

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

PERFIL DE PROGESTINAS FECAIS DURANTE A
GESTAÇÃO DE VEADO-CAMPEIRO (*Ozotoceros
bezoarticus*) NO PANTANAL.

Mauricio Durante Christofolletti
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2010

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: PERFIL DE PROGESTINAS FECAIS DURANTE A GESTAÇÃO DE VEADO-CAMPEIRO (*Ozotoceros bezoarticus*) NO PANTANAL.

AUTOR: MAURICIO DURANTE CHRISTOFOLETTI

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

Co-orientador: Dr. UBIRATAN PIOVEZAN

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



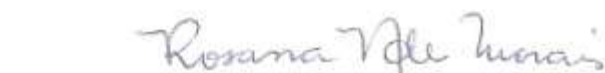
Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI

Departamento de Med Vet Prev e Repr Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. ROSANA NOGUEIRA DE MORAIS

Departamento de Fisiologia / Universidade Federal do Parana / Curitiba/PR

Data da realização: 26 de fevereiro de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAURICIO DURANTE CHRISTOFOLETTI – Nasceu em Santos no dia 07 de junho de 1983. Ingressou no curso de Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Campus de Jaboticabal em 2002 e graduou-se em janeiro de 2007. Nos anos de 2005-2006 foi bolsista PIBIC/CNPq sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e desenvolveu o estudo “Efeito do sistema de manejo em cativeiro sobre o estresse em cervídeos: aferição pelo cortisol fecal” como Iniciação Científica, estudo que recebeu o prêmio “Jovem Pesquisador” 2006 da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. Em 2008 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) e desde então foi bolsista FAPESP.

AGRADECIMENTOS

... à minha mãe Gabriela, ao meu pai Tom, ao meu irmão Tony e a minha irmã Raquel por todo o apoio durante a realização do projeto, além do carinho e dedicação durante toda a minha vida;

... ao meu orientador Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte pela orientação e ensinamento durante todo este tempo de convívio e pela oportunidade e confiança de realizar este trabalho em um lugar tão maravilhoso como o Pantanal;

... ao meu co-orientador Dr Ubiratan Piovezan pelos ensinamentos do campo e apoio para concretizar a execução deste trabalho;

... aos funcionários da Fazenda Nhumirim e Embrapa Pantanal que com sua simplicidade colaboraram de forma indescritível para o sucesso deste trabalho;

... à minha namorada, amiga, companheira e conselheira Atoa por todo o apoio, carinho, compreensão e dedicação ao nosso relacionamento;

... à minha segunda família, a República Nazarena, que torna cada passo em Jaboticabal mais especial. Obrigado Sandra, Quaiada, Gozado, Ferruge, Pará e Sumô;

... aos meus amigos de infância Rodrigo e Felipe que não deixou a distância destruir os laços de fidelidade e companheirismo da nossa amizade;

... aos meus grandes amigos Rabiola, Piciroca, Marlizi, Onçona, Mimetí e Spinha que me ajudaram em todos os aspectos desde o início de nossa amizade;

... aos membros do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos pela colaboração diária em minha formação, em especial a Ana, Kokotinha, Maumau e Pedro pela ajuda durante o projeto;

... a FAPESP pelo apoio financeiro na realização do projeto;

... e a todos aqueles que não pude citar mas que participaram desta conquista.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	08
SUMMARY.....	09
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 O veado-campeiro <i>Ozotoceros bezoarticus</i>	13
2.2 Gestação em Cervídeos	17
2.3 Monitoramento endócrino não-invasivo	19
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 - Área de estudo	22
4.3 - Captura dos animais para colocação dos radiotransmissores.....	23
4.4 - Acompanhamento mensal dos animais e colheita das amostras	31
4.5 - Gestação	33
4.6 - Preparação das amostras de fezes	33
4.7 - Extração dos metabólitos fecais	33
4.8 - Dosagens hormonais	34
4.9 Diagnóstico de Gestação.....	35
4.10 - Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 - Acompanhamento mensal dos animais e colheita das amostras	36

5.3 – Caracterização hormonal da Gestação.....	39
5.4- Diagnóstico de Gestação.....	43
5.5 – Outras fêmeas marcadas.....	44
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Fêmea de veado-campeiro <i>Ozotoceros bezoarticus</i> no Pantanal.	14
Figura 2 – Macho de veado-campeiro <i>Ozotoceros bezoarticus</i> no Pantanal.	14
Figura 3 – Distribuição original e atual de <i>Ozotoceros bezoarticus</i> (Adaptado de GONZÁLEZ et al., 2010).	15
Figura 4 – Pesagem de fêmea de veado-campeiro (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>) no Pantanal, em Julho de 2008.	24
Figura 5 – Biometria de uma fêmea de veado-campeiro (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>) no Pantanal, em Julho de 2008.	25
Figura 6 – Identificação com brinco de uma fêmea de veado-campeiro (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>) no Pantanal, em Julho de 2008.	25
Figura 7 – Realização de diagnóstico de gestação empregando ultrassonografia (Ultrassom modelo Scanner 100lc, Pie Medical) em fêmea de veado-campeiro (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>) no Pantanal, em Julho de 2008.	26
Figura 8 – Colocação do colar radiotransmissor em uma fêmea de veado-campeiro (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>) no Pantanal, em Julho de 2008.	26
Figura 9 – Fêmea de veado-campeiro (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>) após os procedimentos de colheita de material biológico, identificação e colocação de colar radiotransmissor, Pantanal, Julho de 2008.	27
Figura 10 – Fêmea de veado-campeiro (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>) equipada com colar radiotransmissor ATS® modelo G2210 no Pantanal Sul-Matogrossense, em Novembro de 2008.	31
Figura 11 – Pesquisador utilizando equipamento de receptor de sinais de colares radiotransmissores (Telonics TR2) no Pantanal.	32

- Figura 12 – Fêmea de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) defecando. Ao fundo fêmea de veado-campeiro amamentando seu filhote. Detalhe da aparência das fezes ao serem encontradas no solo. Pantanal, Novembro de 2008. 32
- Figura 13 – Número de nascimentos nos meses de agosto, setembro e outubro em veados-campeiros equipados com colar radiotransmissor no Pantanal. 38
- Figura 14 – Concentrações de mensais progesterinas fecais antes (azul), durante (verde) e depois (amarelo) da gestação em veados-campeiros. 40
- Figura 15 – Concentrações médias de progesterinas fecais mensais antes, durante e depois da gestação em veados-campeiros. 41
- Figura 16 – Concentração de progesterinas fecais (média \pm EPM) nos diferentes períodos da gestação de veado-campeiro. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 43
- Figura 17 – Concentrações de progesterinas fecais mensais durante o ano de 2009 em veados-campeiros. 45
- Figura 18 – Concentrações médias de progesterinas fecais mensais antes, durante e depois da gestação em veados-campeiros, incluindo as fêmeas marcadas que não foi observada a presença de filhotes. 46
- Figura 19 – Concentração de progesterinas fecais (média \pm EPM) nos diferentes períodos da gestação de veado-campeiro, incluindo as fêmeas marcadas que não foi observada a presença de filhotes. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 46

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Dados referentes à anestesia das fêmeas de veado-campeiro (Ozotoceros bezoarticus) no Pantanal em Julho de 2008.	29
Tabela 2 – Dados da localização da captura, da frequência do colar radiotransmissor colocado, do peso, da idade estimada e do resultado do exame ultrassonográfico das fêmeas de veado-campeiro (Ozotoceros bezoarticus) no Pantanal em Julho de 2008.	30
Tabela 3 – Dados de Observação de filhotes das fêmeas de veado-campeiro (Ozotoceros bezoarticus) marcadas no Pantanal no ano de 2008	37
Tabela 4 – Dados de Observação de filhotes das fêmeas de veado-campeiro (Ozotoceros bezoarticus) marcadas no Pantanal Sul-Matogrossense no ano de 2009.....	37
Tabela 5 – Subespécie, Local, Época de Nascimento, Pico de Nascimento de Veado-Campeiro (Ozotoceros bezoarticus).....	38

PERFIL DE PROGESTINAS FECAIS DURANTE A GESTAÇÃO DE VEADO-CAMPEIRO (*Ozotoceros bezoarticus*) NO PANTANAL.

RESUMO – A constante ameaça às populações de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) faz deste cervídeo uma espécie ameaçada de extinção, trazendo à tona uma necessidade eminente de mais estudos, principalmente relacionado à biologia e fisiologia reprodutiva. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: definir o padrão de excreção de progestágenos fecais durante a gestação do veado-campeiro e validar possível método não-invasivo para diagnóstico de gestação da espécie, com uso de análises endócrinas. Para isso, onze fêmeas da espécie foram capturadas, marcadas e receberam colares radiotransmissores no Pantanal, região da Nhecolândia. Elas foram acompanhadas mensalmente e tiveram suas fezes colhidas para caracterização hormonal da gestação, entre o período de agosto de 2008 a novembro de 2009. Foi observada a ocorrência de parto em apenas sete fêmeas, as quais foram utilizadas na caracterização endócrina da gestação. As dosagens das progestinas fecais foram feitas por ensaio imunoenzimático. Os nascimentos observados ocorreram entre agosto e outubro, com pico entre agosto e setembro. Os níveis das progestinas fecais durante o início da gestação foram semelhantes aos períodos não-gestantes, com aumento progressivo a partir do segundo terço da gestação até o momento do parto, decaindo após esse período aos níveis não-gestantes. Os níveis de progestinas fecais acima de 6000 ng/g de fezes são sugestivos de gestação.

Palavras-chave: Veado-campeiro, *Ozotoceros bezoarticus*, gestação, monitoramento não-invasivo, reprodução.

PROFILE OF FECAL PROGESTINS DURING PAMPAS DEER (*Ozotoceros bezoarticus*) GESTATION IN PANTANAL

SUMMARY: The constant risk of pampas deer populations (*Ozotoceros bezoarticus*) makes these threatened specie, bringing an eminent necessity of more studies, mainly related to biology and reproductive physiology. Being thus, the objectives of this work were: obtain the profile of fecal progestins excretion during the pampas deer gestation and to validate a possible noninvasive diagnosis method of gestation for the species, using endocrine analysis. For this, eleven females had been captured, marked and received necklaces radiotransmitters in Pantanal, region of Nhecolândia. They had been followed and their excrements were collected monthly for hormonal characterization between August, 2008 - November, 2009. Was observed the occurrence of birth in only seven females, which had been used in the endocrine characterization of gestation. The levels of fecal progestins during the beginning of gestation had been similar to those at no-gestational periods, with gradual increase from the second part of gestation until the moment of birth, decaying after this period to no-gestation levels. The levels of fecal progestins above 6000 ng/g of excrements are suggestive of gestation.

Keywords: Pampas deer, *Ozotoceros bezoarticus*, gestation, noninvasive fecal monitoring, reproduction.

1. INTRODUÇÃO

O veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) é uma das oito espécies de cervídeos reconhecidas no Brasil. Teve originalmente distribuição ampla, ocupando ambientes abertos que incluíam pastagens, pampas e o cerrado brasileiro entre 5° e 41° de latitude sul, desde os primeiros desníveis do sistema andino até a costa do Atlântico (DUARTE, 2006; GONZÁLEZ et al., 2010).

Os efeitos das atividades de caça associados à introdução de animais domésticos, destruição, fragmentação e alteração na qualidade do habitat são causas potenciais de ameaças às populações de veado-campeiro no Brasil, com destaque para as regiões sul e sudeste nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, onde é classificado como criticamente em perigo. Na lista da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*) está classificado no apêndice I e é tratado em nível mundial e no Brasil como quase ameaçado (MERINO et al., 1997; DUARTE, 2006; TIEPOLO & TOMAS, 2006).

Devido a essas pressões, populações de veado-campeiro tendem a ficar isoladas, impedindo a ocorrência de fluxo gênico, aumentando endogamia e contribuindo para perda de diversidade genética, tornando as populações muito sensíveis a catástrofes e alterações ambientais (MERINO et al., 1997; GONZÁLEZ, 1998). Dentro desse contexto é de extrema importância a instituição de programas para conservação do veado-campeiro e para isso, são necessários estudos básicos sobre a espécie. Dentre eles, a biologia reprodutiva, que fornece ferramentas para a utilização de técnicas de reprodução assistida, aumento da quantidade de animais cativos e até

mesmo a criopreservação de seus gametas e embriões, promovendo a manutenção da variabilidade genética da espécie (DUARTE & GARCIA, 1995; BAINBRIDGE et al., 1999; WILDT & WEMMER, 1999; COMIZZOLI et al., 2000).

Os conhecimentos a respeito dos aspectos reprodutivos do veado-campeiro são escassos, resumindo-se principalmente a dados obtidos por meio de estudos comportamentais e não de estudos direcionados à reprodução. Porém, para a utilização de técnicas de reprodução assistida é necessário grande conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva destes animais (COMIZZOLI et al., 2000). No que tange à fêmea, dados sobre sazonalidade, atividade ovariana e gestação são fundamentais para melhor entendimento da fisiologia reprodutiva da espécie (DUARTE & GARCIA, 1995).

Esses dados podem ser obtidos com maior confiabilidade através do monitoramento endócrino dos animais, sendo um importante instrumento para a avaliação do sucesso reprodutivo, da dinâmica populacional e da saúde da população, podendo identificar problemas na concepção, perda embrionária e aborto (WASSER et al., 1995; BORJESSON et al., 1996).

Os métodos tradicionais de monitoramento da fisiologia reprodutiva em espécies domésticas são inapropriados para espécies selvagens, principalmente as que estão sob ameaça. Isso porque a mensuração de esteróides plasmáticos requer contenção para colheita de amostras e as várias contenções necessárias de um mesmo indivíduo tornam impraticáveis os estudos endócrinos, especialmente em animais de vida livre (LASLEY & SHIDELER, 1993; PICKARD et al., 2001).

Já os métodos não-invasivos de mensuração de hormônios esteróides são os mais indicados para as espécies selvagens, pois se baseiam na utilização de materiais como fezes, urina ou saliva. Estes dispensam contenção para colheita de amostras contínuas, evitam situações de estresse e a necessidade de contenção química, fatores que podem alterar os níveis hormonais, comprometendo a confiabilidade nos resultados obtidos (HAMASAKI et al., 2001; MONFORT, 2002; SCHOENECKER et al., 2004).

O estudo da fisiologia reprodutiva utilizando monitoramento endócrino não-invasivo vem sendo feito com sucesso em muitas espécies de animais selvagens, inclusive para o monitoramento da gestação por meio de progestágenos fecais. Sendo assim, o presente estudo pretende contribuir para melhor compreensão dos aspectos ligados a reprodução de cervídeos, principalmente aqueles relacionados à gestação do veado-campeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O veado-campeiro *Ozotoceros bezoarticus*

O veado-campeiro é um cervídeo de porte médio, pesando entre 20 e 40 kg, com grande variação de estrutura corporal entre indivíduos e populações. Atualmente, cinco subespécies são reconhecidas: *Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*, *O. b. celer*, *O. b. leucogaster*, *O. b. arerunguaensis*, *O. b. uruguayensis*. Sua cor básica é a baia, com variação de tonalidades entre as subespécies. A parte superior da cauda e focinho são negros, enquanto que a face interna das orelhas, região lateral do focinho, periocular, submandibular e toda a região ventral, incluindo a cauda, são brancas (Figura 1). Apenas os machos possuem chifres, normalmente com três ramos (Figura 2), porém não é incomum indivíduos com número maior de ramos (DUARTE, 2006; GONZÁLEZ et al., 2010).

Sua distribuição original ocupava a porção central da América do Sul, entre 5° e 41° de latitude sul, em ambientes formados por campos abertos, pampas e cerrado, de forma abundante e difundida. Porém, no início do século XX uma queda nestas populações começou a ser noticiada. Os efeitos das atividades de caça associados à introdução de animais domésticos, destruição, fragmentação e alteração na qualidade do habitat e principalmente a expansão agropecuária foram os principais motivos que levaram a uma diminuição drástica de seu espaço (MERINO et al., 1997; DUARTE, 2006; GONZÁLEZ et al., 2010).



Figura 1 - Fêmea de veado-campeiro *Ozotoceros bezoarticus* no Pantanal.



Figura 2 - Macho de veado-campeiro *Ozotoceros bezoarticus* no Pantanal.

Atualmente o veado-campeiro ocupa na Argentina uma área nas províncias de Buenos Aires, Corrientes, Santa Fé e San Luis; na Bolívia há pequena população ao sudoeste no Parque Nacional Noel Kempff Mercado; no Paraguai a espécie está próxima a extinção, se resumindo a uma pequena população no norte de Concepción; no Uruguai as populações estão isoladas em duas áreas principalmente, no estado de Salto ao noroeste do país e mais ao sudeste no estado de Rocha (GONZÁLEZ et al., 2010). Sua distribuição geográfica no Brasil corresponde atualmente ao Centro de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Sul do Pará e Rio Grande do Sul (DUARTE, 2006). Na Figura 3 encontram-se os mapas com a marcação da distribuição original e atual do *Ozotoceros bezoarticus*, adaptado de GONZÁLEZ et al. (2010).

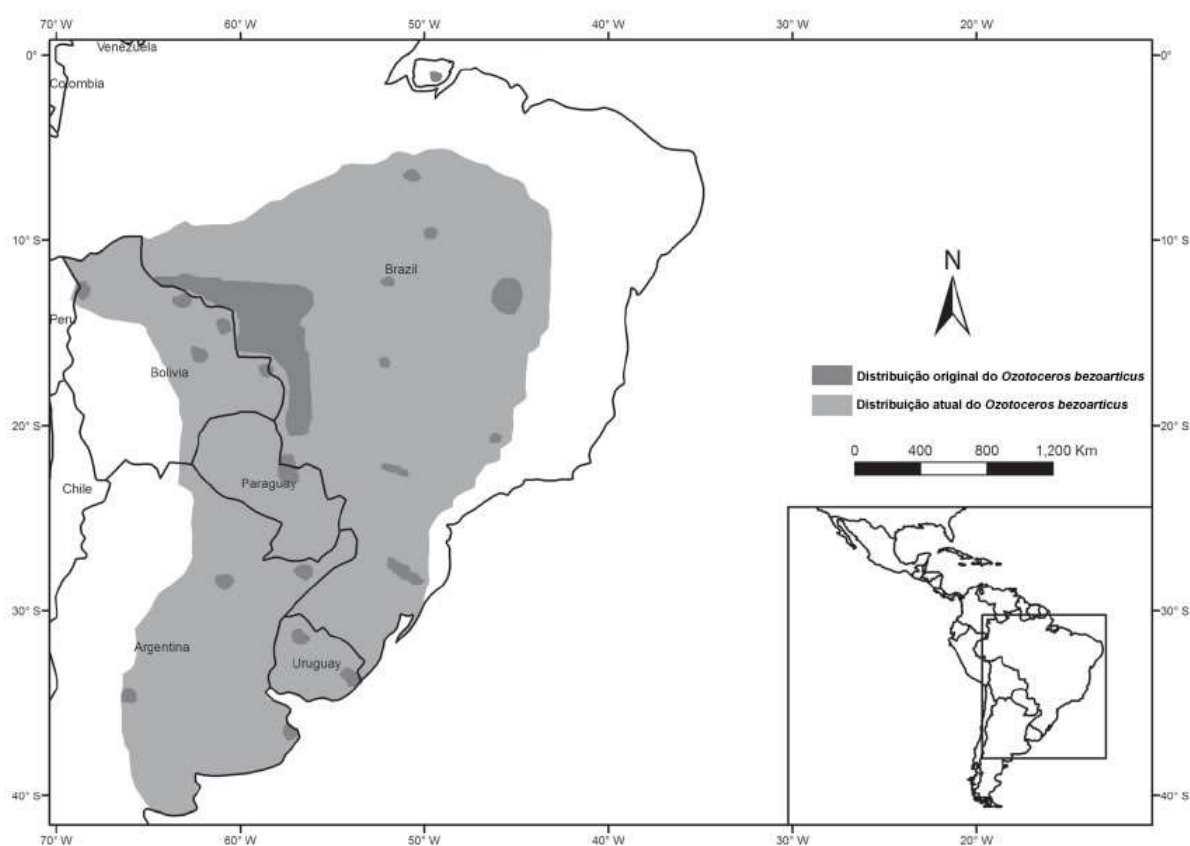


Figura 3 - Distribuição original e atual de *Ozotoceros bezoarticus* (Adaptado de GONZÁLEZ et al., 2010).

Com relação à reprodução, sabe-se que as fêmeas são poliétricas sazonais com ciclos estrais de aproximadamente 21 dias, gestação de aproximadamente sete meses e época de nascimento variando conforme a localidade (DUARTE & GARCIA, 1995; MERINO et al., 1997).

No Brasil, esta época de nascimento acontece principalmente entre os meses de agosto e novembro, com pico entre setembro e outubro e com registros esporádicos nos outros meses do ano (REDFORD, 1987; LEEUWENBERG & LARA RESENDE, 1994; RODRIGUES, 1996; PINDER, 1997; NETTO, 1997; BRAGA, 2004; LACERDA, 2008). No Uruguai, as populações relictuais de Salto e de Rocha apresentam o nascimento da maioria de seus filhotes entre outubro e dezembro, mas com nascimentos ocasionais em outros períodos (JACKSON et al., 1980; GONZÁLEZ, 1994; LOMBARDI et al., 1995). Na Argentina os nascimentos são reportados ao longo do ano todo, com um pico entre setembro e outubro (JACKSON & LANGGUTH, 1987; GIMENEZ DIXON, 1991; MERINO & MOSCHIONE, 1995). Os fatores que envolvem esta certa sazonalidade reprodutiva são pouco conhecidos, uma vez que os dados provenientes da reprodução são em sua maioria oriundos de estudos comportamentais (DUARTE & GARCIA, 1997).

As fêmeas de veado-campeiro, durante o início da gestação mantêm suas atividades normalmente, prolongando períodos de descanso progressivamente à partir do quarto e quinto mês de gestação e, próximo ao parto, a fêmea se afasta do grupo, permanecendo isolada por vários dias até o momento do nascimento do filhote. O filhote é mantido em lugar seguro, sendo alimentado frequentemente até por volta de quatro meses, quando acontece o desmame e a fêmea já está apta para entrar novamente em estro (GONZÁLEZ et al, 2010).

Em outro estudo mais aplicado à reprodução, os comportamentos reprodutivos de machos de veado-campeiro foram correlacionados aos seus níveis hormonais de testosterona fecal, apresentando dois picos, o primeiro entre Dezembro e Janeiro relacionado ao comportamento de *flehmen*: cheirar a região anogenital, cheirar a urina, perseguir e montar na fêmea, e um segundo pico relacionado à marcação com a

glândula de odor entre Julho e Setembro. Neste mesmo estudo os níveis de testosterona fecais foram também relacionados ao ciclo de chifres, sendo encontradas baixas concentrações relacionadas aos períodos de ausência e crescimento do chifre, e altas concentrações no período onde o chifre está sem o velame (PEREIRA et al., 2005).

2.2 Gestação em Cervídeos

A gestação é o período de desenvolvimento embrionário e fetal intra-uterino e está relacionado com a nutrição do feto em desenvolvimento e com as adaptações maternas para tal finalidade, compreendendo o intervalo entre o acasalamento fértil e o parto (JAINUDEEN & HAFEZ, 2004b).

A duração da gestação é determinada geneticamente, mas pode ser influenciada por fatores maternos (ex. idade da mãe), fetais (ex. número de filhotes, sexo), genéticos (ex. espécie, subespécie, genótipo fetal) e ambientais (ex. nutrição, fotoperíodo, temperatura ambiental) (JAINUDEEN & HAFEZ, 2004b). Nos cervídeos esta duração possui variação ampla entre as espécies, devido à alta diversidade morfológica e fisiológica interespecífica, onde podemos observar gestações mais curtas em espécies menores como *Mazama gouazoubira* e *O. bezoarticus* (7 meses) e gestações mais longas em espécies maiores como o *Blastocerus dichotomus* (aproximadamente 9 meses) (FRADRICH, 1995; MERINO et al., 1997; PEREIRA et al., 2006).

A gestação é caracterizada, endocrinologicamente, pelo aumento dos níveis de progesterona, inicialmente causado pela manutenção do corpo lúteo que suprime o início de um novo ciclo estral. Sendo assim, a progesterona é o hormônio fundamental para manutenção da prenhez, que, além de impedir a continuidade do ciclo, prevenir a contratilidade uterina e controlar a secreção das gonadotrofinas, também é responsável por estimular as glândulas endometriais a secretarem nutrientes essenciais ao embrião (CUNNINGHAM, 2004).

Para algumas espécies de cervídeos, a estrutura mais importante na secreção de progesterona é o corpo lúteo, sendo os níveis correlacionados ao número de fetos produzidos e, conseqüentemente, ao número de corpos lúteos formados. Nestes casos, a concentração permanece constante durante toda a gestação com um papel secretório secundário por parte da placenta, como acontece com o *Odocoileus virginianus*, *Rangifer tarandus* e pelo menos no início da gestação em *Cervus elaphus* (PLOTKA et al., 1982; ASHER et al., 1996; FLOOD et al., 2005).

Para outras espécies de cervídeos, a secreção de progesterona pela placenta é fundamental, provocando um aumento significativo nos níveis esteroidais a partir do segundo trimestre da gestação. A produção de progesterona é mais eficiente por parte dos tecidos luteais comparada ao da placenta no início da gestação, quando esta fonte de síntese e secreção é limitada devido à pequena massa placentária (FLOOD et al., 2005).

Porém, a partir do meio da gestação a massa placentária se torna maior, provavelmente tornando-se uma fonte fisiologicamente significativa de progesterona, elevando os níveis com correlação positiva ao tamanho do concepto em alguns cervídeos como *Capreolus capreolus* (SEMPERE, 1977; FLOOD et al., 2005).

Esta estreita relação entre progesterona e gestação tem proporcionado o uso das concentrações de tal hormônio como diagnóstico indireto de gestação. Embora seja um método não-específico para prenhez, a dosagem de progesterona pode ser utilizada como um teste diagnóstico devido à permanência do corpo lúteo durante o início da gestação em quase todos os mamíferos, sendo atualmente utilizado de forma ampla para este fim em animais domésticos (JAINUDEEN & HAFEZ, 2004). Em cervídeos, a dosagem dos níveis de progestinas para diagnóstico de gestação já foi utilizado para várias espécies como *Blastocerus dichotomus*, *Capreolus capreolus*, *Cervus elaphus nelsoni*, *Cervus elaphus nannodes*, *Cervus eldi thamin*, *Cervus nippon*, *Dama dama*, entre outras (SEMPERE, 1977; MONFORT et al., 1990; WHITE et al., 1995; GARROT et al., 1998; STOOPS et al., 1999; WILLARD et al., 1998; HAMASAKI et al., 2001; POLEGATO, 2008).

2.3 Monitoramento endócrino não-invasivo

O estudo da fisiologia reprodutiva em espécies selvagens é, em sua grande maioria, limitado, devido aos problemas associados às colheitas repetidas para dosagem hormonal, tradicional neste tipo de estudo em animais domésticos. Dentro deste contexto, a utilização de métodos não-invasivos de monitoramento endócrino é mais apropriada ao estudo de espécies selvagens, principalmente os cervídeos, por suas características de alta susceptibilidade ao estresse.

Os métodos não-invasivos de monitoramento endócrino têm como premissa a utilização de amostras de excretas, secreções ou tecidos do organismo. Isso minimiza o impacto causado ao animal quando a colheita da amostra é realizada (BUCHANAN & GOLDSMITH, 2004), pois dispensam contenção para colheita de amostras contínuas, evitam situações de estresse e necessidade de contenção química fatores que, à longo prazo, podem alterar os níveis hormonais, comprometendo a confiabilidade dos resultados obtidos (HAMASAKI et al., 2001; MONFORT, 2002; SCHOENECKER et al., 2004, HERNÁNDEZ-JÁUREGUI et al., 2005).

O método não-invasivo mais utilizado para o acompanhamento hormonal em animais selvagens é a análise de hormônios fecais (HERNÁNDEZ-JÁUREGUI et al., 2005). Os esteróides sintetizados pelas gônadas e glândulas adrenais são metabolizados pelo fígado e excretados pela bile atingindo as fezes, sendo a proporção destes hormônios fecais dependente da espécie animal (MONFORT, 2002). As vantagens do uso das fezes com o intuito de estudar a reprodução e etologia são a fácil obtenção, simples manuseio, conservação e transporte das amostras, redução dos riscos causados pela contenção do animal e maior confiabilidade dos resultados devido à ausência de estresse (KORNDÖRFER, 1996; SCHAWARZENBERGER et al., 1996). Além disso, possibilita a condução de estudos em ambientes naturais, podendo a colheita ser feita do solo, sem apresentar riscos para os animais ou para o pesquisador, nas mais diferentes condições, sem necessidade de grandes quantidades, uma vez que os esteróides se distribuem uniformemente nas fezes dos ruminantes, sendo

necessário apenas pequena amostra para acurada caracterização do estado endócrino e fisiológico (HODGES, 1996; PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; MORROW & MONFORT, 1998). Mas, o uso das fezes também possui desvantagens, como a degradação dos esteróides por bactérias a partir de 12 h após a defecação, influência do tempo de defecação nos resultados, e as amostras de fezes indicarem níveis de hormônio acumulados por um período longo, o que dificulta o estudo de momentos fisiológicos pontuais (SCHWARZENBERGER et al., 1996; GRAHAM, 2001; BUCHANAN & GOLDSMITH, 2004).

Tendo como exemplo a aplicabilidade do método não-invasivo de monitoramento endócrino, o estudo da fisiologia da gestação vem sendo realizado com sucesso em muitas espécies. Em ungulados este método já foi utilizado para estudar o *Bison bison*, *Gazella dama mhor* e *Ovis canadensis* (KIRKPATRICK et al., 1992; PICKARD et al., 2001; SHOENECKER et al., 2004). Também em cervídeos como *Axis axis*, *Cervus elaphus nannodes*, *Cervus nippon*, *Mazama gouazoubira* e *Odocoileus virginianus* (SHIDELER, 2000; HAMASAKI et al., 2001; MARISA et al., 2001; PEREIRA et al., 2006; UMAPATHY et al., 2007).

Além do conhecimento aplicado à fisiologia da gestação, o monitoramento dos hormônios esteróides envolvidos no processo reprodutivo utilizando métodos não invasivos, pode ser utilizado para identificação de causas de inatividade ou hiperatividade reprodutiva; identificação de patologias; identificação do início da atividade esteroidogênica das gônadas e assim a puberdade. Também permite a identificação da ocorrência de sazonalidade; obtenção dos dados sobre a duração do ciclo estral, estro, fase inter-luteal e fase luteal não-gestante; avaliação da resposta ovariana ao tratamento exógeno com gonadotropinas usado em reprodução assistida; estimativa do parto; caracterização do período pós-parto; e acessibilidade dos níveis fisiológicos de estresse, como método para avaliar e melhorar o ambiente, manejo e bem-estar do animal, visando potencializar a reprodução (BROWN & WILDT, 1997; CRISTOFOLETTI et al., 2009).

3. OBJETIVOS

- Definir o padrão de excreção de progestágenos fecais durante a gestação do veado-campeiro;
- Validar um método não-invasivo para diagnóstico de gestação na espécie, com uso de análises endócrinas;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Área de estudo

A área de estudo incluiu as fazendas Nhumirim (campo experimental da Embrapa Pantanal), Porto Alegre, Dom Valdir e Alegria, localizadas na região central do Pantanal Sul-Matogrossense, conhecida como Nhecolândia (18° 59' 15" S; 56° 37' 03" N), município de Corumbá, Mato Grosso do Sul. A Nhecolândia é caracterizada por um regime de baixa inundação com altura de 30 - 40cm e duração média de 3 a 4 meses (SORIANO et al., 1997), decorrente principalmente do acúmulo de água de chuva na área (HAMILTON et al., 1996). O clima da região é caracterizado como quente e úmido, com chuvas abundantes entre outubro e março (precipitação média dos meses variando entre 150 e 300mm), e período de estiagem entre abril e setembro (com médias mensais inferiores a 100mm). A temperatura média é alta e a amplitude térmica da região é grande, com máximas de 40° C no verão e mínimas próximas de zero no inverno, quando ocorrem frentes frias vindas do sul (TARIFA, 1986). A região é caracterizada por solo arenoso e por mosaico de fisionomias determinadas pela topografia plana e pelos pulsos anuais de inundação. Os campos dominam áreas mais baixas e o cerrado e as florestas estacionais semidecíduais são comuns nas áreas mais elevadas (RATTER et al., 1988).

4.2 – Animais

Foram capturadas quinze fêmeas de veado-campeiro para a realização do experimento. Destas fêmeas, quatro vieram a óbito, sendo no total utilizado apenas onze animais.

4.3 - Captura dos animais para colocação dos radiotransmissores

Quinze fêmeas de veado-campeiro foram capturadas baseando-se na técnica já utilizada no Pantanal (PIOVEZAN et al. 2006), sendo 11 delas na última semana de julho e 4 na primeira semana de outubro de 2008. A técnica de captura consistiu na localização do animal e aproximação por meio de movimentos lentos e circulares até uma distância aproximada de 15 metros ou menos. Foram utilizadas 4 técnicas de contenção: arma anestésica CAPCHUR, arma anestésica a gás pressurizado (Telinject), arma de lançamento de rede NETGUN e zarabatana. Os animais que estiveram posicionados lateralmente ao atirador e perto o suficiente receberam o dardo, no caso das armas anestésicas ou zarabatana, ou a rede no caso da NETGUN. O dardo carregava uma associação anestésica, sendo inicialmente a associação de 3 mg/kg de zoletil® (Virbac, França) e 1,5 mg/kg de xilazina (Rompun®, Bayer S.A., São Paulo/Brasil) e após a não obtenção de uma anestesia satisfatória (queda e recuperação tardia) foi alterado para a associação de 10 mg/kg de cetamina (Vetaset®, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge/USA) e 1,0 mg/kg de xilazina (Rompun®, Bayer S.A., São Paulo/Brasil). No caso dos animais capturados com a arma de lançamento de rede era procedida a aplicação intravenosa da associação anestésica após a contenção física do animal.

Alcançada a completa contenção química, os animais foram vendados e seus ouvidos tapados para redução de estímulos externos. O animal anestesiado era pesado (Figura 4), seus reflexos eram checados e, se necessário, corrigida a dose anestésica. Após estas etapas, iniciavam-se os procedimentos de biometria (Figura 5), colheita de material, marcação com os mesmos brincos utilizados para identificação de bovinos (Figura 6), diagnóstico de gestação (Figura 7), colocação

dos radiotransmissores (Figura 8) e fotografia para catalogação do acervo do NUPECCE (Figura 9).

Para o diagnóstico de prenhez realizou-se exame ultrassonográfico transabdominal posicionando o transdutor (convexo de 5,0 MHz) (Ultrassom modelo Scanner 100lc, Pie Medical) na parede abdominal ventral (Figura 7). As fêmeas capturadas que estavam prenhes e no último terço de gestação eram equipadas com colares radiotransmissores. Foram utilizados 6 radiocolares ATS® modelo G2210 e 6 radiocolares Telonics®.

Concluído esses procedimentos, todos os animais foram revertidos da anestesia com a aplicação de lombina (Cloridato de lombina a 5%) e acompanhados até recuperarem a posição quadrupedal.



Figura 4 – Pesagem de fêmea de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal, em Julho de 2008.



Figura 5 – Biometria de uma fêmea de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal, em Julho de 2008.



Figura 6 – Identificação com brinco de uma fêmea de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal, em Julho de 2008.



Figura 7 – Realização de diagnóstico de gestação empregando ultrassonografia (Ultrassom modelo Scanner 100lc, Pie Medical) em fêmea de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal, em Julho de 2008.



Figura 8 – Colocação do colar radiotransmissor em uma fêmea de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal, em Julho de 2008.



Figura 9 – Fêmea de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) após os procedimentos de colheita de material biológico, identificação e colocação de colar radiotransmissor, Pantanal, Julho de 2008.

4.3.1 – Primeira Etapa de Captura, Julho de 2008

A primeira etapa ocorreu na última semana de julho de 2008, com a captura de onze fêmeas adultas de veado-campeiro. O primeiro animal capturado (Brinco 001) sofreu uma fratura completa do fêmur esquerdo causado pelo impacto do dardo da arma anestésica CAPCHUR, necessitando no dia seguinte sua eutanásia. A partir dessa experiência, essa arma não foi mais utilizada para a captura de veado-campeiro pela nossa equipe e os métodos empregados para as outras capturas da primeira etapa foram com o uso de arma lançadora de rede NETGUN, arma anestésica a gás pressurizado ou zarabatana, o qual era escolhido conforme o comportamento do animal à aproximação da nossa equipe.

Ao encontrar uma fêmea em potencial, era avaliado seu comportamento frente à aproximação de nosso veículo e então escolhido o método de captura. Dentro dos métodos utilizados, o mais empregado foi a zarabatana.

Vários protocolos anestésicos diferentes foram utilizados na contenção química devido a busca de uma anestesia mais estável e de melhor retorno.

Segue, na tabela 1, a descrição dos métodos utilizados, o protocolo anestésico e os dados sobre a anestesia.

A partir do momento em que a fêmea estava anestesiada, era iniciado o exame ultrassonográfico para o diagnóstico da prenhez e, se prenhe, era realizado o procedimento de instalação dos colares radiotransmissores. As 11 fêmeas capturadas na primeira etapa estavam em sua fase final de gestação. Segue, na tabela 2, dados de localização, frequência dos radiocolares, peso, idade estimada e diagnóstico de prenhez.

4.3.2 – Segunda Etapa de Captura, Outubro de 2008

Dois meses após a captura (setembro), a fêmea de brinco 004 veio a óbito por causa desconhecida. Frente ao pequeno tempo decorrido do início do experimento e, portanto antes da época de cópula, optou-se pela reposição deste animal com a captura de uma nova fêmea. Essa decisão, somada a aquisição de mais dois colares radiotransmissores, deram início à segunda etapa de captura.

Na segunda etapa de captura foi utilizada arma Telinject e zarabatana. Os dois primeiros animais foram capturados (Brinco 012 e Brinco 013) por meio da arma anestésica. Após um dia da captura do animal brinco 012, a fêmea foi encontrada predada, gerando a necessidade da captura de mais uma fêmea. Os outros 2 animais (Brinco 014 e Brinco 015) foram capturados com a zarabatana, sendo que nessa segunda etapa de captura, não foram realizadas colheita de material biológico, biometria e diagnóstico de gestação por exame ultrassonográfico devido a equipe estar restrita a duas pessoas apenas e sem os equipamentos necessários.

Tabela 1 – Dados referentes à anestesia das fêmeas de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal em Julho de 2008.

Fêmeas	Método de captura	Droga utilizada	Tempo aproximado		
			Aplicação até o Início	Procedimento	Total da Anestesia
001	CAPCHUR	29mg de Zoletil® IM; 67,5mg de Xilazina IM	33 min	2h e 50 min	2h e 53 min
002	Arma a Gás	90mg de Zoletil® IM; 45mg de Xilazina IM	28 min	1h e 28 min	2 h
003	NETGUN	45mg de Zoletil® IV; 30mg de Xilazina IV	8 min	1h e 26	5h e 50 min
004	Zarabatana	100mg de Quetamina IM;30mg de Xilazina IM	15 min	31 min	33 min
005	Zarabatana	80mg de Quetamina IM;36mg de Xilazina IM	6 min	34 min	36 min
006	Zarabatana	100mg de Quetamina IM;36mg de Xilazina IM	17 min	_____	_____
007	Zarabatana	80mg de Quetamina IM; 36mg de Xilazina IM	41 min	24 min	26 min
008	Zarabatana	140mg de Quetamina IM;16mg de Xilazina IM	13 min	40 min	42 min
009	Arma a Gás	150mg de Quetamina IM;30mg de Xilazina IM	16 min	1h e 4 min	1h e 6 min
010	NETGUN	150mg de Quetamina IV; 30mg de Xilazina IV	1 min	34 min	36 min
011	Zarabatana	160mg de Quetamina IM;36mg de Xilazina IM	15 min	30 min	32 min

Tabela 2 – Dados da localização da captura, da frequência do colar radiotransmissor colocado, do peso, da idade estimada e do resultado do exame ultrassonográfico das fêmeas de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal em Julho de 2008.

No. Do Brinco	Localização (UTM)			Frequência do Rádicolar	Peso	Idade estimada	Prenhez
001	21k	0526067	7896810	_____	_____	_____	Positivo
002	21k	0526444	7896793	151.953	28,2 kg	4 anos	Positivo
003	21k	0524353	7896710	150.982	32 kg	6 anos	Positivo
005	21k	0525395	7895033	151.941	28 kg	5 anos	Positivo
006	21k	0525385	7895036	150.170	28 kg	3 anos	Positivo
007	21k	0524057	7893494	150.030	22,5 kg	2 anos	Positivo
008	21k	0523472	7894791	150.190	28 kg	3 anos	Positivo
009	21k	0527047	7896914	150.550	27 kg	5 anos	Positivo
010	21k	0521049	7896913	150.970	32 kg	3 anos	Positivo
011	21k	0524555	7896354	150.020	28 kg	5 anos	Positivo

4.4 - Acompanhamento mensal dos animais e colheita das amostras

Os animais equipados com colares radiotransmissores foram acompanhados aproximadamente a cada 30 dias para colheita de fezes, entre agosto de 2008 e novembro de 2009, com o objetivo de acompanhar pelo menos uma gestação completa das fêmeas até o fim deste período.

As fêmeas equipadas com colar radiotransmissor (Figura10) eram localizadas com o uso de um receptor TR2 (Telonics) (Figura 11) e acompanhadas até ocorrer a visualização do filhote ou pelo tempo máximo de 4 horas, uma vez que a literatura relata uma amamentação a cada duas horas do filhote de veado-campeiro (MERINO et al., 1997). Neste período foram observadas as defecações (Figura 12), sendo uma delas colhidas amostras de fezes frescas. As fezes colhidas foram identificadas e armazenadas em sacos plásticos, submetidos à refrigeração (4°C) em um isopor com gelo reciclável até sua chegada à base de campo, onde foram congeladas em freezer e mantidas desta maneira até o processamento em laboratório.



Figura 10 – Fêmea de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) equipada com colar radiotransmissor ATS® modelo G2210 no Pantanal Sul-Matogrossense, em Novembro de 2008.



Figura 11 – Pesquisador utilizando equipamento de receptor de sinais de colares radiotransmissores (Telonics TR2) no Pantanal.



Figura 12 – Fêmea de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) defecando. Ao fundo fêmea de veado-campeiro amamentando seu filhote. Detalhe da aparência das fezes ao serem encontradas no solo. Pantanal, Novembro de 2008.

4.5 - Gestação

A ocorrência da gestação foi confirmada a partir da visualização da presença de filhote junto com a fêmea marcada. A gestação diagnosticada na captura não foi utilizada para a caracterização hormonal. Sendo assim, esperou-se nova gestação, e conseqüentemente, o nascimento de outro filhote no ano de 2009. O início da gestação foi considerado 210 dias anteriores à primeira observação deste novo filhote. As fêmeas que não apresentaram nascimento de filhote em 2009 não tiveram seus dados hormonais utilizados na caracterização endócrina da gestação, pois não era possível garantir a ocorrência de uma gestação completa durante o período do experimento.

4.6 - Preparação das amostras de fezes

As amostras de fezes foram secas em estufa à 57°C por tempo médio de 72 horas até sua secagem total. Segundo a literatura, o emprego deste método não provoca perdas consideráveis dos esteróides fecais e os níveis após a secagem também são melhorados, pois diminui a influência da água nas dosagens hormonais e favorece a homogeneização destas nos casos de disfunções gastroentéricas, como diarreia e constipação, além do que, as amostras processadas possuem a vantagem de serem mais fáceis e práticas para manusear (BAMBERG et al., 1991; BROWN & WILDT, 1997).

Após a secagem das amostras, estas foram trituradas até que se transformassem em um pó homogêneo.

4.7 - Extração dos metabólitos fecais

Os metabólitos foram extraídos das amostras fecais como descrito por Graham et al. (2001). Sucintamente, em 0,5g da amostra processada foi adicionado 5,0mL de metanol a 80%. A mistura foi agitada em vortex por 30

segundos, durante 12 horas em agitador horizontal (EV:020, EVLAB, Londrina/PR, Brasil) e novamente em vortex por 10 segundos. Após centrifugação a 377g por 20 minutos, o sobrenadante foi separado e armazenado em freezer à -20°C para posterior análise.

4.8 - Dosagens hormonais

Os extratos fecais tiveram as concentrações de progestinas mensuradas por ensaio imunoenzimático (EIA), sendo as dosagens realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Animal da FCAV/ UNESP Jaboticabal. Foi utilizado o anticorpo para progestinas CL425 (Quidel Corporation – San Diego – USA). A reatividade cruzada do anticorpo CL425 foi descrita por GRAHAM et al. (2001) como: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona) 100,0%; 4-pregnen-3a-ol-20-ona 188,0%; 4-pregnen-3b-ol-20-ona 172,0%; 4-pregnen-11a-ol-3,20-diona 147,0%; 5a-pregnan-3b-ol-20-ona 94,0%; 5a-pregnan-3a-ol-20-ona 64,0%; 5a-pregnan-3,20-diona 55,0%; 5b-pregnan-3b-ol-20-ona 12,5%; 5b-pregnan-3,20-diona 8,0%; 4-pregnen-11b-ol-3,20-diona 2,7%; 5b-pregnan-3a-ol-20-ona 2,5%; 5b-pregnan-3a,20a-diol(pregnanediol) <0,1%; outros metabólitos <0,1%. Esse anticorpo foi utilizado por apresentar alta reatividade cruzada com os metabólitos excretados nas fezes de *Ozotoceros bezoarticus* - 5 α - e 5 β - pregnanes (B. F. POLEGATO, dados não publicados). Todos os extratos fecais foram diluídos em tampão de diluição, inicialmente na diluição de 1:1024 e pequena parcela na diluição 1:2048.

A validação das dosagens hormonais foi realizada como descrito por BROWN et al. (2004), (1) pela significativa recuperação dos hormônios exógenos adicionados às amostras fecais devidamente diluídas ($y=1,146x-2,2552/ R^2=0,99$), o que determinou que nenhuma substância presente na amostra diluída (extrato fecal e tampão de diluição) interferiu na ligação do hormônio com o anticorpo do ensaio; (2) pela observação de uma disposição paralela entre a curva-padrão e a formada pelo pool de extratos fecais preparados por diluição seriada em tampão de diluição ($R^2=0,9916$), o que determinou que ambos os hormônios, o da curva-

padrão e o da amostra, se ligaram de forma similar ao anticorpo do ensaio e consequentemente, que os valores da curva padrão puderam ser utilizados como referência para os das amostras fecais; e (3) pela relevância fisiológica dos resultados obtidos quando comparados aos níveis de progesteronas presentes em machos e fêmeas. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram avaliados para dois controles internos (com alta e baixa concentração hormonal). Os coeficientes de variação intraensaio foram <10% para controles avaliados. Os coeficientes de variação interensaio foram de 12,2% (~35% de ligação e n=8 placas) controle de alta concentração e 14,0% (~75% de ligação e n=8 placas) controle de baixa concentração. As concentrações de progesteronas estão expressas em micrograma por grama de fezes secas ($\mu\text{g/g}$ fezes).

4.9 Diagnóstico de Gestação

O valor para realização do diagnóstico indireto da gestação através dos níveis hormonais de progesteronas fecais foi obtido através do teste de diferentes valores que obtivessem os melhores índices de sensibilidade e especificidade do diagnóstico. Sensibilidade é a capacidade que um teste apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos e especificidade é a capacidade que o teste apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente negativos (PINHO & MATTOS, 2002).

4.10 - Análise estatística

Os dados das fases da gestação estão apresentados como média \pm EPM. A comparação entre as diferentes fases antes, durante e pós gestação foram realizadas com o uso de análise de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey. As transformações sugeridas pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk também foram realizadas. Todas as análises foram feitas utilizando o programa MiniTab 1.4 (Minitab Inc., State College, PA, USA) e o nível de significância para todos os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Acompanhamento mensal dos animais e colheita das amostras

Logo após a captura, foi iniciado o acompanhamento e colheita de fezes das fêmeas marcadas. Foram colhidas amostras de fezes frescas, mensalmente, das doze fêmeas participantes.

Além da colheita de fezes observou-se a presença de filhotes junto às fêmeas. Seguem, na tabela 4, os meses da primeira observação dos filhotes do ano de 2008, sendo o nascimento estimado na quinzena anterior à observação, exceto o filhote da fêmea 010 que foi visto a primeira vez no provável dia de nascimento. As fêmeas 007, 014 e 015 não foram vistas junto com filhote até o final do ano de 2008, sugerindo aborto ou perda do filhote recém-nascido.

No segundo semestre de 2009 foi observada a presença de um novo filhote para sete fêmeas, o que representa uma segunda época de nascimentos desde o início do experimento. Na tabela 5 seguem os dados da segunda observação dos filhotes, sendo o nascimento estimado na quinzena anterior à observação, exceto aos filhotes das fêmeas 006 e 007 que foram vistos pela primeira vez na provável semana de nascimento. As fêmeas 005, 008, 011 e 014 não foram vistas junto com filhotes até o fim do experimento, podendo ter abortado ou perdido seus filhotes.

A partir das observações da presença de filhotes, podemos verificar uma maior concentração de nascimento no mês de agosto e setembro, com um número menor no mês de outubro (Figura 13). A sazonalidade da época de nascimento no veado-campeiro está intimamente relacionado com a localização da população e a subespécie

(UNGERFELD et al., 2008). Na Tabela 6 é possível comparar as diferentes épocas e picos de nascimento das subespécies de veado-campeiro.

Tabela 3 – Dados de Observação de filhotes das fêmeas de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) marcadas no Pantanal no ano de 2008.

Fêmea/ Mês	Agosto/08	Setembro/08	Outubro/08	Novembro/08
002			X	
003		X		
005			X	
006				X
008			X	
009		X		
010	X			
011				X

X = mês de observação

Tabela 4 – Dados de Observação de filhotes das fêmeas de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) marcadas no Pantanal Sul-Matogrossense no ano de 2009.

Fêmea/ Mês	Agosto/09	Setembro/09	Outubro/09	Novembro/09
002		X		
003			X	
006			X	
007			X	
009			X	
010		X		
015		X		

X = mês de observação

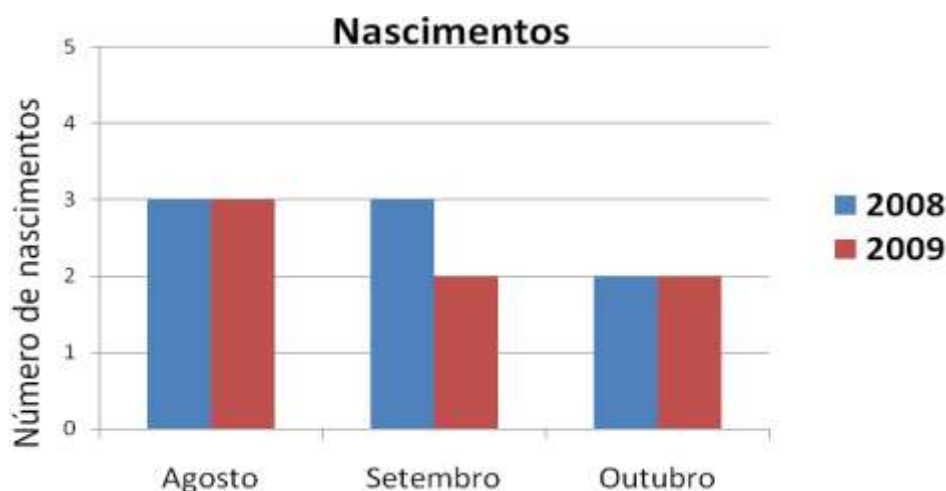


Figura 13 – Número de nascimentos nos meses de agosto, setembro e outubro em veados-campeiros equipados com colar radiotransmissor no Pantanal.

Tabela 5 – Subespécie, Local, Época de Nascimento, Pico de Nascimento de Veado-Campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*).

Subespécie	Local, País	Época de nascimento	Pico de Nascimento	Ref.*
<i>O. b. leucogaster</i>	Pantanal da Nhecolândia, Brasil	Ago – Out	Ago – Set	1
<i>O. b. leucogaster</i>	Pantanal da Nhecolândia, Brasil	Jul – Nov	Ago – Set	2
<i>O. b. leucogaster</i>	Pantanal de Miranda, Brasil	Ago – Out	Ago – Set	3
<i>O. b. bezoarticus</i>	Parque Nacional das Emas, Brasil	Ago – Out	Set – Out	4
<i>O. b. celer</i>	Bahia de Samborombón, Argentina	Ano todo	Out – Abr	5
<i>O. b. uruguayensis</i>	Rocha, Uruguai	Ano todo	Set – Dez	6
<i>O. b. arerunguaensis</i>	Salto, Uruguai	Ano todo	Set – Nov	7

*Referências: (1) Presente Estudo; (2) MERINO et al., 1997; (3) PINDER, 1992; (4) RODRIGUES, 1996 ;(5) MERINO & MOSCHIONE,1995; (6) e (7) GONZÁLEZ, 1994

5.3 – Caracterização hormonal da Gestação

Sete fêmeas tiveram a caracterização endócrina da gestação avaliada. Na figura 14 é possível observar os níveis de progestinas fecais mensais desde os três primeiros meses antes da gestação, os sete meses de gestação e o mês pós-parto. Estes períodos foram definidos a partir da observação do filhote, sendo este considerado o pós-parto, os sete meses anteriores como a gestação, e o oitavo, nono e décimo meses anteriores como os três meses anteriores à gestação. Podemos ver ainda que o mês que antecede a gestação (Mês -1) apresenta um pico nos níveis de progestinas fecais comparado aos primeiros meses da gestação, exceto a fêmea 003 que possui este pico no “Mês -2”. Este aumento dos níveis de progestinas fecais pode estar relacionado com o início da ciclicidade das fêmeas, caracterizado em outras espécies de cervídeos como um aumento repentino da progesterona a níveis maiores que os encontrados em fase lútea e em seguida o início dos ciclos estrais normais, sendo observado este perfil tanto em cervídeos sazonais como *Dama dama* e *Hydropotes inermis* (ASHER, 1985; MAUGET et al., 2007), como em *Mazama americana* iniciando a puberdade (CURSINO, dados não publicados). Sendo esta hipótese verdadeira, provavelmente as fêmeas de veado-campeiro ao primeiro ciclo estral são fertilizadas, devido a proximidade deste pico de progesterona com o início da gestação.

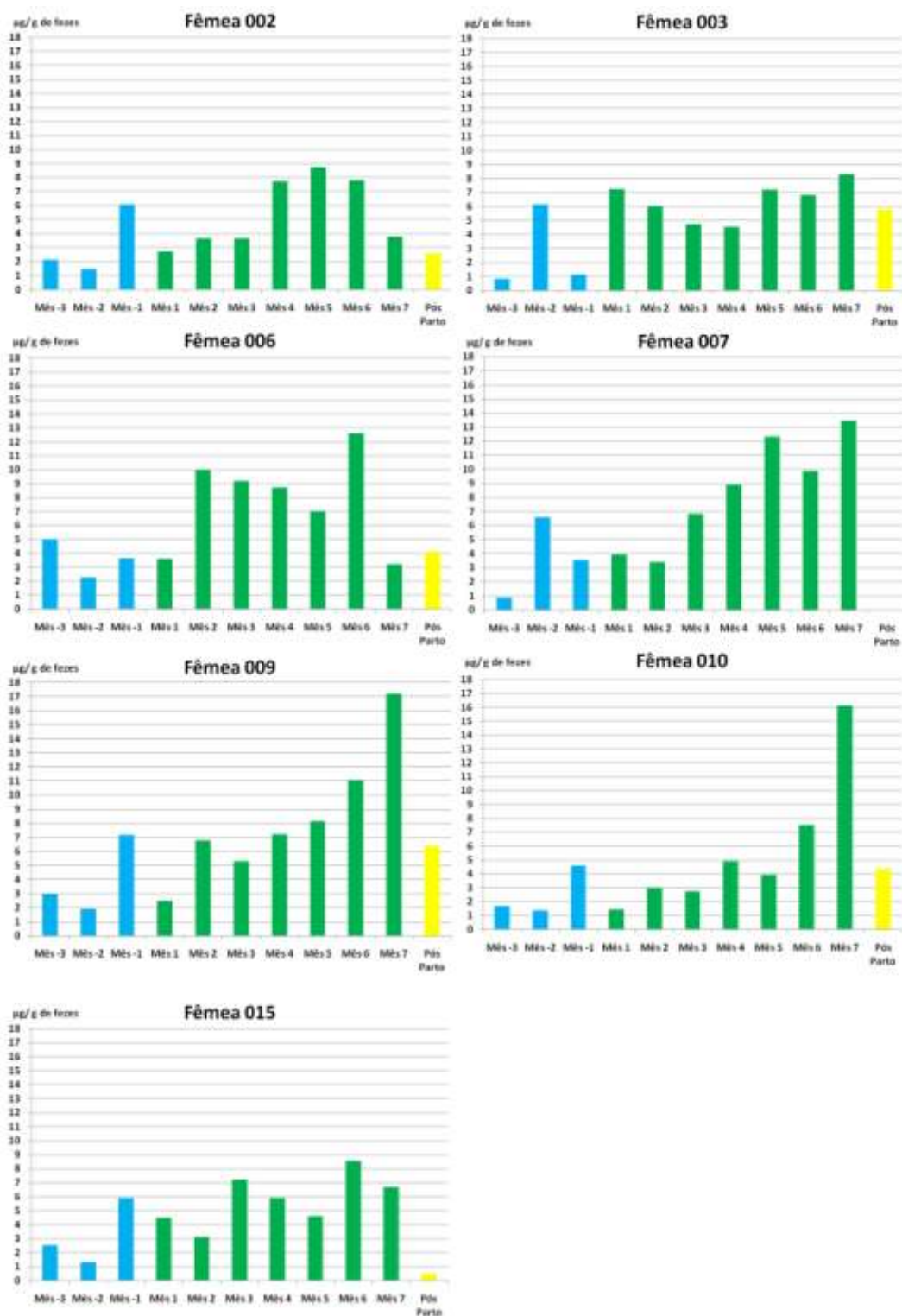


Figura 14 – Concentrações mensais de progesterinas fecais antes (azul), durante (verde) e depois (amarelo) da gestação em veados-campeiros.

Na figura 15, podemos observar a média mensal das fêmeas em cada mês relacionado com a gestação. É possível observar um aumento progressivo durante a gestação nos níveis de progesterinas fecais, principalmente após o segundo mês de gestação. Este aumento pode estar associado ao crescimento da massa placentária e conseqüentemente uma maior eficiência desta na secreção de esteróides, tornando-se fonte secretória principal da progesterona (FLOOD et al., 2005). O aumento na secreção da progesterona a partir da metade da gestação também é observada em outros ungulados como *Alces alces*, *Blastocerus dichotomus*, *Cervus elaphus nannodes*, *Gazella dama mhorh*, *Mazama gouazoubira*, *Odocoileus virginianus* e *Okapia johnston* (SCHWARZENBERGER et al., 1993; SCHWARTZ et al., 1995; KAPKE et al., 1999; STOOPS et al., 1999; PICKARD et al., 2001; PEREIRA et al., 2006; POLEGATO, 2008).

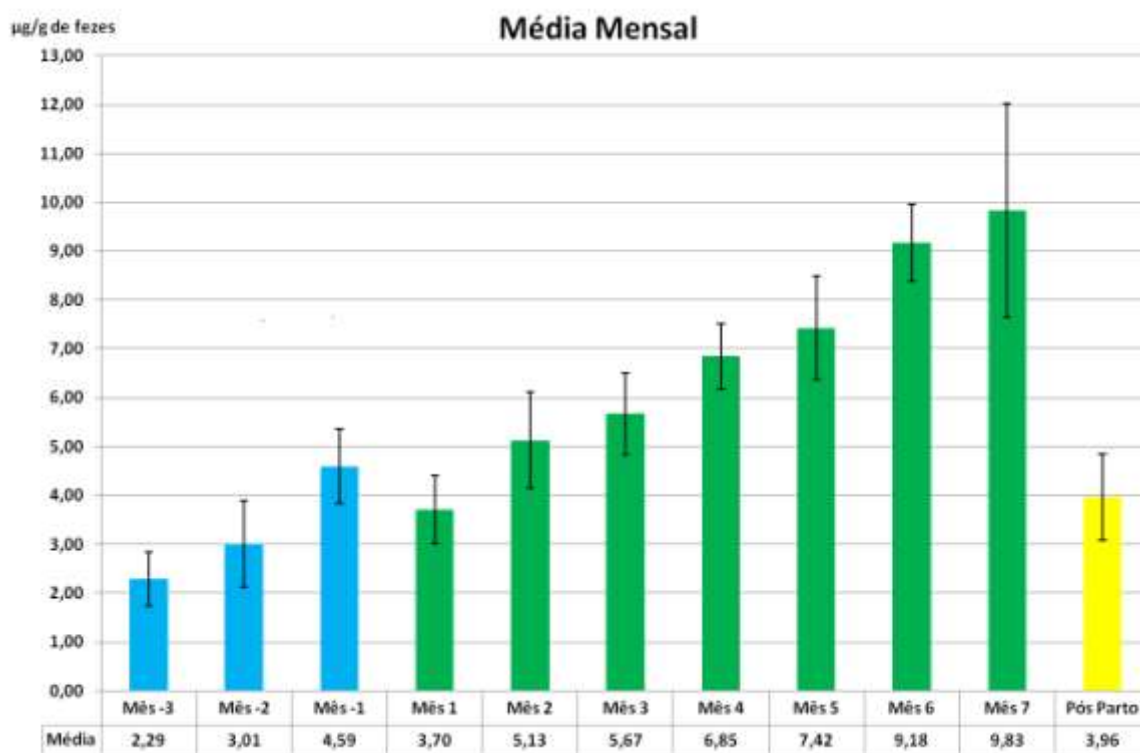


Figura 15 – Concentrações médias de progesterinas fecais mensais antes, durante e depois da gestação em veados-campeiros.

A fêmea 007 apresentou um nível muito elevado de progesterona no mês de observação do filhote (Pós Parto), 27,04 µg/g, provavelmente pela proximidade da ocorrência do parto, pois o filhote teria no máximo dois dias pelas características observadas. Por essa discrepância, este dado foi excluído da análise estatística e dos gráficos. Esse alto nível de progesterona próximo ao parto também foi observado em *Mazama gouazoubira*, onde os níveis de progesterona fecais começaram a declinar à partir do segundo dia pós-parto, voltando aos níveis basais próximo ao sétimo dia (PEREIRA et al., 2006). Isto também é descrito para outros herbívoros, nos quais os níveis de progesterona fecais não declinam até os valores basais antes de três dias pós-parto (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

O padrão de excreção de progesterona fecais foi semelhante para todas as fêmeas gestantes. Para melhor caracterização endócrina da gestação, todo o período avaliado endocrinamente foi dividido em cinco períodos: antes da gestação (Mês -3, -2 e -1), início da gestação (Mês 1 e 2), meio da gestação (Mês 3, 4 e 5), final da gestação (Mês 6 e 7) e pós-parto. Isto foi adotado nas análises estatísticas devido ao número reduzido de animais e a informação inexistente sobre dia de cópula e nascimento.

Sendo assim foi possível observar uma diferença dos níveis de progesterona fecais a partir do meio da gestação, onde os níveis praticamente dobraram com relação aos níveis antes da gestação e pós-parto, alcançando praticamente o triplo do valor destes níveis no final da gestação. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de progesterona fecais entre alguns períodos. Com base nestes dados foi possível diferenciar animais gestantes de não gestantes a partir 4^o mês de gestação, no entanto, foi impossível diferenciar animais no período antes e pós gestação dos animais no período inicial da gestação (Figura 16).

É possível associar os níveis do período antes da gestação à fase luteal do ciclo do veado-campeiro, uma vez que estes são próximos aos níveis do início da gestação. Essa característica já foi observada em outros ungulados como *Alces alces*, *Blastocerus dichotomus*, *Gazella dama mhorr*, *Giraffa camelopardalis rothschild* (SCHWARTZ et al., 1995, PICKARD et al., 2001; POLEGATO, 2008; LUEDERS et al.,

2009). Por causa desse perfil, dos níveis de progesteronas fecais na fase luteal serem comparáveis aos níveis da fase de início de gestação o diagnóstico da gestação não pode ser determinado por mensuração de progesteronas fecais de apenas uma amostra (DUMONCEAUX et al., 2006).

Assim, o diagnóstico de gestação feito a partir das dosagens hormonais pode ser direcionado a partir do meio da gestação para esta espécie.

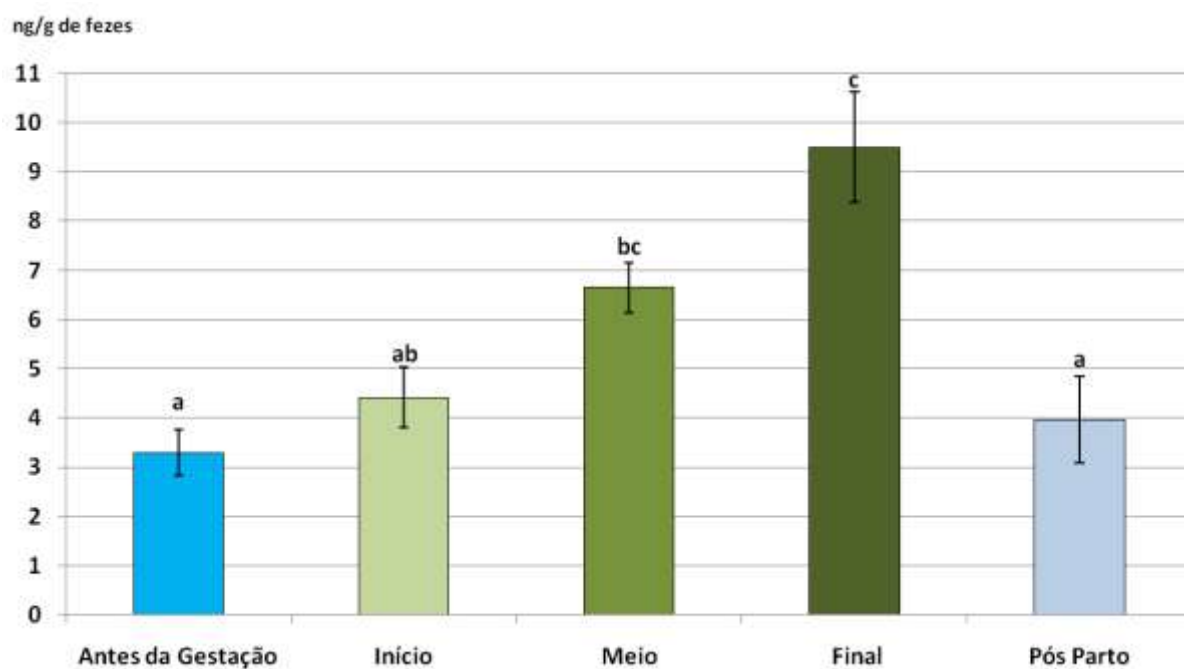


Figura 16 - Concentração de progesteronas fecais (média \pm EPM) nos diferentes períodos da gestação de veado-campeiro. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.4- Diagnóstico de Gestação

A partir do estudo dos resultados apresentados, a concentração de progesteronas fecais a partir de 6 $\mu\text{g/g}$ foi sugestiva de gestação. O diagnóstico a partir deste nível possui uma sensibilidade de 70% e especificidade de 80,7%, segundo cálculos sugeridos por PINHO e MATTOS (2002). Porém, este valor tem sua aplicabilidade reduzida ao utilizá-lo, pois gera uma taxa de falso negativo de 30% e falso positivo de 19%, segundo os cálculos de taxas de RENSHAW (1997). Estes resultados inviabilizam

a utilização deste método como diagnóstico de gestação não-invasiva utilizando uma única amostra de fezes de veado-campeiro, podendo ser utilizada como método auxiliar no diagnóstico da gestação, como é indicada sua utilização para espécie *Cervus elaphus nelsoni* (WHITE et al., 1995).

5.5 – Outras fêmeas marcadas

As outras fêmeas capturadas e monitoradas durante o período experimental, para as quais não foi observada a presença de filhotes, não foram utilizadas na caracterização hormonal da gestação (Fêmeas 005, 008, 011 e 014). Porém, as amostras colhidas foram analisadas e seus perfis durante o ano de 2009 estão apresentados na Figura 17.

Apesar de não ter sido observada a presença de filhote, estas fêmeas apresentaram um perfil das progesterinas fecais semelhante aos das fêmeas que tiveram a ocorrência de prenhez confirmada, com valores acima de 8 µg/g de fezes por mais de um mês, níveis sugestivos de gestação.

Todas essas fêmeas apresentaram queda nos níveis de progesterinas fecais entre os meses de setembro ou outubro. Isso é indicativo da ocorrência de nascimento dos filhotes, com os mesmos vindo a óbito logo após. Se essa hipótese estiver correta houve uma taxa de sobrevivência de 63% dos filhotes, o que pode ser considerado baixo. Isso sugere necessidade de novos estudos de sobrevivência de filhotes do veado-campeiro no Pantanal da Nhecolândia.

Uma vez que existiam fortes indícios de que estas fêmeas estavam prenhes, as incluímos nos dados para a realização de uma nova análise estatística. Foram considerados como gestação os meses de março à setembro de 2009.

Foi observada uma alteração dos resultados a partir desta nova análise. Os níveis médios mensais de progesterinas fecais tiveram uma alteração discreta em suas concentrações, com a diminuição dos erros padrões, como observado na figura 18. Ao agruparmos os dados em períodos, os níveis de progesterinas fecais a partir do meio da

gestação foram significativamente diferentes dos outros períodos (Figura 19), o que reforça a utilização deste método indireto de diagnóstico a partir do meio da gestação.

Também na análise do nível sugestivo de gestação para o veado-campeiro encontramos uma alteração, sendo este valor reduzido de $6\mu\text{g/g}$ de fezes para $5,8\mu\text{g}$, com índices melhores de sensibilidade e especificidade, 71,8% e 82,2% respectivamente. Conseqüentemente as taxas de falso negativo e falso positivo diminuíram, alcançando 28,2% e 17,8% respectivamente.

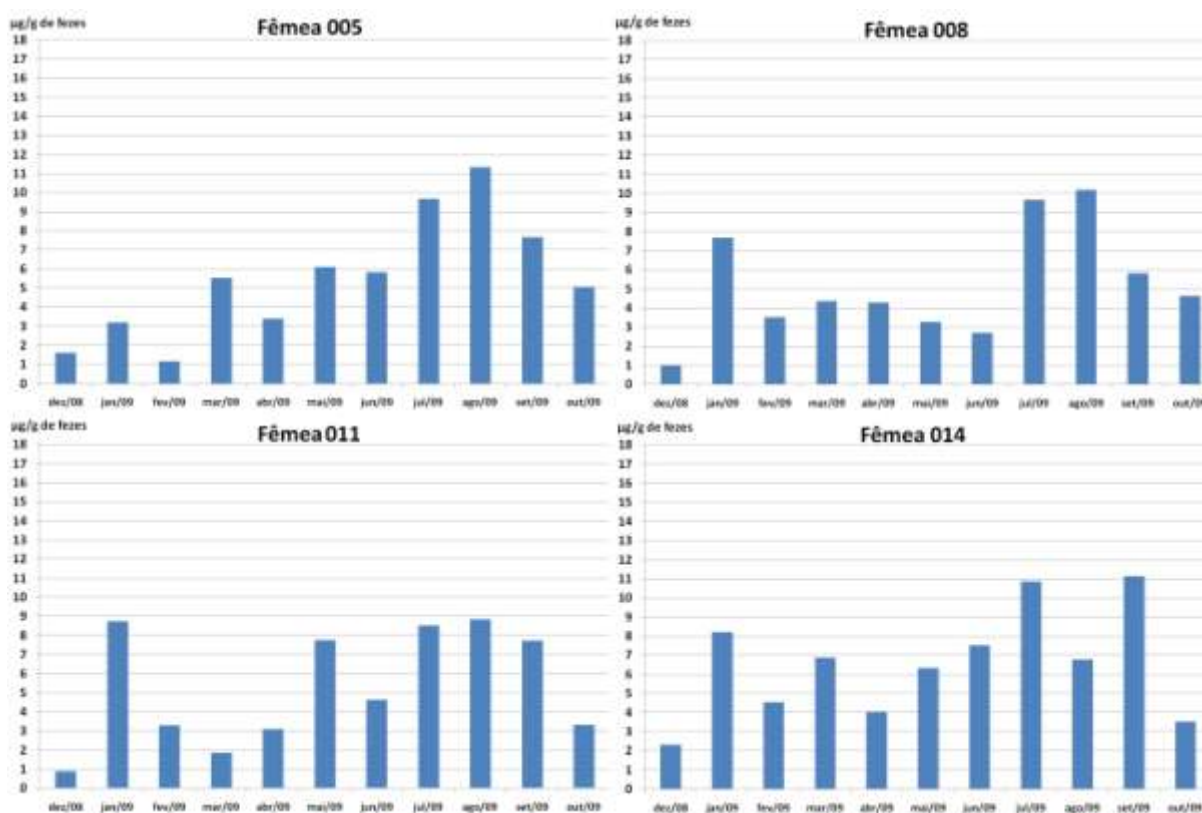


Figura 17 – Concentrações de progesterinas fecais mensais durante o ano de 2009 em veados-campeiros.

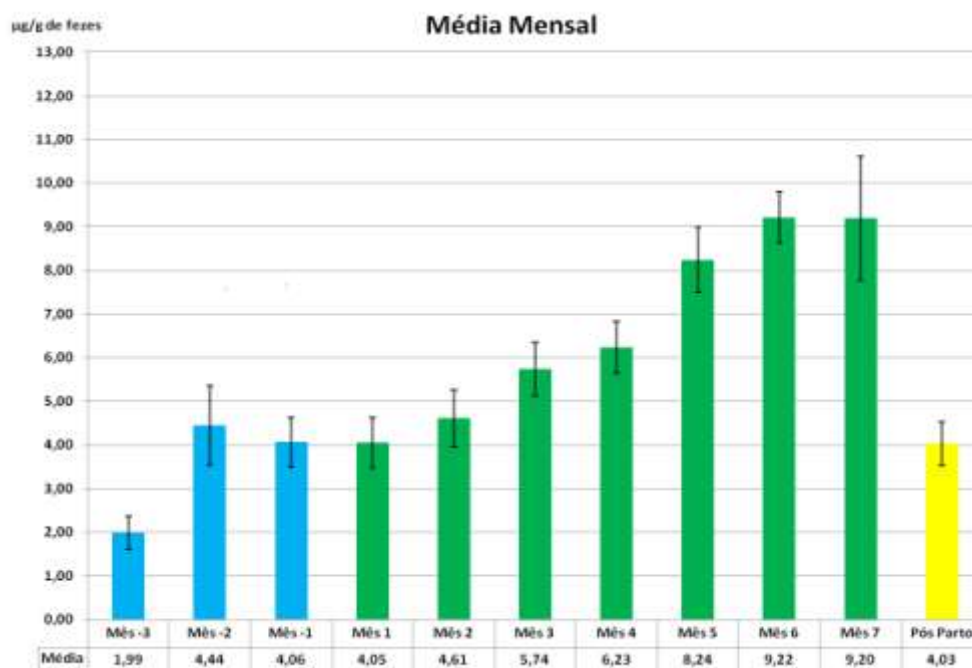


Figura 18 – Concentrações médias de progesterinas fecais mensais antes, durante e depois da gestação em veados-campeiros, incluindo as fêmeas marcadas que não foi observada a presença de filhotes.

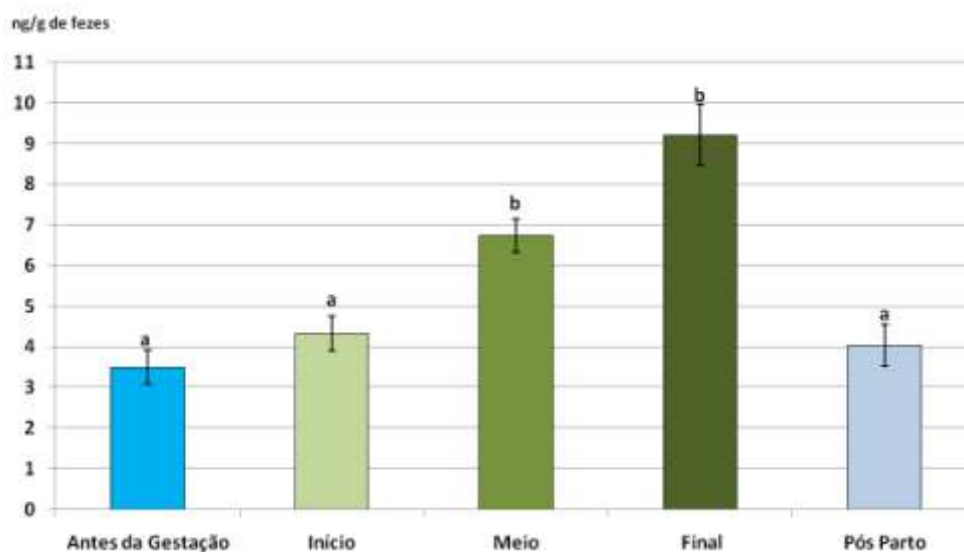


Figura 19 - Concentração de progesterinas fecais (média \pm EPM) nos diferentes períodos da gestação de veado-campeiro, incluindo as fêmeas marcadas que não foi observada a presença de filhotes. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6. CONCLUSÕES

- ✓ O ensaio imunoenzimático para dosagens de progestinas fecais de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) demonstrou-se como um método adequado para caracterização endócrina da espécie, sendo um método eficiente na obtenção de dados importantes sobre a fisiologia reprodutiva da espécie, podendo auxiliar em novos estudos e na conservação *in situ* e *ex situ* do veado-campeiro;
- ✓ O perfil das progestinas fecais da gestação do veado-campeiro demonstrou, durante o início da gestação níveis semelhantes aos períodos não-gestantes, com aumento progressivo a partir do segundo terço da gestação até o momento do parto, decaindo após esse período aos níveis não-gestantes;
- ✓ A validação do método para diagnóstico da gestação na espécie é factível, a partir do quarto mês de prenhez como método auxiliar;

7. REFERÊNCIAS

ASHER, G. W. Oestrous cycle and breeding season of farmed fallow deer, *Dama dama*. *J Reprod Fertil*, v. 75, n. 2, p. 521-529, November 1, 1985 1985.

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

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

BAMBERG, E., MOSTL, E., PLATZ, M., KING, G. J. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *Journal of Zoo Wildlife Medicine*, v. 22, p. 73-77, 1991.

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

BRAGA, F.G. *Influência da agricultura na distribuição espacial de Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus, 1758) (veadocampeiro), em Piraí do Sul, Paraná - parâmetros populacionais e uso do ambiente. 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

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

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN K. Endocrine manual for the reproductive assessment of doemstic and non-domestic species. 2nd ed. Smithsonian Institution, 2004, p. 1-93.

BUCHANAN, K. L.; GOLDSMITH, A. R. Noninvasive endocrine data for behavioral studies: the importance of validation. Animal Behavior, London, v. 67, n. 1, p. 183-185, 2004.

CHRISTOFOLETTI, M.; PEREIRA, R.; DUARTE, J. 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, 2009, Publicado online Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-009-0350-8> >..

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. Reproduction Nutrition Development, v.40, p.493-504, 2000.

CUNNINGHAM, J. G. Tratado de fisiologia veterinária. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, p. 409-413.

DUARTE, J. M. B. Artiodactyla – Cervidae (Veado-catingueiro, Veado-campeiro, Cervido-pantanal). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de Animais Selvagens 1ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2006. p. 641- 664.

DUARTE, J.M.B.; GARCIA, J.M. Reprodução assistida em cervídeos brasileiros. Revista Brasileira de Reprodução Animal. v.19(1-2), p.111-121, 1995.

DUARTE, J.M.B.; GARCIA, J.M. Tecnologia da reprodução para propagação e conservação das espécies ameaçadas de extinção. In: DUARTE, J.M.B. Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. Jaboticabal: Funep, 1997. p.228-38.

DUMONCEAUX, G. A.; BAUMAN, J. E.; CAMILO, G. R. Evaluation of progesterone levels in feces of captive reticulated giraffe (*giraffa camelopardalis reticulata*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 37, n. 3, p. 255-261, 2009.

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

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

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

GIMÉNEZ DIXON, M. Estimación de parámetros poblacionales de venado de las pampas *Ozotoceros bezoarticus* celer Cabrera, 1943 Cervidae en la costa de la Bahía de Samborombón (Prov. Buenos Aires) a partir de los datos obtenidos mediante censos aéreos. 1991. 165f. Tesis (Doctoral). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, 1991.

GONZÁLEZ, S. Situación poblacional del venado de campo en el Uruguay. Pampas Deer Population & Habitat Viability Assessment, Workshop Briefing Book. Ed CBSG/IUCN, v.6, p.1-9, 1994.

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

GONZÁLEZ, S.; COSSE, M.; BRAGA, F. G.; VILA, A. R.; MERINO, M. L.; DELLAFIORE, C.; CARTES, J. L.; MAFFEI, L.; DIXON, M. G. Pampas Deer *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus 1758). In: DUARTE, J. M. B. ; GONZÁLEZ, S. (Ed.) Neotropical Cervidology. Jaboticabal: FUNEP, 2010. p.119-132.

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

HAMASAKI, S.; YAMAUCHI, K.; OHKI, T.; MURAKAMI, M.; TAKAHARA, Y.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Comparison of various reproductive status in sika deer (*Cervus Nippon*) using fecal steroid analysis. The Journal of Veterinary Medical Science. v. 63, n. 2, p. 195-198, 2001.

HAMILTON, S. K., S. J. SIPPEL, e J. M. MELACK. Inundation patterns in the Pantanal wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. Archiv. F. Hydrobiol. v.137, p.1-23,1996.

HERNANDEZ-JAUREGUI, D. M. B. MALDONADO, F. G. PEREZ, R. A. V. PARDO, M. R. DE ALUJA, A. S. Cortisol in saliva, urine, and feces: non-invasive assessment of wild mammals. Veterinaria México , México, v. 36, n. 3, p. 325-337, 2005.

HODGES, J. K. Determining and manipulating female reproctive parameters. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S. Wild mammals in captivity: principles and techniques. Chicago: University of Chicago Press, 1996, p. 418-428.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Diagnóstico de gestação. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução animal.7 ed. Barueri: Editora Manole, 2004a. p. 399-408.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestação, Fisiologia Pré-Natal e Parto. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal 7ed.Barueri: Editora Manole, 2004b. p. 141-147.

JACKSON, J.; LANGGUTH, A. Ecology and status of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Argentinian pampas and Uruguay. Biology and management of the Cervidae, p. 402 - 409, 1987.

JACKSON, J.; LANDA, P.; LANGGUTH, A. Pampas deer in Uruguay. Oryx, v. 15, p. 267 - 272, 1980.

KAPKE, C. A. ; ARCESE,P.; ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G. R. Estradiol and Progesterone Metabolite Concentration in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) Feces. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 30, n. 3, p. 361-371, 1999.

KIRKPATRICK, J. F.; BANCROFT, K.; KINCY, V. Pregnancy and ovulation detection in Bison (*Bison bison*) assessed by means of urinary and fecal steroids. Journal of Wildlife Diseases, Copenhagen, v. 28, n. 4, p. 590-597, 1992.

KORNDÖRFER, C. M. Hormônios sexuais nas fezes: opção para estudos reprodutivos e etiológicos de animais silvestres. Anais da Etiologia, v. 14, p.151-158, 1996.

LACERDA, A. C. R. Ecologia e Estrutura Social do Veado-Campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal. 2008. 182 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal)– Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

LASLEY, B. L.; SHIDELER, S. E. Methods for asseging reproduction in nondomestic species. In: FOWLER, M. E. Zoo and Wild Animal Medicine:Current Therapy 3. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993. P.79-86.

LEEUWENBERG, F.; LARA RESENDE, S. Ecologia de Cervídeos da Reserva Ecológica do IBGE -DF: manejo e densidade de populações. Cadernos de Geociências. v1, p.89-95, 1994.

LOMBARDI, R., IBARRA, R., GONZALEZ, S.. Impacto de una arrocera em la poblacion de venados de Los Ajos.1995, 15p. (Informe presentado al Programa Restitución a La Vida),

LUEDERS, I.; HILDEBRANDT, T. B.; POOTOOLAL, J.; RICH, P.; GRAY, C. S.; NIEMULLER, C. A. Ovarian ultrasonography correlated with fecal progestins and estradiol during the estrous cycle and early pregnancy in giraffes (*Giraffa camelopardalis rothschildi*). Biology of Reproduction, v. 81, n. 5, p. 989-995, 2009.

MARISA, M. R.; ELENA, R. S. S.; MARISOL, B. M.; CARMEN, M. P.; PATRICIO, T. G. J. Concentración de progesterona en heces fecales de hembra de venado cola blanca

(*Odocoileus virginianus*) durante el ciclo reproductivo en cautiverio. In: JORNADAS DE INVESTIGACIÓN UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS, Resumos...5., 2001. Zacatecas.

MAUGET, R. et al. Non-invasive assessment of reproductive status in Chinese water deer (*Hydropotes inermis*): Correlation with sexual behaviour. *Mammalian Biology - Zeitschrift fur Saugetierkunde*, v. 72, n. 1, p. 14-26, 2007.

MERINO, M.L; MOSCHIONE, F. N. Estimación Del tamaño poblacional del venado de las pampas *Ozotoceros bezoarticus* en la Bahía Samborombón, Buenos Aires. 1995. X Jornadas Argentinas de Mastozoología, La Plata, Argentina.

MERINO, M. L.; GONZALES, S.; LEEUWENBERG, F.; RODRIGUES, F. H. G.; PINDER, L.; TOMAS, W. M. Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) In: DUARTE, J.M.B. Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 1997. p.24-40.

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

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

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

NETTO, N. T. Interações sociais, dimorfismo comportamental e segregação sexual em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*). 1997. 60 p. Dissertação (MS) – Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal do Pará, Belém, 1997.

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

PEREIRA, R. J. G., DUARTE, J. M .B. ; J. A. NEGRAO. 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, v.63, p.2113–2125, 2005.

PEREIRA, R.J.G.; POLEGATO, B.F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J.A.; DUARTE, J.M.B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. Theriogenology. Stoneham ,v.65, p.387-399, 2006.

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

PINDER, L. Niche overlap among brown brocket deer, Pampas deer and cattle in the Pantanal of Brasil. 1997. (PhD). University of Florida, Gainesville, 1997.

PINHO, A. D. A.; MATTOS, M. C. F. I. D. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo de útero. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 38, p. 225-231, 2002.

PIOVEZAN, U.; ZUCCO, C. A.; ROCHA, F. L. First report of darting for capture of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Deer Specialist Group News, Montevideo, n. 21, p.3-7, 2006.

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

POLEGATO, B. F. Monitoramento do Ciclo Estral e da Gestação em Cervos-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) mantidos em cativeiro.2008. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

RATTER, J.A.; POTT, A.; POTT, V.; CUNHA, C.N.; HARIDASAN, M. Observations on woddy vegetation types in the Pantanal and at Corumbá, Brazil. Notes of the Royal Botanical Garden, Edinburg, v.45, p.503-526, 1988.

REDFORD, K. H. 1987. The pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in central Brazil. In: WEMMER, C., (Ed.). Biology and management of the Cervidae. Smithsonian Institute Press. Washington DC, USA. pp. 410–414.

RENSHAW, A. A. Analysis of error in calculating the false-negative rate in the interpretation of cervicovaginal smears. Cancer Cytopathology, v. 81, n. 5, p. 264-271, 1997

RODRIGUES, F. H .G. História natural e biologia comportamental do Veado-campeiro no Parque Nacional das Emas. In: XIV Encontro Anual de Etologia, 1996, Uberlândia. Resumo, p.223-231.

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

SCHWARZENBERGER, F.; PATZL, M.; FRANCKE, R.; OCHS, A.; BUITER, R.; SCHAFTENAAR, W.; DE MEURICHY, W. Fecal progesterone evaluations to monitor the estrous cycle and pregnancy in the okapi (*Okapia johnstoni*). Zoo Biology, v. 12, n. 6, p. 549-559, 1993.

SCHWARZEMBERGER, 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. 46, n. 1-4, p. 515-526, 1996.

SCHWARTZ, C. C.; MONFORT, S. L.; DENNIS, P. H.; HUNDERTMARK, K. J. Fecal Progesterone Concentration as an Indicator of the Estrous Cycle and Pregnancy in Moose. The Journal of Wildlife Management, v. 59, n. 3, p. 580-583, 1995

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

SHIDELER, S. E. Monitoring reproduction and contraception in free ranging wildlife: tule elk (*Cervus elaphus nannodes*) at Point Reyes National Seashore In: McCOOL, S. F.; COLE, D. N.; BORRIE, W. T.; O'LOUGHLIN, J.; comps. Wilderness science in a time of change conference—Volume 3: Wilderness as a place for scientific inquiry; 1999 May 23–27., Davis, v.3, p. 137-142, 2000.

SORIANO, B.M.A.; OLIVEIRA, H.; CATTO, J.V.; COMASTRI-FILHO, J.A.; GALDINO, S.; SALIS, S.N. Plano de utilização da Fazenda Nhumirim. Corumbá: Embrapa-CPAP, 1997, p.72.

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

TARIFA, J.R. O sistema climático do Pantanal. Da compreensão do sistema à definição de prioridades de pesquisa climatológica. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 1986, Corumbá. Anais... Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986, p. 9-28.

TIEPOLO, L. M.; TOMAS, W. M. Ordem Artiodactyla. In: REIS, N. L.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Mamíferos do Brasil 1ed. Londrina: EDFURB, 2006. P. 296-297.

UMAPATHY, G.; SONTAKKE, S. D.; REDDY, A.; SHIVAJI, S.. Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). Theriogenology, v.67, n.8, p.1371-8. 2007.

UNGERFELD, R. et al. Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. Acta Veterinaria Scandinavica, v. 50, n. 1, p. 16, 2008.

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

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

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

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