esquerdo da fêmea FBD5, da espécie *Blastocerus dichotomus*, submetida ao Tratamento B: CIDR® (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro. Observa-se a presença de folículos anovulatórios (setas brancas) e corpos lúteos (setas pretas).

6.2 Colheita de embriões

Neste estudo foram recuperadas um total de nove estruturas, dentro da proposta do projeto “O futuro da conservação de pequenas populações ameaçadas: banco genômico e reintrodução de embriões de cervos-do-pantanal”. Todos foram produto das lavagens de útero e tuba uterina das fêmeas do Tratamento C, sendo que só dois embriões (Figura 8), recuperados da fêmea FBD5, foram viáveis para Transferência de Embriões segundo a classificação e avaliação morfológica (IETS - STRINFELLOW; SEIDEL, 1998). No Tratamento C, a taxa de recuperação para fêmeas de *Blastocerus dichotomus* foi de 37,5% (9/24)



Figura 8. Estruturas recuperadas da fêmea FBD5, da espécie *Blastocerus dichotomus*, após Tratamento C: CIDR® (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + LH 12-18h após a detecção do estro. As setas pretas indicam duas estruturas viáveis para Transferência de Embrionária.

6.3 Perfis endócrinos

Os valores das concentrações médias de PF na Fase Inter-luteal (834 ± 311 ng/g), Fase Luteal (3979 ± 1611 ng/g) e Prenhez (15250 ng/g; após 11 semanas de gestação) para o *Blastocerus dichotomus* foram tomados como referência do estudo de Polegato (2008) para criar os gráficos de flutuação de PF para cada tratamento. As Figuras 9, 10 e 11 mostram os dados para os Tratamentos A, B e C, respectivamente.

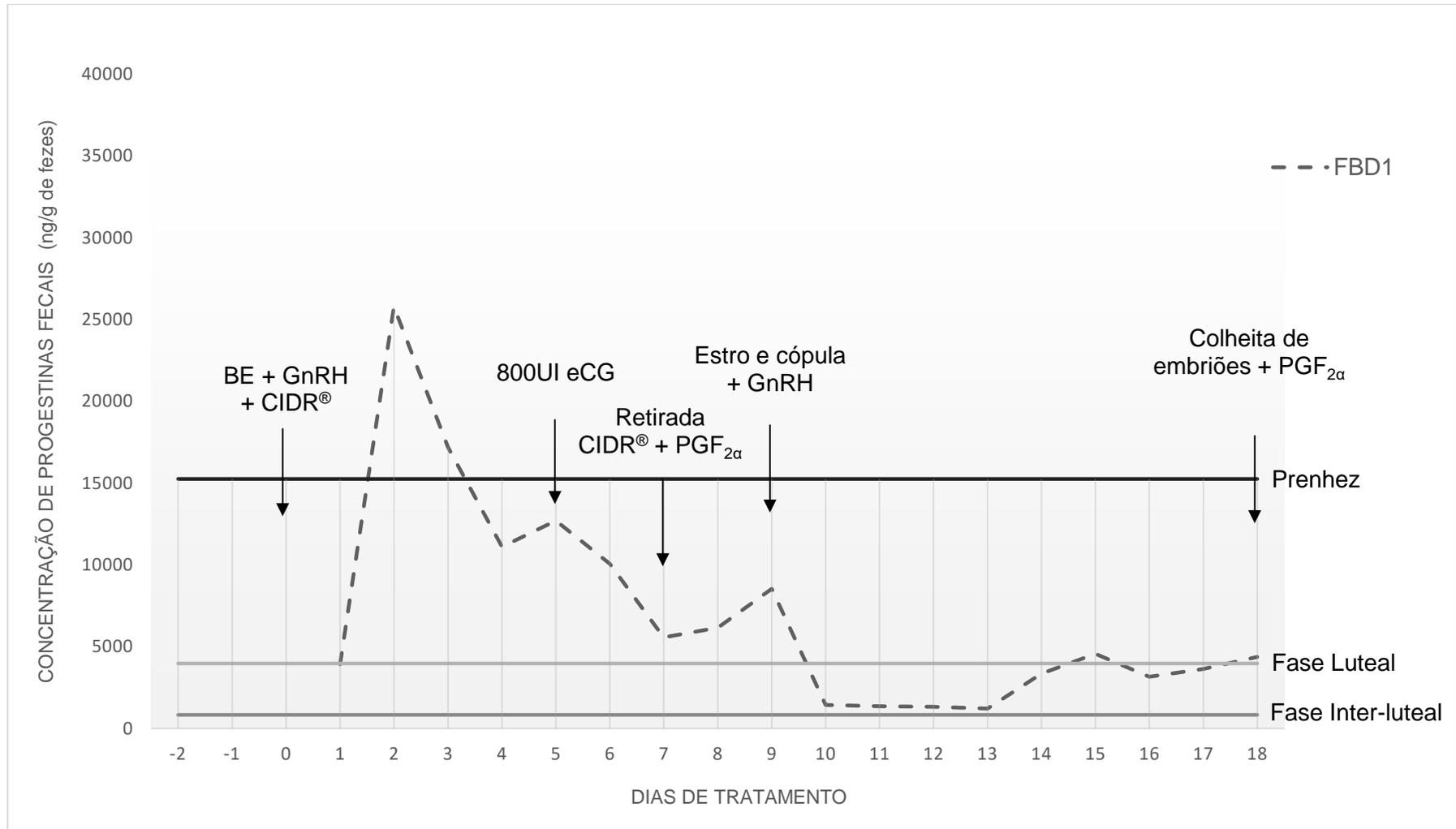


Figura 9. Perfil das concentrações de progesterinas fecais da fêmea FBD1, da espécie *Blastocerus dichotomus*, após receber o Tratamento A: CIDR® (7 dias) + BE +GnRH (D0) + 800UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D7) + GnRH logo após a detecção do estro.

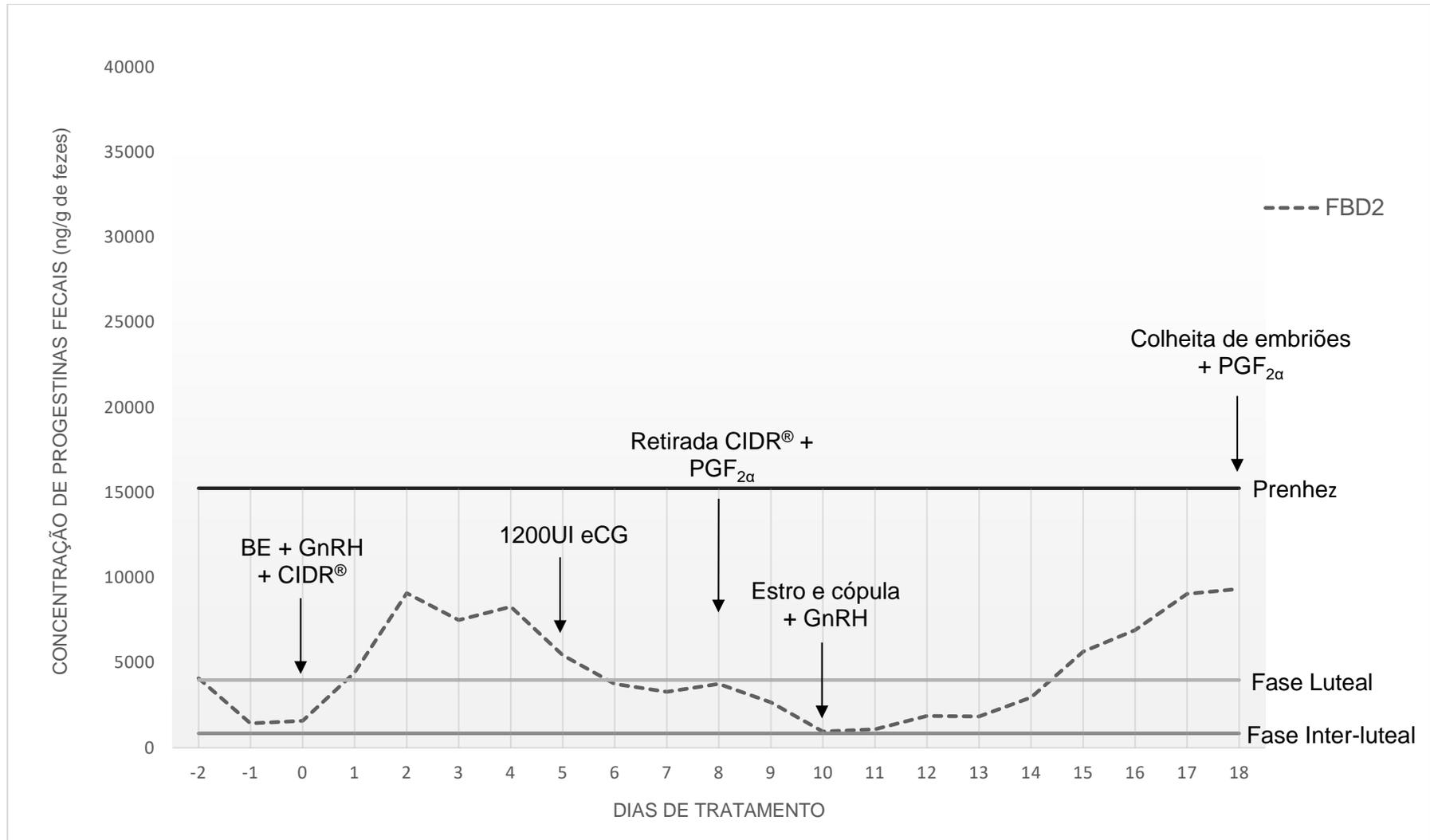


Figura 10. Perfil das concentrações de progesterinas fecais da fêmea FBD2, da espécie *Blastocerus dichotomus*, após receber Tratamento B: CIDR® (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + GnRH logo após a detecção do estro.

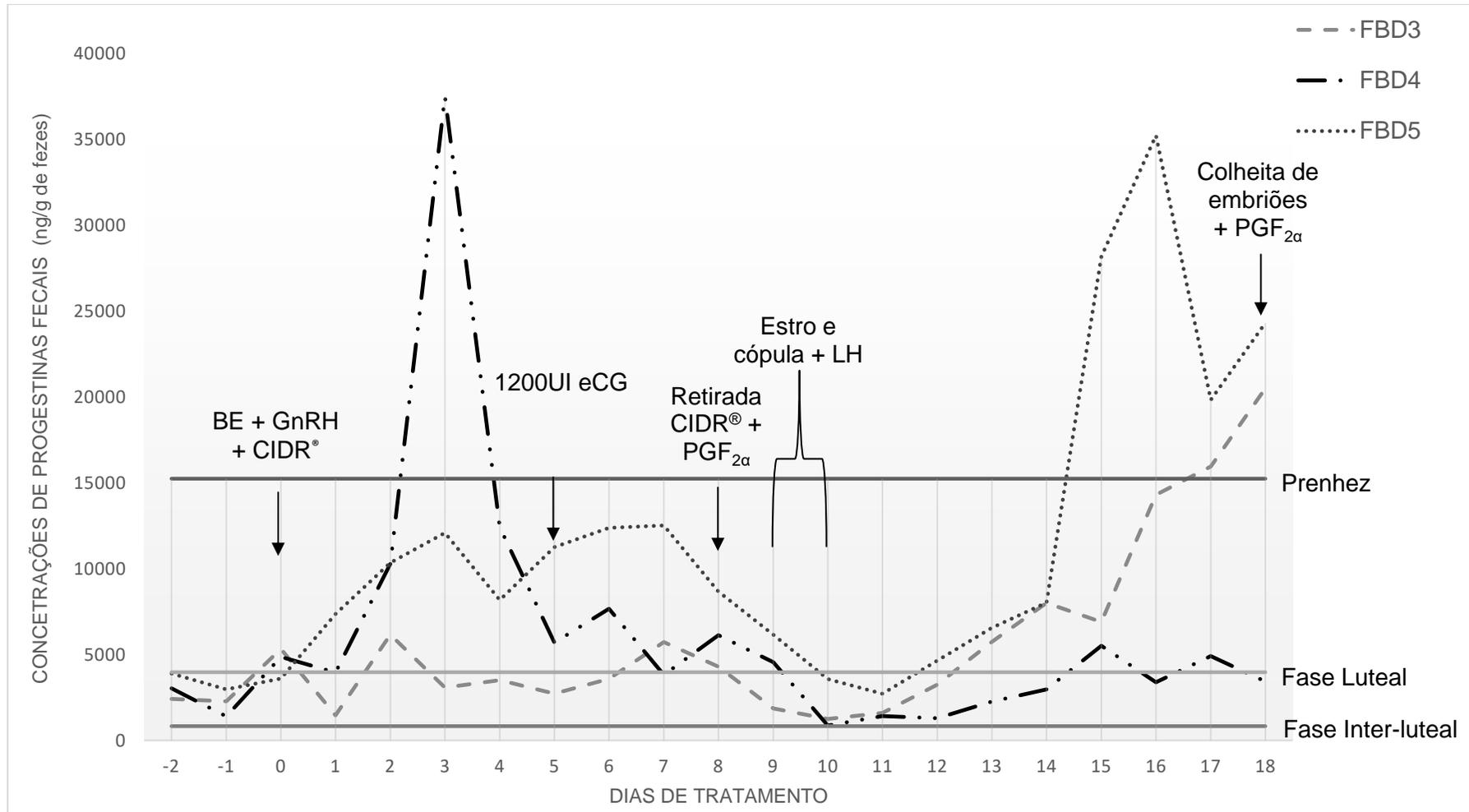


Figura 11. Perfil das concentrações de progesterinas fecais das fêmeas FBD3, FBD4 e FBD5, da espécie *Blastocerus dichotomus*, após receber o Tratamento C: CIDR® (8 dias) + BE + GnRH (D0) + 1200UI eCG (D5) + PGF_{2α} (D8) + LH entre 12-18h após a detecção do estro).

Foi observado em todos os tratamentos o incremento das concentrações de PF logo após a inserção do CIDR[®], e a consequente queda destas uma vez retirado o dispositivo. A Fêmea FBD1 e FBD4 tiveram concentrações maiores de PF em relação ao valor da Prenhez, posterior à inserção do CIDR[®]. Enquanto as outras fêmeas tiveram concentrações de PF entre os valores da Fase Luteal e da Prenhez. Todas as fêmeas tiveram concentrações de PF iguais ou levemente maiores ao valor da Fase Inter-luteal, alguns dias depois da retirada do CIDR[®]. Para a data da colheita de embriões, todas as fêmeas atingiram concentrações de PF maiores ao valor da Fase Luteal. Porém, só as fêmeas FBD3 e FBD5 (Tratamento C) atingiram concentrações maiores de PF ao valor da Prenhez, coincidindo com suas superovulações.

7. DISCUSSÃO

A pesar de todos os avanços em matéria de reprodução animal, ainda se observa a necessidade de diversos estudos que forneçam maior informação e um melhor entendimento da fisiologia reprodutiva das diferentes espécies de cervídeos neotropicais. Sob esta premissa, o NUPECCE tem desenvolvido diversos estudos com SOV na espécie *M. gouazoubira* (DUARTE; GARCIA, 1995; ZANETTI; DUARTE, 2012; ZANETTI et al., 2014) e *M. americana* (CURSINO et al., 2014), obtendo resultados promissores. O presente estudo fornece a avaliação de uma nova ferramenta para a conservação do cervo-do-pantanal, o desenvolvimento de protocolos de SOV baseados no uso de eCG. Assim este hormônio já tem sido utilizado em protocolos de SOV em outra espécie de cervídeo neotropical, o veado-catingueiro. Porém todos estes estudos utilizaram doses menores (300UI, 600UI; ZANETTI, DUARTE, 2012; e 700UI; DUARTE; GARCIA, 1995; ZANETTI et al., 2014) em comparação às doses de 800UI e 1200UI utilizadas neste trabalho.

O Tratamento A usou a dose de 800UI de eCG, resultando em SOV, embora tenha apresentado só 2 CL. Isto pode ter sido o resultado de uma dose insuficiente do hormônio, falhando em produzir o superestímulo de desenvolvimento folicular. De fato, estudos realizados em vacas leiteiras mostraram que doses entre de 200 a 1000UI de eCG conseguem estimular uma única ovulação, enquanto doses requeridas para induzir uma adequada SOV devem ser aproximadamente de 2500UI de eCG (DE

RENSIS; LÓPEZ-GATIUS, 2014). Do mesmo modo, Rainio (1991) sugeriu que uma dose de 1500UI de eCG 48 horas antes de retirar o progestágeno seria adequada para gerar SOV em ovelhas Finnsheep, observando uma relação positiva entre o número de ovulações e o incremento da dose do eCG; porém, hoje em dia a eCG não é utilizada isoladamente em protocolos de SOV nos pequenos ruminantes devido à alta taxa de folículos anovulatórios que gera, os quais se luteinizam (OLIVEIRA, 2011). Gozález-Reyna et al. (1999) também notaram a proporção de ovelhas com folículos persistentes e aquelas com CL presente no dia da laparotomia, aumentou de forma dependente da dose eCG em ovelhas Pelibuey. Nesse contexto, podemos assumir que o cervo-do-pantanal poderia precisar de uma dose maior de eCG para obter uma resposta superovulatória positiva, contrário ao veado-catingueiro, espécie que apresentou resposta superovulatória boa sob doses menores às utilizadas neste estudo (ZANETTI et al., 2014). Contudo, não se devem rejeitar outros fatores, entre eles o fator individual, partindo da premissa que este protocolo não foi testado em outras fêmeas e a variabilidade de resposta de um animal a outro pode ser alta e não deve ser ignorada. Além disso, as concentrações de PF no Tratamento A foram levemente maiores ao valor médio para a Fase Luteal obtida por Polegato (2008), no dia da colheita de embriões. Se bem que a presença de 2 CL deveria estar acompanhada de concentrações altas de progesterona e conseqüentemente de PG na dosagem hormonal, um maior número de CL não é obrigatoriamente proporcional a incrementos nas concentrações de PG. Como acontece na luteólise, a diminuição das concentrações plasmáticas de progesterona ocorre mais rapidamente e de forma mais abrupta quando comparadas com a diminuição da área do tecido lúteo (92 contra 10% de redução, respectivamente), marcando uma clara diferença entre a luteólise funcional e a luteólise estrutural, como visto em ruminantes domésticos (VIANA et al., 1999; SIMÕES et al., 2007; ARASHIRO et al., 2010). Semelhante à excreção dos metabólitos hormonais nas fezes, a qual conta com um tempo de atraso (“lag time”) específico para cada espécie, a partir do pico de concentração hormonal no plasma sanguíneo até que aparece nas fezes (PALME, 2005). Apresentando uma estreita relação com o tempo do trânsito intestinal desde o duodeno até o reto, sendo considerado um “lag time” de 12-24 h para esteroides fecais nos ruminantes (SCHWARZENBERGER et al., 1996; PALME, 2005). Nesse sentido, e entendendo

que a dosagem hormonal não é uma técnica definitiva para indicar quantos CL são funcionais ou sofrem regressão antecipada, é possível explicar a relação não positiva entre o número de CL e as concentrações de PG do Tratamento A. Semelhante ao observado por Arashiro et al. (2010) quando cabras da raça Toggenburg com mais de um CL e maior área de tecido lúteo, não apresentaram concentração plasmática de progesterona superiores à daquelas com uma ovulação ($5,92 \pm 0,59$ vs $7,04 \pm 0,79$ ng / mL). Contudo é necessário indicar que os valores médios para a Fase Inter-luteal, Luteal e Prenhez (valor obtido às 11 semanas de gestação, como método de diagnóstico presuntivo de gestação na espécie) tomados como referência do estudo de Polegato (2008) foram obtidos como uma metodologia diferente ao presente estudo, a liofilização. Enquanto no presente trabalho as amostras de fezes foram secadas em estufa a 56°C por 72 horas, trazendo consigo variações ao momento de realizar a dosagem hormonal. No entanto, permanecem como uma referência boa, ante a falta de dados para esta espécie.

Dessa forma, ante a resposta não satisfatória ao Tratamento A, foram realizados alguns ajustes prévios à implementação do Tratamento B, no intuito de conseguir cumprir os objetivos do projeto temático ao qual pertencia este estudo (para a produção de embriões). O Tratamento B, mudou a dose do eCG para 1200UI e ampliou em um dia o estímulo da progesterona exógena (CIDR[®]), buscando permitir maior estimulação folicular e maior tempo para o crescimento folicular, resultando na presença de 1 CL e 8 folículos anovulatórios. O incremento da dose resultou em um maior estímulo de desenvolvimento folicular em comparação ao Tratamento A; porém, falhou na indução da ovulação. Esta falha pode estar relacionada a diversos fatores, como o próprio uso do eCG, o qual tem sido associado com a ocorrência de desenvolvimento folicular assíncrono, presença de folículos anovulatórios em número proporcional à dose usada (GONZÁLEZ-REYNA et al., 1999), ao estresse gerado durante o manejo, o que é conhecido de afetar a maturação oocitária e suprimir o pico de LH (GONZÁLEZ et al., 2008), entre outros. Zanetti et al., (2014) já tinham observado a presença de vários folículos anovulatórios como resultado ao tratamento de SOV com eCG no veado-catingueiro ($4,5 \pm 1,7$), porém esta resposta ovariana não foi exclusiva do eCG, já que o tratamento de SOV com FSH também apresentou grande quantidade de folículos anovulatórios ($7,6 \pm 0,9$). Isto pode ser explicado

devido ao estresse por manejo gerado nas múltiplas aplicações de FSH, o que foi corroborado com as concentrações altas de glicocorticoides fecais ao momento da primeira aplicação de FSH, em comparação com concentrações de 2 dias prévios ao tratamento ($P < 0.05$). Estas concentrações de glicocorticoides fecais não tiveram diferença significativa com as resultantes do protocolo com eCG, o que indicaria que uma única aplicação deste hormônio teve um efeito semelhante em termos de estresse por manejo, quando comparado ao tratamento de SOV com FSH, porém, as concentrações de glicocorticoides fecais foram menores que as do tratamento com FSH. Além disso, outro fator a considerar, e mais provável, é o não conhecimento de sincronicidade entre uma adequada maturação folicular e a aplicação do indutor da ovulação, o GnRH. A aplicação do GnRH, quando bem no início do estro, faz com que incrementem os pulsos de LH no intuito de forçar e adiantar a ovulação, o qual pode não acontecer se os folículos ovulatórios não tivessem desenvolvido a quantidade necessária de receptores de LH, sendo conduzidos a uma luteinização folicular sem ovulação (XU et al., 1995; D'OCCHIO et al., 1997, 1999; LIU; SIROIS, 1998; KAIM et al., 2003; OLIVEIRA, 2011). Contudo, as concentrações de PF para este tratamento, no dia da colheita de embriões, foram maiores que os do Tratamento A e ao valor médio da Fase Luteal, embora não tenha acontecido SOV. Isto pode ser explicado pela produção de progesterona dos folículos anovulatórios luteinizados, uma vez que aconteceram falhas na ovulação (OLIVEIRA, 2011), ou também por uma produção de progesterona da glândula adrenal, em resposta ao estresse do manejo (MONFORT et al., 1990).

Novamente, ante um resultado insatisfatório no Tratamento B, foi decidido realizar alguns reajustes no protocolo de SOV. Dessa forma, o Tratamento C apresentou uma resposta de SOV positiva em todas as fêmeas, tendo sido modificado o indutor da ovulação, para o LH, e atrasado o tempo de aplicação deste (12-18 horas após detecção do estro), em comparação ao Tratamento B. O efeito positivo desta mudança pode ter sido o atraso no momento da aplicação do indutor da ovulação, permitindo dessa forma uma maturação adequada dos folículos ovulatórios e conseqüentemente uma resposta adequada ao estímulo direto de pico pré-ovulatório de LH, permitindo uma SOV efetiva. A fêmea FBD4 teve a menor resposta em termos superovulatórios, apresentando só 3 CL com este tratamento e concentrações de PF

semelhantes às obtidas no Tratamento A, onde a fêmea FBD1 apresentou 2 CL. Em nossa opinião, isto está relacionado à idade do animal (15 anos), desde que esse fator está relacionado a uma redução do estoque de folículos ovarianos, como observado por Peixoto et al. (2006) quando observaram que a resposta dos corpos lúteos e das estruturas recuperadas diminui à medida que a idade aumenta em zebu, demonstrando certa eficiência deste tratamento e permitindo a suposição de uma melhor resposta de SOV em relação a uma ótima idade reprodutiva, como foram os casos das fêmeas FBD3 e FBD5. Estas duas últimas atingiram concentrações de PF acima do nível médio para a Prenhez (quarto mês de gestação; POLEGATO, 2008), no momento da colheita de embriões, tendo uma relação com o número de CL observados, 10 e 11, respectivamente. Por tanto, é plausível vincular uma resposta superovulatória positiva com uma dose relativamente alta (1200UI) de eCG. Outro dado importante é que só foi possível a recuperação de embriões nas fêmeas do Tratamento C. Isto pode ser explicado pela maior taxa de ovulação em comparação aos Tratamentos A e B, e pela não realização da lavagem tubárica no Tratamento A. No Tratamento C, a taxa de recuperação para fêmeas de *Blastocerus dichotomus* foi de 37,5% (9/24), resultado semelhante a outros estudos em cervídeos como *Elaphus davidianus* (29,3%; ARGO et al., 1994), *Cervus elaphus* (32,7%; ASHER et al., 1995; 43,1%; ARGO et al., 1994) e *Dama dama* (30,6%; ASHER et al., 1995). Das nove estruturas recuperadas, quatro eram células não fertilizadas e dois embriões degenerados. Dos restantes três embriões, dois eram de qualidade transferível e foram vitrificados e disponibilizados para uso no projeto “O futuro da conservação de pequenas populações ameaçadas: banco genômico e reintrodução de embriões de cervos-do-pantanal”. Os dois embriões viáveis foram recuperados da fêmea FBD5, a mais nova ao momento do tratamento (3 anos), cuja resposta ovariana foi de 11 CL e 5 folículos anovulatórios, obtendo a melhor resposta de desenvolvimento folicular entre as fêmeas do Tratamento C. Isto sugere que fêmeas em idade reprodutiva ótima tem uma melhor resposta ao tratamento superovulatório.

Além disso, a combinação de BE com o CIDR[®] (para induzir atresia folicular) e a aplicação de GnRH (para induzir ovulação) foram benéficas na sincronização do estro devido à incerteza da fase de onda folicular no momento de início dos tratamentos. É importante também mencionar que o monitoramento endócrino não

invasivo das PF permitiu ter um panorama maior e uma melhor avaliação da resposta superovulatória em cada tratamento, além dos dados comportamentais (detecção do estro e cópula), sendo que para os gráficos por cada tratamento de SOV, foi decidido apresentar os dados como média por dia de tratamento apesar de ter sido realizada a coleta de amostras duas vezes por dia.

Foi utilizada uma análise estatística descritiva devido ao número limitado de unidades experimentais disponíveis, às dificuldades envolvidas no manejo de cervídeos e devido ao número de tratamentos avaliados, lembrando que o passo de um tratamento a outro foi resultado da necessidade de resolver as problemáticas do projeto temático do qual surgiu este estudo. Além disso, o cervo-do-pantanal é uma espécie vulnerável de acordo com a Lista Vermelha da IUCN e sua presença na natureza é limitada, assim como em cativeiro, onde existe a complexidade para obter um grande número de animais.

8. CONCLUSÃO

Os tratamentos superovulatórios baseados em eCG foram efetivos em induzir um superestímulo de desenvolvimento folicular em fêmeas de cervo-do-pantanal. O Tratamento C, com uma dose de 1200UI de eCG e 2,5 mg de LH para indução da ovulação entre 12 – 18 horas pós detecção do estro, gerou a melhor resposta superovulatória entre os três tratamentos testados neste trabalho. Foi possível a recuperação de embriões (dois viáveis para transferência) da espécie *Blastocerus dichotomus*, sendo este o primeiro relato para esta espécie. O Tratamento C é recomendado para futuros estudos com SOV em cervo-do-pantanal.

Referências bibliográficas

1. ARASHIRO, E. K. N.; VIANA, J. H. M; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C.; BRANDÃO, F. Z. Luteal dynamics in goats: morphological and endocrine features. **Revista Brasileira de Zootecnia**, São Paulo, v. 39, n. 9, p. 1937-1942, 2010.
2. ARGO, C. M.; JABBOUR, H. N.; GODDARD, R.; WEBB, R.; LOUDON, A. S. Superovulation in red deer (*Cervus elaphus*) and Père David's deer (*Elaphurus davidianus*), and fertilization rates following artificial insemination with Père David's deer semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 100, n. 2, p. 629-636, 1994.
3. ASHER, G. W.; FISHER, M. W.; JABBOUR, H. N; SMITH, J. F.; MULLEY, R. C.; MORROW, C. J.; VELDHUIZEN, F. A.; LANGRIDGE, M. Relationship between the onset of oestrus, the preovulatory surge in luteinizing hormone and ovulation following oestrus synchronization and superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 96, n. 1, p. 261-273, 1992.
4. ASHER, G. W.; JABBOUR, H. N.; THOMPSON, J. G.; TERVIT, H. R.; MORROW, C. J. Superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*): Incidence of ovulation and changes in plasma hormone concentrations during the pre-ovulatory period in relation to ova recovery and fertilisation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 38, n. 1-2, p. 137-154, 1995.
5. ASHER, G. W.; O'NEILL, K. T.; SCOTT, I. C.; MOCKETT, B. G. PEARSE, A. J. Genetic influences on reproduction of female red deer (*Cervus elaphus*) (2) Seasonal and genetics effects on the superovulatory response of exogenous FSH. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 59, n. 1-2, p. 61-70, 2000.
6. AVERIL, R. L. W.; ROWSON, L. E. A. Ovum transfer in the sheep. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 16, n. 3, p. 326-336, 1958.
7. BAINBRIDGE, D. R. J.; CHAPPLE, D.; LOUDON, A. S. I.; JABBOUR, H. N. Immunoneutralization with a monoclonal antibody attenuates the superstimulatory effects of PMSG on endocrine and ovarian responses in red deer (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, New York, v. 43, n. 8, p. 1339-1350, 1995.
8. BAINBRIDGE, D. R. J.; DEAKIN, D; JABBOUR, H. N. Premature luteal regression induced by equine Chorionic Gonadotropin and estrogen is suppressed by administration of exogenous interferon in red deer (*Cervus elaphus*). **Biology of Reproduction**, New York, v. 58, n.1, p. 124-129, 1998.
9. BAINBRIDGE, D. R.; JABBOUR, H. N. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Veterinary Record**, London, v. 143, n. 6, p. 159-168, 1998.

10. BLANCO, M. R.; SIMONETTI, L.; RIVERA, O. E. Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments. **Small Ruminant Research**, New York, v. 47, n. 3, p. 183-191, 2003.
11. BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. **International Zoo Yearbook**, London, v. 35, n. 1, p. 173-191, 1997.
12. BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. **Endocrine Manual for the Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species**. 2nd ed. Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Manual. 2004. pp. 1–93.
13. BUCKRELL, B. C.; GARTLEY, C. J.; MEHREN, K. G.; CRAWSHAW, G. J.; JOHNSON, W. H.; BARKER, I. K.; BALKE, J.; COGHILL, C.; CHALLIS, J. R. G.; GOODROWE, K. L. Failure to maintain interspecific pregnancy after transfer of Dall's sheep embryos to domestic ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 90, n. 2, p. 387-394, 1990.
14. CHARITY, S. E.; TOMAS, W. M.; BUSCHINELLI, M. C. P. Plano de manejo e conservação para o cervo-do-pantanal *Blastocerus dichotomus* – U.H.E. Três Irmãos. **CESP**, São Paulo, 1989.
15. CHERRY, M. J.; MORGAN, K. E.; RUTLEDGE, B. T.; CONNER, L. M.; WARREN, R. J. Can coyote predation risk induce reproduction suppression in white-tailed deer? **Ecosphere**, Washington, v. 7, n. 10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ecs2.1481>>.
16. CRISTOFOLETTI, M. D.; PEREIRA, R. J. G.; DUARTE, J. M. B. Influence of husbandry systems on physiological stress reactions of captive brown brocket (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*)—noninvasive analysis of fecal cortisol metabolites. **European Journal of Wildlife Research**, New York, v. 56, n. 4, p. 561–568, 2010.
17. COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 40, n. 5, p. 493-504, 2000.
18. CRIVELARO, R. M.; DUARTE, J. M. B.; ZANETTI, E. S., PEREIRA, J. R. G. Análise das correlações entre características morfológicas, níveis de andrógenos fecais e qualidade seminal em machos de veado-mateiro (*Mazama americana*) mantidos em cativeiro. In: XVIII ENCONTRO E XII CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS (ABRAVAS), 2009. Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: ABRAVAS, 2009. p. 171-174.

19. CURSINO, M. S.; SALVIANO, M. B.; ABRIL, V. V.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 40-51, 2014.
20. D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G.; TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 6, p. 1764-1774, 2005.
21. D'OCCHIO, M. J. D.; JILLELLA, D.; LINDSEY, B. R. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. **Theriogenology**, New York, v. 51, n. 1, p. 9-35, 1999.
22. D'OCCHIO, M. J. D.; SUDHA, G.; JILLELLA, D.; WHITE, T.; MACLELLAN, L. J.; WHLSH, J.; TRIGG, T. E.; MILLER, D. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 3, p. 601-613, 1997.
23. DE RENSIS, F, LÓPEZ-GATIUS, F. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: a Review. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 177-182, 2014.
24. DE ROOVER, R.; BOLS, P. E. J.; GENICOT, G.; HANZEN, CH. Characterization of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 7, p. 1902-1913, 2005.
25. DIAS, J. L. C. Miopatia de captura. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 172-179.
26. DOBSON, H.; SMITH, R. F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 743-752, 2000.
27. DUARTE, J. M. B. Avaliação de um sistema de quarentena e adaptação inicial ao cativeiro de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) capturados na área de influência da usina hidrelétrica de Porto Primavera. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa**. CD-ROM, FUNEP, Jaboticabal, 2001b.
28. DUARTE, J. M. B. Implantação de um programa de conservação "ex situ" do cervo-do-pantanal do Porto Primavera. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa**. CD-ROM, FUNEP, Jaboticabal, 2001a.

29. DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Reprodução assistida em cervídeos brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Minas Gerais, v. 19, p. 111-121, 1995.
30. DUARTE, J. M. B.; PIOVEZAN, U.; ZANETTI, E. S.; RAMOS, H. G. C. Espécies de cervídeos brasileiros com preocupações de conservação: Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). In: DUARTE, J. M. B.; REIS, M. L. (Eds.). **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção**. Brasília: ICMBio, 2012. p. 27-40 (Série Espécies Ameaçadas nº 22).
31. DUARTE, J. M. B.; UHART, M. M.; GALVEZ, C. E. S. Capture and Physical Restraint. In: Duarte, J. M. B.; González, S. (Eds.). **Neotropical Cervidology – Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP, IUCN, 2010. cap. 25, p. 218-227.
32. EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. Order Artiodactyla (Even-toed Ungulates). In: EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. (Eds.). **Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics (Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil)**. Chicago; London: The University of Chicago Press, 1999. v. 3, p. 332-355.
33. ERENO, R. L.; ROSA, F. S.; OLIVEIRA, A. C. S.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M. Use of LH or eCG in the last day of superestimulatory treatment. **Acta Scientiae Veterinariae**, Rio Grande do Sul, v. 38, supl. 2, p. s296-s300, 2010.
34. FENNESSY, P. F.; ASHER, G. W.; BEATSON, N. S.; DIXON, T. E.; HUNTER, J. W.; BRIGANS, M. J. Embryo transfer in deer. **Theriogenology**, New York, v. 41, n. 1, p. 133-138, 1994.
35. FENNESSY, P. F.; FISHER, M. W.; SHACKELL, G. H.; MACKINTOSH, C. G. Superovulation and embryo recovery in red deer (*Cervus elaphus*) hinds. **Theriogenology**, New York, v. 32, n. 5, p. 877-883, 1989.
36. FERRARI, B. G. 2015. **Efeitos da associação de azaperone e xilazina em veados-mateiros (*Mazama americana*) mantidos em cativeiro**. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.
37. FERREIRA, P. R. S. **Genética da reintrodução: O caso do Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) na Estação Ecológica de Jataí**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.
38. FIGUEIRA, C. J. M.; ANDRIOLO, A.; COSTA, M. J. R. P.; DUARTE, J. M. B. Reintrodução de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*): Avaliação de estratégias de soltura e uso do espaço pelos animais nas novas áreas. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa**. CD-ROM, FUNEP, Jaboticabal, 2001.

39. FRÄDRICH, H. Erfahrungen mit dem sumpfhirsch (*Blastocerus dichotomus*) im Zoo Berlin. **Zoologische Garten NF**, Berlin, v. 65, p. 81-100, 1995.
40. FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. Captive breeding and reintroduction. In:_____. (Eds.). **A Primer of Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. p. 145-167.
41. GONZÁLEZ, R.; BERLINGUER, B. ESPESO, G.; ARIU, F.; DEL OLMO, A.; GARDE, J. J.; GOMENDIO, M.; LEDDA, S.; ROLDAN, E. R. Use of neuroleptic in assisted reproduction of the critically endangered Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*). **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 6, p. 909-922, 2008.
42. GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J. M. B.; MALDONADO, J. E. Molecular Phylogenetics and Evolution. In: DUARTE, J. M. B. & GONZÁLEZ, S. (Eds.). **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: Funep, IUCN, 2010. cap.2, p. 12-17.
43. GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M. J. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. **Theriogenology**, New York, v. 58, n. 8, p. 1607-1614, 2002.
44. GONZÁLEZ-REYNA, A.; MÁRQUEZ-GARCÍA, E.; LIZÁRRAGA-TRACY, H.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. C. Dose response effects of PMSG on ovulation rate and follicular development in Pelibuey ewes treated with Syncro-mate-B implants. **Small Ruminant Research**, New York, v. 31, n. 2, p. 149-155, 1999.
45. GRAHAM, L. H.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, New York, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.
46. 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. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 63, n. 2, p. 195–188, 2001.
47. HUNTER, G. L.; ADAMS, C. E.; ROWSON, L. E. Inter-breed ovum transfer in sheep. **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 46, n. 2, p. 143-149, 1955.
48. IUCN. 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 15 de novembro de 2016.
49. KAIM, M.; BLOCH, A.; WOLFENSON, D.; BRAW-TAL, R.; ROSENBERG, M.; VOET, H.; FOLMAN, Y. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. **Journal of Dairy Science**, Pennsylvania, v. 86, n. 6, p. 2012-21, 2003.

50. KERSEY, D. C.; DEHNHARD, M. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 203, p. 296-306, 2014.
51. KREPSCHI, V. G.; POLEGATO, B. F.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Fecal progesterins during pregnancy and postpartum periods of captive red brocket deer (*Mazama americana*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 62-68, 2013.
52. LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biology of Reproduction**, New York, v. 58, n. 6, p.1527-1532, 1998.
53. MCCORKELL, R. B.; WOODBURY, M. R.; ADAMS, G. P. Induction of ovarian follicular wave emergence in wapiti (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 7, p. 1017–1023, 2008.
54. MCCORKELL, R. B.; WOODBURY, M. R.; ADAMS, G. P. Ovarian follicular and luteal dynamics in wapiti during the estrous cycle. **Theriogenology**, New York, v. 65, n. 3, p. 540–56, 2006.
55. MCCORKELL, R. B.; WOODBURY, M. R.; ADAMS, G. P. Superovulation in wapiti (*Cervus elaphus*) during the anovulatory season. **Theriogenology**, New York, v. 79, n. 1, p. 24-27, 2013.
56. MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, v. 22, n. 1, p. 113-118, 2010.
57. MITHILESHWARI, C.; SRIVASTAVA, T.; KUMAR, V.; KUMAR, A.; UMAPATHY, G. Non-invasive assessment of fecal progesteragens and pregnancy detection in Himalayan musk deer (*Moschus chrysogaster*). **Theriogenology**, New York, v. 85, n. 2, p. 216-223, 2016.
58. MMA 2014. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de extinção. IN nº 444/2014 MMA.
59. 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 metabolic excretion. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, n. 1, p. 271-281, 1990.
60. MORROW, C. J.; ASHER, G. W.; BERG, D. K.; TERVIT, H. R.; PUGH, P. A.; MCMILLAN, W. H.; BEAUMONT, S.; HALL, D. R. H.; BELL, A. C. S. Embryo-transfer in fallow deer (*Dama dama*) – superovulation, embryo recovery and laparoscopic transfer of fresh and cryopreserved embryos. **Theriogenology**, New York, v.42, n. 4, p. 579-590, 1994.

61. MOURÃO, G. M.; COUTINHO, M.; MAURO, R.; CAMPOS, Z.; TOMAS, W. M.; MAGNUSSON, W. E. Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal wetland of Brazil. **Biological Conservation**, Barking, v. 92, n. 2, p. 175-183, 2000.
62. NASSER, L. F.; ADAMS, G. P.; BO, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, New York, v. 40, n.4, p. 713–24, 1993.
63. OLIVEIRA, M. E. F. State-of-the-art in the superovulation of ewes. **Acta Scientiae Veterinariae**, Rio Grande do Sul, v. 39, supl. 1, p. 29-35, 2011.
64. PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S. M.; MÖSTL, E. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1040, p. 162-171, 2005.
65. PAVITT, A. T.; WALLING, C. A.; MÖSTL, E.; PEMBERTON, J. M.; KRUIK, L. E. B. Cortisol but not testosterone is repeatable and varies with reproductive effort in wild red deer stags. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 222, p. 62-68, 2015.
66. PERCEQUILLO, A. R.; KIERULFF, M. C. M. Mamíferos. In: BRESSAN, P. M.; KIERULFF, M. C. M.; SUGIEDA, A. M. (Eds.). **Fauna ameaçada de extinção no estado de São Paulo – vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico; Secretaria do Meio Ambiente, 2009. p. 31-85.
67. PEREIRA, R. J. G. Male reproduction. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. Eds. **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: Funep, IUCN, 2010. cap. 6, p. 39-50.
68. PEREIRA, R. J. G.; DUARTE, J. M. B.; NEGRÃO, J. A. Effects of environmental conditions, human activity, reproduction, antler cycle and grouping on fecal glucocorticoids of free-ranging Pampas deer stags (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). **Hormones and Behavior**, New York, v. 49, n. 1, p. 114-122, 2005b.
69. PEREIRA, R. J. G.; DUARTE, J. M. B.; NEGRÃO, J. A. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). **Theriogenology**, New York, v. 63, n.8, p. 2113-2125, 2005a.
70. PEREIRA, R. J. G.; POLEGATO, B. F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J. A.; DUARTE, J. M. B. Monitoring ovarian cycle and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, New York, v. 65, n. 2, p. 387-399, 2006.

71. PEIXOTO, M. G. C. D.; BERGMANN, J. A. G.; FONSECA, C. G.; PENNA, V. M.; PEREIRA, C. S. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 58, n. 4, p. 567-574, 2006.
72. PINDER, L.; GROSSE, A. P. *Blastocerus dichotomus*. **Mammalian Species**, New York, v. 380, p. 1-4, 1991.
73. PIOVEZAN, U.; TIEPOLO, L. M.; TOMAS, W. M.; DUARTE, J. M. B.; VARELA, D.; MARINHO-FILHO, J. S. Marsh deer *Blastocerus dichotomus* (Illiger 1815). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLES, S. (Eds.). **Neotropical Cervidology – Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP, IUCN, 2010. cap. 8, p. 66-76.
74. POLEGATO, B. F. **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**. 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.
75. POLEGATO, B. F. **Validação de método endócrino não-invasivo para o monitoramento da fisiologia reprodutiva e da atividade dos glicocorticóides em cervídeos neotropicais**. 2004. 43f. Trabalho de Graduação (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2004.
76. POLLARD, J.; PLANTE, E.; BRINGANS, M. J. Application of Embryo Biotechnologies in Farmed Cervids. In: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. (Eds.). **Current Therap in Large Animal Theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. cap. 136, p. 991-1000.
77. RAINIO, V. PMSG-dose in Finnsheep embryo production. **Theriogenology**, New York, v. 35, n. 1, p. 261, 1991.
78. RODRIGUES, F.H.; MEDRI, I. M.; TOMAS, W. M.; MOURÃO, G. M. Revisão do conhecimento sobre a ocorrência e distribuição de mamíferos do Pantanal. **Documentos, Embrapa Pantanal**, Mato Grosso do Sul, v. 38, p. 1-42, 2002
79. ROLDAN, E. R. S.; GOMENDIO, M.; GARDE, J. J.; ESPESO, G.; LEDDA, S.; BERLINGUER, F.; del OLMO, A.; SOLER, A. J.; ARREGUI, L.; CRESPO, C.; GONZALEZ, R. Inbreeding and Reproduction in Endangered Ungulates: Preservation of Genetic Variation through the Organization of Genetic Resource Banks. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, supl. 2, p. 82–92, 2006.
80. SCHALLER, G. B.; VANSCONCELOS, J. C. A Marsh Deer census in Brazil. **Oryx**, London, v. 14, n. 4, p. 345-351, 1978.

81. SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, London, v. 41, n. 1, p. 52-74, 2007.
82. 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, n. 1-4, p. 515-526, 1996.
83. SIMÕES, J.; ALMEIDA, J. C.; BARIL, G.; AZEVEDO, J.; FONTES, P.; MASCARENHAS, R. Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 97, n. 1-2, p. 36-46, 2007.
84. SOLER, J. P.; MUCCI, N.; KAISER, G. G.; ALLER, J.; HUNTER, J. W.; DIXON, T. E.; ALBEIRO, R. H. Multiple ovulation and embryo transfer with fresh, frozen and vitrified red deer (*Cervus elaphus*) embryos in Argentina. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 102, n. 3-4, p. 322-327, 2007.
85. STRINFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões: um guia de procedimento e informação geral para uso da tecnologia de transferência de embriões, enfatizando precauções sanitárias**. 3ed. Uberlândia: SBTE, 1998. 180 p.
86. STROUD, B.; HASLER, J. F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. **Theriogenology**, New York, v. 65, n. 1, p. 65-76, 2006.
87. THOMPSON, J. G. E.; ASHER, G. W. Superovulation and ova recovery in farmed fallow deer (*Dama dama*). **Proceeding of the Australian Society for Reproductive Biology**, Newcastle, v. 20, p. 4, 1988.
88. TOMAS, W. M.; BECCACECI, M. D.; PINDER, L. Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). In: J. M. B. Duarte (ed.), *Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos*, pp. 24-40. FUNEP, Jaboticabal. 1997.
89. TOMAS, W. M.; SALIS, S. M. Diet of the marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the Pantanal wetland, Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 165-172, 2000.
90. VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; DOMINGUEZ, V.; COCERO, M. J. The effect of previous ovarian status on ovulation rate and early development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 7, p. 1973-1983, 2005.
91. VERSIANI, N. F.; PEREIRA, R. J. G.; DUARTE, J. M. B. Annual variations in fecal androgen metabolites and antler cycle of captive red brocket bucks (*Mazama americana*) in southeast Brazil. **European Journal of Wildlife Research**, New York, v. 55, n. 5, p. 535-538, 2009.

92. VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v.51, n.3, p.257-262, 1999.
93. WALDHALM, S. J.; JACOBSON, H. A.; DHUNGEL, S. K.; BEARDEN, H. J. Embryo transfer in the white-tailed deer: a reproductive model for endangered deer species of the world. **Theriogenology**, New York, v. 31, n. 2, p. 437-449, 1989.
94. XIMENEZ, A.; LANGGUTH, A.; PRADERI, R. Lista sistemática de los mamíferos del Uruguay. **Anales del Museo de Historia Natural Montevideo**, v. 7, n 5, p. 1-45, 1972.
95. XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, New York, v. 53, n. 4, p. 951-957, 1995.
96. YAMAUCHI, K.; HAMASAKI, S.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Assessment of reproductive status of Sika Deer by fecal steroid analysis. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 43, n. 3, p. 221-226, 1997.
97. ZANETTI, E. S. **Protocolos de superovulação em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)**. 2009. 87 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.
98. ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Análise demográfica da população cativa de cervos-do-pantanal no brasil. In: _____. (Eds.). **Livro de Registro Genealógico da População Cativa de Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*)**. CD-ROM, FUNEP, Jaboticabal, 2008.
99. ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Comparison of three protocols for superovulation of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Zoo Biology**, New York, v. 31, n. 6, p. 642–655, 2012.
100. ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Reprodução e Obstetrícia em Cervídeos Neotropicais. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.). **Tratado de Animais Selvagens**. 2. ed. São Paulo: Editora Roca, 2014. cap. 124, p. 2301-2320.
101. ZANETTI, E. S.; MUNERATO, M. S.; CURSINO, M. S.; DUARTE, J. M. B. Comparing two different superovulation protocols on ovarian activity and fecal glucocorticoid levels in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 12, n. 1, p. 24-32, 2014.

102. ZANETTI, E. S.; POLEGATO, B. F.; DUARTE, J. M. B. Comparison of two methods of synchronization of estrus in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 117, n. 3-4, p. 266–274, 2010.
103. ZÚCCARI, C. S. N.; SERENO, J. R. B. **Biotécnicas da reprodução animal aplicadas à conservação de cervídeos**. Planaltina, Distrito Federal: Embrapa: Cerrados, 2006. 53 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 162).

APÊNDICE

Tabela A. Tabela com três diferentes tratamentos de superovulação testados dentro da proposta do projeto “O futuro da conservação de pequenas populações ameaçadas: banco genômico e reintrodução de embriões de cervos-do-pantanal” entre os anos de 2013 – 2014.

	Animal	Cio	Cópula	CLD	CLE	FOD	FOE	Embriões
Tratamento 1								
0,03 mg	1	Não	-	-	-	-	-	-
Afisterone + 2 mg	2	Sim	Não	-	-	-	-	-
Sincrodiol (D0); 1500 UI Folligon	3	Sim (D14)	Não	-	-	-	-	-
(D4); 0,53 mg Ciosin (D7)	4	Sim (D8)	Sim	0	0	0	01	0
Tratamento 2								
CIDR Ovino +	5	Não	-	-	-	-	-	-
1mg Sincrodiol	6	Não	-	-	-	-	-	-
(D0); 1200 UI	7	Não	-	-	-	-	-	-
Folligon (D4); retirada CIDR +	8	Sim* (D11)	Sim	0	0	0	02	-
0,53mg Ciosin (D8)	9	Sim* (D10)	Sim	01	01	0	0	01 (Degenerado)
Tratamento 3								
CIDR Ovino +	10	Sim (D10)	Sim	0	01	02	05	0
1mg Sincrodiol (D0); 1200 UI	11	Sim (D10)	Sim	0	0	01	03	0
Folligon (D3); retirada CIDR +	12	Sim (D9)	Sim	0	01	01	02	01 (Bloqueio no desenvol- vimento)

* Aplicação de 2,5 mg de LH (LUTROPIN®-V - Bioniche® - Canadá) logo após identificação do cio.