PRISCILA VIAU FURTADO

**ESTUDO DA FUNÇÃO OVARIANA EM FÊMEAS DE ONÇA-
PINTADA (*Panthera onca* LINNAEUS, 1758) MANTIDAS EM
CATIVEIRO, POR MEIO DA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO
DE ESTERÓIDES FECAIS**

**São Paulo
2003**

11300023803

PRISCILA VIAU FURTADO

ESTUDO DA FUNÇÃO OVARIANA EM FÊMEAS DE ONÇA-PINTADA (*Panthera onca* LINNAEUS, 1758) MANTIDAS EM CATIVEIRO, POR MEIO DA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ESTERÓIDES FECAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof.Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo
2003

FMVZ - 022713

10 19151

N.º CLASSIFICAÇÃO
7.1283
1.1.1
0.2
N.º TOMBO
022713

545001338008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1289
FMVZ

Viau, Priscila

Estudo da função ovariana em fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) mantidas em cativeiro, por meio da extração e quantificação de esteróides fecais / Priscila Viau. – São Paulo : P. Viau, 2003.
83 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Animais silvestres. 2. Puberdade. 3. Esteróides.
4. Radioimunoensaio. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: VIAU, PRISCILA

Título: Estudo da função ovariana em fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca* LINNAEUS, 1758) mantidas em cativeiro, por meio da extração e quantificação de esteróides fecais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Data: 12 / 09 / 03

Banca Examinadora

Prof. Dr. CUADRO A. DE OLIVEIRA Instituição: FMVZ-USP

Assinatura: [Assinatura] Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Ronaldo Gonçalves Morais Instituição: CENAP-IBAMA

Assinatura: [Assinatura] Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. MARCELO A. DE A. VARGUEIRO Instituição: FMVZ-USP

Assinatura: [Assinatura] Julgamento: Aprovada

Dedico meus estudos a todos os animais silvestres, sobretudo, às onças - pintadas, razão incansável e diária da busca por algum conhecimento que me revelasse um pouco mais sobre seu modo de vida. Hoje, tenho consciência de que por mais informações que esses animais me revelem, meus dados científicos serão sempre incompletos devido à incapacidade humana de compreender verdadeira e profundamente um animal. Com isso, qualquer registro aqui revelado sempre estará subestimado pelo que a onça-pintada realmente representa em sua mais singular forma de existência....

*Aos meus pais **André Louis** e **Neusa Marina**, por terem doado amor e dedicação a mim e ao meu querido irmão **André**.*

*Às minhas queridas filhas **Marina** e **Luana**, foi por vocês e pensando em vocês que hoje estou aqui completando mais uma etapa da minha vida, agradeço a Deus por tê-las colocado em meu caminho em tão pouco tempo.*

*Ao meu marido **Marcelo**, por ter permanecido ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis, pelo amor que sentimos e que nos faz caminhar...sem você nada disso seria possível.*

Dedico

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira**, por ter me acolhido em seu laboratório e me iniciado no campo das dosagens hormonais, o senhor foi um amigo solidário nos momentos mais difíceis que passei nestes últimos anos, seus ensinamentos foram importantes para o meu crescimento profissional e pessoal, muito obrigado por ter confiado no meu potencial de trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo suporte financeiro fundamental à realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ronaldo Gonçalves Morato**, referência para aqueles que desejam trabalhar com animais silvestres, seu amor e dedicação por esses animais é simplesmente contagiante e um grande incentivo, seu apoio foi fundamental para realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães**, exemplo de ser humano e profissional, pessoa sensata e correta, foi um privilégio ter sido aluna da sua primeira turma da pós-graduação, sua co-orientação foi decisiva para finalização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Áurea Wischral** da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ser uma referência como cientista na qual eu me espelho e me esforço em seguir.

Às **instituições** Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Fundação Rio-Zoo, Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”-Sorocaba/SP e ao Centro de Conservação da Fauna Silvestres Ilha Solteira – CESP, por terem concedido o uso dos animais neste trabalho e por terem disponibilizado os seus tratadores para a colheita da maior parte do material obtido.

Ao **Médico Veterinário Lúcio de O. Souza e ao biólogo Rodrigo Ribeiro de Mendonça (Pio)** do Centro de Conservação da Fauna Silvestres Ilha Solteira – CESP, por terem me recebido sempre com muito carinho todas as vezes que estivemos juntos para realização deste experimento.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal – VRA-FMVZ/USP, especialmente, ao **Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe**.

À **Profa. Dra. Ieda Terezinha do Nascimento Verreschi**, que permitiu que parte da extração e recuperação das amostras fossem realizadas em seu laboratório de Endocrinologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

Às técnicas laboratoriais **Ivone F. Bianco** e a **Biom. Lilian F. Hayashi**, do laboratório de Endocrinologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e amizade.

Ao **Prof. Dr. Mário Binelli**, responsável pelo laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular-VRA/Campus-Pirassununga, por ter permitido que utilizássemos os equipamentos e a estrutura laboratorial para realização das etapas de recuperação hormonal.

À querida amiga Técnica laboratorial **Biom. Érika Cristiane Gutierrez Felipe** do laboratório de Dosagens Hormonais – VRA – FMVZ/USP, pela amizade e por todo apoio recebido para realização dos ensaios hormonais, pois todo trabalho dividido se torna mais leve e prazeroso.

Às queridas amigas pós-graduandas, **Débora C. Rodini**, **Patrícia E. B. Barbare** e **Marie-Odile M. Chelini** por todos os momentos de profunda troca de conhecimentos e pela ajuda recebida durante a execução desse experimento.

Aos queridos amigos pós-graduandos, **Lilian**, **Vinicius**, **André**, **Cláudia (Berim)**, **Flaviana**, **Tatiana**, **Lucila**, **Rogério**, **Paola** e **karina** pelo convívio, carinho e amizade.

Ao pós-graduando **MS Marcílio Nchi**, pela colaboração prestada na análise estatística deste trabalho.

A eterna amiga **Soraia C. Saura**, por ter me acolhido em sua casa num dos momentos mais difíceis da minha vida, por me mostrar a importância da verdadeira amizade; sem o seu incentivo eu não teria iniciado essa caminhada.

*Aos Funcionários do VRA- **Thais, Miguel, Harumi, Alice e Silvia** e aos ex- Funcionários **Daura e Eunice**, pela ajuda sempre presente.*

*Aos **Funcionários** da Biblioteca da FMVZ-USP, pelo profissionalismo e colaboração na pesquisa bibliográfica.*

A todos que de uma forma ou de outra, estiveram presentes durante a execução deste trabalho, de todo coração...

Muito Obrigada!!!

RESUMO

VIAU, P. **Estudo da função ovariana em fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca* LINNAEUS, 1758) mantidas em cativeiro, por meio da extração e quantificação de esteróides fecais** [Ovarian function assessment in captive jaguars (*Panthera onca*, LINNAEUS, 1758) by fecal steroid extraction and quantification]. 2003. 84f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Foi estudada a atividade ovariana de fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*; adultas n=2 e pré-púberes n=3) mantidas em cativeiro, pela extração e quantificação de estrógenos e progestinas fecais. Foram colhidas amostras fecais de 2-7 vezes por semana durante 16-18 meses. Foi realizada a validação dos radioimunoensaios em fase sólida, progesterona e 17 β -estradiol, para uso em extratos fecais em onça-pintada. A duração média ($\pm$ EPM) do ciclo ovariano (n=7) definido por dois picos consecutivos de estrógenos fecais foi de 38,28 $\pm$ 2,52 dias (variando de 25 a 44 dias). A fase de estro teve duração média de 10,42 $\pm$ 1,15 dias (variando de 7 a 15 dias) e a fase de inter-estro durou em média 28,00 $\pm$ 1,43 dias (variando de 28 a 31 dias). O nível basal médio de estrógenos fecais no período de inter-estro foram de 31,26 $\pm$ 1,34 ng/g de fezes secas. No período de estro, os valores médios encontrados foram de 115,91 $\pm$ 8,82 ng/g de fezes secas, foi observado um pico entre o D-5 e o D-2, com valores médios de 164,45 $\pm$ 3,49 ng/g de fezes secas. As progestinas fecais apresentaram valores médios de 0,44 $\pm$ 0,05 μ g/g de fezes secas, não apresentando variações significantes durante todo o ciclo. Os dados obtidos durante a avaliação do perfil longitudinal das concentrações de estrógenos fecais, no grupo dos animais pré-púberes, permitem indicar um possível início da atividade ovariana a partir do bimestre agosto-setembro, onde os valores médios dos picos detectados para estrógenos fecais, foram de 135,31 $\pm$ 3,16 ng/g de fezes secas. Todos os animais entraram na fase peripuberal com idade aproximada de 20 meses.

Unitermos: Animais silvestres. Esteróides. Puberdade. Radioimunoensaio

ABSTRACT

VIAU, P. **Ovarian function assessment in captive jaguars (*Panthera onca*, LINNAEUS, 1758) by fecal steroid extraction and quantification** [Estudo da função ovariana em fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca* LINNAEUS, 1758) mantidas em cativeiro, por meio de extração e quantificação de esteróides fecais]. 2003. 84f Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Ovarian function of captive jaguars (*Panthera onca*; adults n=2 and pre-pubertal n=3) was assessed by extraction and quantification of fecal estrogens and progestins. Fecal samples were obtained 2-7 times per week during 16-18 months. Validation of solid phase radioimmunoassay for progesterone and 17- β -estradiol was performed for jaguar fecal extracts. Ovarian cycle mean duration ($\pm$ SEM), defined by two consecutive peaks of fecal estrogens, was 38.28 ± 2.52 days (range, 25 - 44 days; n=7). Mean estrous phase duration was 10.42 ± 1.15 days (range, 7 - 15 days), and inter-estrous phase mean duration was 28.00 ± 1.43 days (range, 28 - 31 days). Basal fecal estrogen mean concentration in inter-estrous period was 31.26 ± 1.34 ng/g of dry feces. During estrous period mean value was 115.91 ± 8.82 ng/g of dry feces, and was observed a mean peak (164.45 ± 3.49 ng/g of dry feces) between D-5 and D-2. Fecal progestins had a mean concentration of 0.44 ± 0.05 μ g/g of dry feces, with no significant variations during the cycles. Data obtained during the evaluation of fecal estrogen longitudinal profiles in the pre-pubertal group, allow to indicate the beginning of ovarian activity in August-September bimester with fecal estrogen mean peaks of 135.31 ± 3.16 ng/g of dry feces. All animals started pre-pubertal phase around 20 months of age.

Uniterms: Nondomestic species. Steroids. Puberty. Radioimmunoassay.

LISTA DE QUADROS.

Quadro 1	Controle de qualidade obtido nos ensaios de estrógenos fecais. São Paulo, 2003.	42
Quadro 2	Controle de qualidade obtido nos ensaios de estrógenos fecais. São Paulo, 2003.	42
Quadro 3	Concentrações médias ($\pm$ EPM) dos valores basais e de pico dos estrógenos e progestinas fecais para cada indivíduo adulto durante 18 meses de colheita. São Paulo, 2003.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração média dos estrógenos fecais (ng/g de fezes secas) do grupo das fêmeas pré-púberes (n=3) comparada com a média das concentrações das fêmeas adultas (n=2). São Paulo, 2003.	46
Tabela 2	Concentração média das progestinas fecais (µg/g de fezes secas) do grupo das fêmeas pré-púberes (n=3) comparada com a média das concentrações das fêmeas adultas (n=2). São Paulo, 2003.	47
Tabela 3	Concentrações médias dos estrógenos fecais (ng/g de fezes seca) encontrados na avaliação do perfil longitudinal (16 meses) durante o período pré-púbere (pp) e púbere (p) do animal PP03. São Paulo, 2003.	60
Tabela 4	Concentrações médias dos progestinas fecais (µg/g de fezes secas) encontrados na avaliação do perfil longitudinal (16 meses) durante o período pré-púbere (pp) e púbere (p) do animal PP03. São Paulo, 2003.	60
Tabela 5	Concentração média ($\pm$ EPM) dos valores máximos (n=15) encontrados para estrógenos fecais a cada bimestre, até a detecção do início de atividade ovariana para o grupo PP (n=3). São Paulo, 2003.	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estrógenos fecais utilizando a matriz depletada. São Paulo, 2003.	43
Figura 2	Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estrógenos fecais utilizando a matriz íntegra. São Paulo, 2003. ...	44
Figura 3	Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progestinas fecais utilizando a matriz depletada. São Paulo, 2003.	44
Figura 4	Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progestinas fecais utilizando a matriz íntegra. São Paulo, 2003. .	45
Figura 5	Concentração média ($\pm$ EPM) de estrógenos fecais (ng/g de fezes secas), nos diferentes grupos. São Paulo, 2003.	48
Figura 6	Concentração média ($\pm$ EPM) de progestinas fecais (μ g/g de fezes secas), nos diferentes grupos. São Paulo, 2003.	49
Figura 7	Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) dos estrógenos fecais de fêmeas de onça-pintada (n=2) e da extensão do ciclo ovariano (n=7) verificado entre dois picos consecutivos. São Paulo, 2003.	50
Figura 8	Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) dos estrógenos fecais de fêmea de onça-pintada animal AA 01 e a extensão do ciclo ovariano (n=5) verificado entre dois picos consecutivos. São Paulo, 2003.	51
Figura 9	Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) dos estrógenos fecais de fêmea de onça-pintada animal AA 02 e a extensão do ciclo ovariano (n=2) verificado entre dois picos consecutivos. São Paulo, 2003.	52
Figura 10	Representação gráfica das concentrações (média $\pm$ EPM) de estrógenos fecais de fêmeas adultas de onça-pintada (n=2) diferenciando-se as fases de estro e inter-estro durante sete ciclos ovarianos (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.	54

Figura 11	Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) de estrógenos fecais de fêmea de onça-pintada animal AA 01 diferenciando - se as fases de estro e inter-estro durante cinco ciclos ovarianos (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.	55
Figura 12	Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) de estrógenos fecais de fêmea de onça-pintada animal AA 02 diferenciando-se as fases de estro e inter-estro durante dois ciclos ovarianos (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.	56
Figura 13	Representação gráfica da variação das concentrações (média $\pm$ EPM) das progestinas fecais durante sete ciclos ovarianos de fêmeas adultas de onça-pintada (n=2) diferenciando-se a fases de estro e inter-estro. (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.	57
Figura 14	Representação gráfica da variação das concentrações (média $\pm$ EPM) de estrógenos e progestinas fecais durante sete ciclos ovarianos de fêmeas adultas de onça-pintada (n=2) diferenciando-se as fases de estro e inter-estro (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.	58
Figura 15	Representação gráfica do perfil longitudinal encontrado durante as dosagens de estrógenos fecais para o animal PP 03, evidenciando a detecção do início da atividade ovariana (IAO). São Paulo, 2003.	61
Figura 16	Representação gráfica do perfil longitudinal encontrado durante as dosagens de progestinas fecais para o animal PP 03, evidenciando a detecção do início da atividade ovariana (IAO). São Paulo, 2003.	61
Figura 17	Representação gráfica da média ($\pm$ EPM) dos valores máximos (n=15) encontrados para estrógenos fecais a cada bimestre até a detecção do início de atividade ovariana para o grupo PP (n=3). São Paulo, 2003.	63

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor que
=	igual
±	mais ou menos
μg	micrograma
ng	nanograma
g	força centrípeta
ng	nanograma
pg	picograma
ml	mililitro
°	graus
'	minuto
''	segundo
°C	graus Celsius
p	nível de significância
pH	potencial iônico
R ²	coeficiente de regressão
β	beta
³ H	hormônio triciado
¹²⁵ I	iodo
[]	concentração

ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
9	4	84f.	83 f.
10	4	84f.	83 f.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE FELINOS NEOTROPICAIS	21
2.2	ASPECTOS GERAIS DA ONÇA-PINTADA	22
2.3	ASPECTOS DA FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS DE ONÇA-PINTADA	23
2.4	ESTABELECIMENTO DA PUBERDADE E CONTROLES ENDÓCRINOS PRÉ-PUBERAIS	25
2.5	CICLOS OVARIANOS E SAZONALIDADE	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	ANIMAIS	32
3.2	COLHEITA E TRANSPORTE DO MATERIAL FECAL	33
3.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	33
3.4	DOSAGENS HORMONAIS	36
3.5	CICLOS OVARIANOS	38
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4	RESULTADOS	41
4.1	EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO	41
4.2	PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS	41
4.3	VALIDAÇÃO	43
4.3.1	VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA	45
4.4	CICLOS OVARIANOS	50
4.5	GRUPO PRÉ-PÚBERES	59

5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	72
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8	ANEXOS	80

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os carnívoros têm sido parte do ambiente, cultura e da mitologia humana por milhões de anos. A onça-pintada é um símbolo que tem alto significado ritual para as civilizações pré-colombianas no México, América Central e comunidades indígenas na América do Sul (LEITE; OLIVEIRA, 2002). Entretanto, a maioria das espécies de felinos silvestres sofre o risco de extinção em virtude da acentuada destruição de seu habitat, caça predatória e comércio ilegal. A utilização irracional dos recursos naturais, sem um trabalho concreto para sua recomposição ou conservação, está causando uma irreparável perda da biodiversidade (WILDT et al., 1989; LASLEY et al., 1994; BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998).

Os carnívoros que ocupam o topo da cadeia alimentar, são de grande importância ecológica, pois podem regular a população de presas naturais e, desta forma, influenciar toda a dinâmica do ecossistema em que vivem. Na ausência de predadores, suas presas naturais tendem a se multiplicar exponencialmente, podendo causar sérios prejuízos à agricultura. (LEITE; OLIVEIRA, 2002).

Recentemente, pesquisadores brasileiros e internacionais se reuniram no I Workshop para pesquisa e conservação dos carnívoros neotropicais (2003), e diversos temas foram abordados, entre eles: conservação *in situ*, banco genômico e manejo em cativeiro. Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas nesse sentido para ampliar os conhecimentos sobre diversos aspectos da biologia destas espécies.

A onça-pintada está listada no Apêndice I do Red Book da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 1994) como animal ameaçado de extinção, e

encontra-se na categoria dos animais vulneráveis da Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna Brasileira (2003).

Morato e Gasparini (1994), constataram que a população cativa desta espécie é constituída por animais idosos e em sua grande maioria sem procedência conhecida, o que dificulta o pareamento dos animais que, muitas vezes, são mantidos isolados ou em grupos de mesmo sexo. Além das dificuldades quanto ao pareamento geneticamente viável para a espécie, vários fatores interferem na reprodução natural de animais silvestres em cativeiro; dentre eles destacam-se: recintos inadequados, deficiências nutricionais, estresse, doenças e alterações de comportamento.

Técnicas de reprodução assistida possivelmente poderiam representar uma ferramenta promissora para a conservação *ex situ* de espécies ameaçadas de extinção. Porém, seu emprego provavelmente, alcançará plena eficiência, se baseado no conhecimento da biologia reprodutiva.

Desde a década de 70, estudos sistemáticos de endocrinologia reprodutiva de felinos, vêm sendo realizados. Inicialmente, em gatos domésticos, depois gradativamente também em espécies selvagens, especialmente grandes felinos, evidenciando que os mecanismos endócrinos envolvidos na regulação da reprodução são bem diversos dentro da família *Felidae* (BROWN; WILTD, 1997). Deste modo, estudos comparativos fazem-se necessários para que similaridades e diferenças entre as espécies possam ser detectadas (SWANSON; WILDT, 1997).

Estudos realizados com infusão de hormônios radio-marcados permitiram constatar que mais de 90% dos metabólitos esteróides em gatos domésticos são eliminados pelas fezes (BROWN et al., 1994). A partir daí, radioimunoensaios foram validados para a quantificação dos níveis de estrógenos e progestágenos (BROWN et

Introdução

al., 1994), andrógenos (BROWN et al, 1996) e corticóides (GRAHAW; BROWN, 1996) nas fezes de várias espécies de felinos não domésticos.

A análise hormonal de esteróides fecais em animais silvestres é vantajosa, por permitir o monitoramento a longo prazo da função gonadal, refletida de maneira mais fisiológica, sem que haja necessidade de impor aos animais uma situação adicional de estresse, que é a colheita de amostras de sangue (LASLEY; KIRKPATRICK, 1991; BROWN; WILTD, 1997; BROWN; WILTD, 2001).

O uso destas técnicas, em diversas espécies de felinos, tem permitido estudos comparativos da dinâmica da função ovariana (BROWN et al., 1994; CZEKALA et al., 1994; BROWN et al., 1995; GRAHAM et al., 1995; MORAIS et al, 2001), testicular (BROWN et al., 1996; MORATO, 2001; MORAIS et al., 1996; MORAIS et al., 2002) e adrenocortical (GRAHAM; BROWN, 1996; MORAIS et al., 1997) entre espécies e indivíduos

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi contribuir com a pesquisa sobre a função ovariana de onça-pintada e o acompanhamento da maturação sexual dos indivíduos jovens, utilizando-se da técnica do monitoramento não-invasivo, por meio da extração e quantificação de estrógenos e progestinas fecais.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE FELINOS NEOTROPICAIS

A família *Felidae* é composta atualmente por trinta e sete espécies, sendo trinta e seis selvagens, distribuídas em todos os continentes, com exceção da Austrália e antártica (JACKSON, 1997). Apesar de existir um certo consenso em relação ao reconhecimento e identificação das diferentes espécies, existe uma grande diversidade de opiniões a respeito da melhor classificação a ser adotada para os felinos. Segundo Nowak (1991), alguns autores classificam todas as espécies em apenas dois gêneros, *Felis* e *Acinonyx*, outros dividem a família em quatro gêneros: *Felis*, *Neofelis*, *Panthera* e *Acinonyx* ao passo que, em publicações mais recentes, é adotada a classificação em até dezenove gêneros diferentes.

Entidades internacionais que acompanham e definem a situação das espécies de felinos, vem adotando em publicações oficiais a taxonomia de mamíferos sugerida por Wilson e Reeder (1993).

Na América do Sul, são reconhecidas dez espécies de felinos (WILSON; REEDER, 1993), as quais teriam ocupado este continente após a formação do istmo do Panamá, unindo as Américas, há cerca de 2 a 3 milhões de anos. Alguns autores, vêm revendo as relações filogenéticas dessa família, e estudos da biologia molecular, incluindo a estimativa da distância imunológica da albumina (COLLIER; O'BRIEN, 1985), análise do padrão de eletroforese de proteínas (SLATTERY et al., 1994), do DNA mitocondrial (JOHNSON; O'BRIEN, 1997; ELZIRIK et al., 1998) e do complexo principal de histocompatibilidade (O'BRIEN; NAOYA, 1999) dão suporte à divisão dos

felinos sul-americanos em três linhagens distintas. O primeiro grupo ou linhagem da jaguatirica, inclui as sete espécies: jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-do-mato (*L. trigrinus*), gato-maracajá (*L. wiedii*), gato do mato grande (*Oncifelis geoffroyi*), gato chileno (*O. guigna*), gato palheiro (*O. colocolo*) e o gato dos Andes (*Oreailurus jacobita*); o segundo grupo inclui a onça-parda (*Puma concolor*) e o gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) e o terceiro grupo o gênero *Panthera*, é composto por cinco espécies tigre - *P. tigris*, leão - *P. leo*, leopardo - *P. pardus*, leopardo das neves - *P. uncia*, e como único representante sul-americano a onça-pintada - *P. onca*.

De acordo com a forma genérica de dividir os felinos em relação ao peso corporal, são encontradas apenas duas espécies de grandes felinos sul-americanos (*P. concolor* e *P. onca*), sendo as demais espécies classificadas como pequenos felinos, ou seja, espécies que têm peso corpóreo médio abaixo de 20Kg (OLIVEIRA; CASSARO, 1997).

2.2 ASPECTOS GERAIS DA ONÇA-PINTADA

A onça-pintada possui uma conformação corpórea robusta com crânio grande e largo, pelagem com coloração amarela com manchas pretas arredondadas. Alguns animais podem apresentar uma variação melânica, sendo sua pelagem inteiramente negra. Eizirik et al. (2003), sugere uma evolutiva adaptação do fenótipo visível nos animais de vida livre.

A distribuição da onça-pintada se estendia pelo Arizona, novo México e Califórnia, nos Estados Unidos, até o Rio Negro na Argentina. Atualmente, ela pode ser considerada quase extinta nos Estados Unidos, El Salvador, Uruguai, terras baixas do

México e regiões desenvolvidas do Brasil (SEYMOUR, 1989), sendo encontrada na parte setentrional do México até o extremo noroeste da América do Sul (Equador e Colômbia), Peru e Bolívia oriental (a leste dos Andes), Paraguai, Brasil Meridional e Argentina. Essa espécie ocupa uma vasta variedade de Biomas (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal) e de habitats (Florestas ombrófilas, descicuais, tropicais e subtropicais, áreas pré-montanha entre outros) (Fundação Biodiversitas, 2003).

Foram relatados, algumas variações regionais consideráveis no peso médio entre os locais de ocorrência desses animais, mas em geral, as fêmeas são de 10 a 20% menores que os machos (SEYMOUR, 1989). Almeida (1976) relata que no Pantanal Brasileiro o peso médio encontrado para os machos foi de 103Kg e para as fêmeas foi de 74Kg.

São animais de hábito solitário e territorial, podendo formar casais durante o período reprodutivo (OLIVEIRA, 1994). Suas atividades, de deslocamento e caça, são predominantemente noturno, sendo que nas demais horas há atividade local (RABINOWITZ; NOTTIGHAM, 1986). Sua alimentação consiste basicamente de pequenos roedores, antas, cervos do pantanal, catetos, queixadas e capivaras (EMMONS, 1990; LEITE, 1999). Áreas limítrofes de parques e reservas, onde há intensa atividade agropecuária foi observado que animais domésticos são utilizados como fonte de alimento, principalmente quando o acesso a esses animais é facilitado pela ausência de barreiras, como cercas (LEITE, 2001).

2.3 ASPECTOS DA FISIOLÓGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS DE ONÇA-PINTADA

De um modo geral, os felinos são animais polígamos, embora apresentem hábitos solitários, tanto machos como fêmeas copulam com um número variável de indivíduos do sexo oposto, esse pode ser um padrão adotado para aumentar o sucesso reprodutivo (KITCHENER, 1991).

Com base em observações comportamentais, alguns autores sugerem que a maturidade sexual ocorra entre 24 e 30 meses para fêmeas, e entre 36 e 40 meses para machos (WILTD, et al. 1979; MONDOLFI; HOOGESTEIJN, 1986; RABINOWITZ; NOTTINGHAM, 1986) de onça-pintada. O estro de fêmeas mantidas em cativeiro pode ocorrer durante 6 a 17 dias e o inter-estro de 22 a 65 dias (TEWES; SCHMIDLY, 1987), enquanto o ciclo estral pode variar de 22-65 dias (SADLEIR, 1966; WILTD, et al. 1979; TEWES; SCHMIDLY, 1987).

Durante a fase de estro, a fêmea atrai um ou mais machos por sinais olfatórios e auditivos e em poucos dias ocorrem muitas cópulas que, segundo Eaton (1978), chega a mais de 100 vezes por dia. O comportamento de cópula para essa espécie ainda não foi descrito, porém muito provavelmente deva se assemelhar o que é descrito para outras espécies de felinos selvagens (MELLEN, 1993) e domésticos (FELDMAN; NELSON, 1996). O macho imobiliza a fêmea receptiva por trás, mordendo primeiramente a região da nuca para em seguida realizar a monta, primeiro com o auxílio das patas anteriores e depois com os posteriores. A fêmea assume a posição de lordose e desvia a cauda lateralmente. O macho inicia movimentos copulatórios rápidos que duram poucos segundos (EATON, 1978). Em seguida, a fêmea se desprende do macho e inicia um vigoroso rolamento em decúbito dorsal que dura alguns segundos, seguido, tanto no macho como na fêmea, por lambedura da própria região urogenital (FELDMAN; NELSON, 1996).

A gestação dura de 90 a 112 dias (EWER, 1973; RODRIGUES; AURICCHIO, 1994) e geralmente nascem dois filhotes (SEYMOUR, 1989). A amamentação finda entre 5–6 meses, permanecendo com a mãe ainda por mais ou menos dois anos. Uma fêmea pode produzir de 4 a 8 filhotes durante a vida, considerando uma longevidade em vida livre de 11 anos, a idade da primeira cria de três a três anos e meio e a produção de 1 a 2 filhotes a cada ano (OLIVEIRA, 1994).

2.4 ESTABELECIMENTO DA PUBERDADE E CONTROLES ENDÓCRINOS PRÉ-PUBERAIS

A reprodução nos mamíferos é um processo complexo, dependente da condição orgânica do animal e de fatores ambientais associados, como a nutrição, a temperatura ambiente, a pluviosidade, o ciclo dia/noite e uma variedade de fatores sociais (BRONSON, 1985).

O período em que se inicia a atividade reprodutiva nos animais é chamado de puberdade, isto é, é a idade em que os órgãos reprodutores se tornam plenamente ativos e o animal passa a ser efetivamente fértil. A eficiência reprodutiva aumenta a medida que o animal atinge a maturidade plena. A idade em que a puberdade acontece em fêmeas de gato doméstico, é variável, dependendo de fatores, tais como, nutrição, manejo reprodutivo e até algumas doenças sistêmicas (JOHNSTON, et al., 2001; FELDMAN; NELSON, 1996).

Diversos autores sugerem que a puberdade para fêmeas de felinos domésticos ocorra entre 6 a 9 meses (JOHNSTON, et al., 2001; FELDMAN; NELSON, 1996; TSUTSUI; STABENFELDT, 1993; LITTLE, 2001). A eficiência reprodutiva diminui conforme os animais se tornam mais velhos, isso é indicado pela diminuição da taxa de

prenhez obtida, assim como por um aumento das taxas de perdas embrionárias, isso provavelmente é devido a mudanças histológicas e funcionais que ocorrem no útero de gatas velhas (JOHNSTON, et al., 1996).

Na maioria dos animais domésticos, a maturação do eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) do feto e sua adequação para o nascimento, são marcadas por um aumento na produção do cortisol fetal e traduzem um mecanismo de cooperação feto-materno que enseja o parto. O alto nível de cortisol circulante que antecede o parto resulta em alteração na esteroidogênese, com a ativação do sistema de enzimas placentárias que permite a conversão de progesterona (P_4) em estradiol (E_2). A produção aumentada de estrógenos maternos resulta em maior liberação de prostaglandinas e na produção de receptores de ocitocina no útero. As prostaglandinas causam luteólise em algumas espécies e promovem a dilatação da cérvix; juntamente com a ocitocina, promovem as contrações uterinas durante o parto (SIMPSON; HARVEY, 1998).

Após o nascimento, é observado um decréscimo fisiológico nos níveis de esteróides circulantes, refletindo o processo dinâmico da contenção da puberdade. E_2 e P_4 plasmáticos caem de níveis elevados logo após o nascimento para níveis basais na primeira semana de vida (NOGUEIRA et al., 1997). A atividade ovariana, após o nascimento, entra em um período de quiescência até próximo a puberdade, quando responde à dinâmica gonadotrófica da fase pré-puberal (SIMPSON; HARVEY, 1998).

Na maioria das espécies, inclusive em humanos, o fenômeno da puberdade envolve um aumento gradual da atividade dos órgãos reprodutivos. Na fêmea, considera-se, que os eventos que levam à puberdade iniciam-se ainda durante a vida fetal e incluem a morfogênese ovariana, a oogênese, a foliculogênese e a maturação do

heixo-hipotalâmico-hipofisário (HAFEZ, 1995). Segundo Day et al. (1984), observaram que flutuações endócrinas prévias ao desencadeamento da puberdade ocorrem em algumas espécies domésticas, nas quais os eventos hormonais relacionados com este processo ocorrem de modo progressivo.

Alguns autores observam que a puberdade em fêmeas de gato doméstico, ocorre por volta dos 6 a 10 meses de idade, havendo variações em função da nutrição, características hereditárias, de raça e do fotoperíodo (ROOTS et al., 1995; JOHNSTON et al., 2001; TSUTSUI; STABENFELDT, 1993; FELDMAN; NELSON, 1996 e LITTLE, 2001).

Com base no fotoperíodo, os animais são classificados em dois tipos: animais de dia longo, em que se incluem os felinos, cuja atividade sexual se manifesta após o solstício de inverno (dias longos); e os animais de dia curto, cuja atividade sexual se manifesta após o solstício de verão (dias curtos). Algumas raças de felinos domésticos, as modificações impostas pela domesticação foram tão intensas que os animais passaram a conceber e a parir em qualquer época do ano (JOHNSTON et al., 2001).

2.5 SAZONALIDADE E CICLOS OVARIANOS

As fêmeas felinas são classificadas como sendo poliétricas estacionais, dependendo do fotoperíodo, localização geográfica e condições nutricionais (FELDMAN; NELSON, 1996).

A sazonalidade reprodutiva é um exemplo de fator muito variável entre as espécies de felinos. Habitantes de regiões cuja latitude é alta, como os tigres siberianos (*Panthera tigris*), apresentam uma estação bem definida para nascimento de seus

filhotes, entre o verão e outono (SEAL et al., 1985). Espécies tropicais podem apresentar maiores concentrações de nascimentos durante determinadas épocas do ano, mas são normalmente capazes de se reproduzir durante o ano todo (EWER, 1975).

Em gatos domésticos o fenômeno da estacionalidade está intimamente ligado ao fotoperíodo (SHILLE et al., 1979, TSUTSUI; STABENFELDT, 1993; JOHNSTON et al., 1996) porém, em felinos selvagens, este fator pode também estar relacionado a maior oferta de alimento durante as estações do ano (EWER, 1975; BRONSON; HEIDEMAN, 1994).

Alguns autores relatam que o principal fator utilizado para prever as modificações do meio, é o fotoperíodo (BRONSON; HEIDEMAN, 1994; FELDMAN; NELSON, 1996). A glândula pineal atua como um transdutor neuroendócrino para converter o sinal luminoso num ciclo diário de secreção de melatonina (elevado a noite e baixo de dia). O comprimento da secreção noturna de melatonina reflete a duração da noite e regula a secreção pulsátil de hormônio liberador de gonadotrofinas do hipotálamo (MALPAUX et al., 1999). A melatonina pode atuar, ainda, diretamente sobre a adeno-hipófise, controlando a secreção de prolactina (JOHNSTON et al., 1996).

Poucas informações estão disponíveis quanto aos eventos reprodutivos da maioria dos felinos silvestres (WILTD, et al., 1979), tais conhecimentos são primordiais para que possamos obter sucesso na aplicação de técnicas de reprodução assistida, principalmente em espécies ameaçadas de extinção. O acompanhamento de sete ciclos estrais de onça-pintada (n=1), mostraram um período médio de estro de $12 \pm 1,0$ dias, enquanto o ciclo total durou $47,2 \pm 5,4$ dias (variando de 31 a 63). A duração do

ciclo ovariano é bem maior que a relatada para outras espécies de felinos, como a da jaguatirica $18,4 \pm 1,6$ dias (variando de 7-31 dias), gato maracajá $17,6 \pm 1,5$ dias (variando de 11-25 dias), gato do mato $16,7 \pm 1,3$ dias (variando de 11 a 27 dias) (MOREIRA, et al., 2001) e gato doméstico 14 –19 dias (WILDT, et al., 1978), exceto para o gato-mourisco $53,63 \pm 2,4$ dias (MELLEN, 1993).

O mecanismo da ovulação parece variar entre as diferentes espécies de felinos. Estudos que utilizaram dosagens hormonais séricas ou plasmáticas confirmam que alguns felinos selvagens como tigresas - *Panthera tigris* (SEAL et. al., 1985), leopardo das neves - *Panthera uncia* (SCHMIDT et al., 1993), e sussuaranas - *Puma concolor* (BONNEY et al., 1981), possuem mecanismo de ovulação induzida, assim como a gata doméstica - *Felis catus* (SHILLE et al., 1979 e JOHNSTON et al., 1996). Quanto a esta espécie, convém salientar que, apesar de estar estabelecida a prevalência de ovulações induzidas, comprovou-se que podem ocorrer eventuais ovulações espontâneas (LITTLE, 2001).

Alguns trabalhos sugerem também, a ocorrência de ovulação espontânea em algumas espécies de felinos silvestres. Fêmeas de leopardos – (*Panthera pardus*) apresentaram os dois mecanismos de ovulação em duas diferentes situações. Quando mantidas isoladas, mostraram perfil hormonal típico de ovuladoras reflexas, porém, quando alojadas em duplas de fêmeas, ovularam, provavelmente estimuladas pelo contato físico entre elas (SCHMIDT et al., 1998). Leoas (*P. leo*) isoladas de machos mostraram um padrão distinto dos demais felinos relatados. Schmidt et al. (1979) comprovaram por dosagens hormonais séricas e visualização do corpo lúteo, que esta espécie apresenta ovulação espontânea com frequência superior a outros felinos já descritos na literatura.

Moreira et al. (2001) acompanharam o perfil longitudinal, através da dosagem hormonal dos estrógenos e progestágenos fecais de três espécies da linhagem das jaguatiricas, e observaram que o gato - maracajá (*L. weddii*) apresentou ovulação reflexa.

Segundo Wildt et al. (1979), a ovulação da onça-pintada assemelha-se a do gato doméstico, sugerindo que muito provavelmente estes animais apresentem ovulação não espontânea, que podem ser induzidas pela cópula, ou pode ser induzida por tratamentos hormonais.

Morato, 2001, utilizando protocolos de superovulação que foram desenvolvidos para a utilização em experimentos com fêmea de tigre (*Panthera tigris*), produziram desenvolvimento folicular múltiplo, assim como induziu ovulação em fêmea de onça-pintada.

Durante a cópula desses animais, a estimulação vaginal transmite, via um nervo espinhal aferente, sinais nervosos a uma região do hipotálamo rica em hormônio liberador de gonadotrofinas e, em resposta a liberação deste hormônio, há um aumento substancial nas concentrações séricas do hormônio luteinizante, essencial para indução da ovulação (FELDMAN; NELSON, 1996). Níveis máximos de LH são obtidos quando há pelo menos 4 cópulas por dia, sendo que a ovulação ocorre 24 horas após a última (FELDMAN; NELSON, 1996).

Sob análise evolutiva, o processo de ovulação induzida ou espontânea pode estar relacionado com o grau de sociabilidade da espécie, entre outros fatores. Desta forma, os felinos que possuem hábitos solitários, evolutivamente necessitariam de um período de estro mais longo e ovócitos viáveis por mais tempo, a fim de que a ovulação

ocorresse imediatamente após o encontro entre machos e fêmeas na natureza (EWER, 1975).

Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas cinco fêmeas de onça-pintada (***Panthera onca***), sendo duas adultas e três pré-púberes, com padrão de coloração amarela com manchas pretas. Os animais foram divididos em dois grupos: animais adultos (grupo AA) e animais pré-púberes (grupo PP). Os animais adultos eram de procedência desconhecida. Eles eram mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo – FPZSP (AA-01) e na Fundação Rio-Zoo (FRZ) do Rio de Janeiro (AA-02), em recintos individuais no setor extra (área onde se mantém animal excedente) de cada zoológico, porém com contado visual e/ou olfativo com machos e fêmeas da mesma e de outras espécies.

No grupo PP, duas fêmeas eram da mesma ninhada, procedentes da Região do Rio Negro – Pantanal pertencentes ao Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”- Sorocaba/SP (PP 01 e PP 02). A idade média estimada dessas fêmeas era de 11 meses no início do experimento. Elas foram mantidas juntas com um macho, da mesma cria, no setor de exposição ao público. A terceira fêmea era procedente de Anaurilândia – MS (22°03'26"S e 52°29'57"W), pertencente ao Centro de Conservação da Fauna Silvestre Ilha Solteira – CESP/SP (PP 03). A idade média estimada para esta fêmea foi de 15 meses, no início do experimento. Ela foi mantida em recinto individual no setor de exposição ao público, porém com contato visual e olfativo com um macho da mesma ninhada.

Todos os animais estiveram expostos ao ambiente (fotoperíodo, temperatura e umidade do ar), tinham acesso livre a água e a dieta alimentar (Anexo I, Quadros 1,2 e 3) era oferecida à tarde conforme rotina empregada pelas instituições.

3.2 COLHEITA E TRANSPORTE DO MATERIAL FECAL

Para o monitoramento não invasivo da função ovariana foram colhidas amostras fecais, de 2 a 7 vezes por semana. A colheita das amostras obtidas do grupo AA foi realizada durante aproximadamente 18 meses, e no grupo PP durante aproximadamente 16 meses. Cada amostra recolhida foi acondicionada em coletores plásticos (5,0 ml) desenvolvidos especialmente para resistir a baixas temperaturas e para não permitir vazamentos ou penetrações de umidade. As amostras foram devidamente identificadas quanto ao número do animal e a data da colheita.

As amostras foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido (-196°C), até o momento do seu transporte para o Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) / FMVZ-USP, onde foi armazenado em freezer a - 20°C, até o descongelamento para realização do processo de extração hormonal.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Preparação das amostras

As amostras foram pesadas, liofilizadas em aparelho giratório tipo *speed vac* (Speed Vac SC110), Savant Instruments, Inc., NY, 11741-4306, USA) por 24 horas e

Material e Métodos

pesadas novamente para obtenção da porcentagem de umidade de cada amostra. A etapa de liofilização garantiu a padronização do peso do material fecal que foi utilizado.

Extração

Utilizou-se, na extração dos estrógenos e das progestinas fecais, a técnica de Brown et al. (1994).

Em tubos de ensaio de vidro (15ml), devidamente identificados, foram colocadas alíquotas de 0,2g de fezes secas, ao qual foram adicionados 5ml de etanol (Etanol, P.A.- Merck) a 90% (90% etanol:10% água destilada). Fez-se o aquecimento a 90°C em banho-maria (QUIMIS) dentro da capela do laboratório, até 25 minutos após iniciada a fervura. Durante esse tempo o etanol evaporado foi sendo gradativamente repostado para que nenhuma amostra ficasse seca. Após a fervura, o volume final em cada tubo foi de 5ml. O material foi homogeneizado em aparelho vortex (Phoenix, MOD AT 56) e, a seguir, centrifugado a 500g por 15 minutos (QUIMIS). Ao final, o sobrenadante foi transferido para tubos limpos. O pellet resultante desta primeira centrifugação foi homogeneizado novamente em 5ml de etanol 90%, sendo agitado por 30 segundos e centrifugado por 15 minutos. Os dois sobrenadantes foram, então, combinados num único tubo e secos por completo no fluxo (LÁCTEA) sob ar comprimido (MSI 5,2 ML/100). O extrato seco resultante foi reconstituído em 1ml de metanol (Metanol, P.A. Merck), através de agitação no aparelho Multi Vortex (VWR Scientific products, VX – 2500) por 5 minutos. Esse extrato foi levado para o banho-ultrassônico (Ultra Sonic Cleaner, USC – 1450 –Unique) por 15 minutos, sendo, em seguida armazenado em freezer (-20°C) onde permaneceu até a etapa de dosagem hormonal. Nesta etapa, as amostras foram diluídas em tampão gelatina [NaPO₄ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica

Material e Métodos

(1,0g) e água destilada (1000ml), pH 7,0], em proporções que variaram de 1/10 a 1/40 (Anexo II ,Figuras 1 a 7).

Recuperação

O monitoramento da eficiência da extração foi realizado em dois laboratórios distintos. A recuperação do estradiol marcado ^3H (Estradiol – 2,4- ^3H , code E9767- Sigma-250 μCi) foi realizada no Laboratório de Endocrinologia da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, e a progesterona marcada ^3H ([1,2,6,7,16,17- ^3H] Progesterone code TRK 641- Pack Size-250 μCi) foi recuperada no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA-Campus Pirassununga/FMVZ-USP.

Em cada tubo de extração foram adicionados 100 μl de cada hormônio marcado com atividade ~ 7.000 cpm. Ao final do procedimento, um alíquota de 100 μl do extrato reconstituído em metanol era transferido para tubos contendo 2ml de líquido de cintilação (Opttiphase “HiSafe”3 – Wallac Scintillation Products) e levado para contagem em contador β (Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzers 1900TR, Packard Instrument Co., CT, 06450, USA).

O percentual de recuperação foi calculado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{recuperação} = \frac{10 \times \text{cpm da amostra}}{\text{cpm do controle}} \times 100$$

3.4 DOSAGENS HORMONAIS

Para dosagem dos estrógenos e das progestinas fecais utilizou-se a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (COAT-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de progesterona (P_4) e estradiol (E_2) no soro humano.

Este conjunto diagnóstico utiliza como elemento traçador o hormônio marcado com ^{125}I e apresenta pouca reação cruzada com os metabólitos específicos para cada hormônio estudado. Foram determinados 10 ensaios para as dosagens hormonais de cada hormônio pesquisado. Para verificação do coeficiente de variação, foi utilizado um “pool” de amostras fecais em todos os ensaios hormonais.

Todos os parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais foram analisados conforme rotina empregada no LDH.

Validação

Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais DPC MEDLAB® para uso em extrato de fezes de fêmeas de onça-pintada utilizando-se dois métodos de paralelismo, descrito abaixo.

Paralelismo utilizando matriz depletada: Indica se os hormônios da espécie estudada estão interagindo com o anticorpo do conjunto diagnóstico de forma similar ao hormônio usado como padrão.

Foi realizada a depleção hormonal de um “pool” de amostras com uma solução de carvão-dextran (DARBRE et al, 1983; REDDEL et al, 1984). A essa matriz depletada

Material e Métodos

adicionamos valores conhecidos do hormônio padrão, com diluições que se aproximavam dos pontos da curva do conjunto diagnóstico. Com esta diluição construímos uma curva correlacionando estes valores.

Paralelismo utilizando matriz íntegra: indica se o material utilizado está interferindo na ligação antígeno – anticorpo.

Foi utilizado um “pool” de amostras de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva padrão). A esta amostra adicionamos valores conhecidos de P4 e E2, a fim de aproximá-los dos pontos da curva padrão fornecida pelo conjunto diagnóstico.

Validação Fisiológica

Realizamos a validação fisiológica através da comparação dos resultados de estrógenos e progestinas fecais, obtidos no grupo dos animais pré-púberes (fase antes do início da atividade ovariana), com os resultados obtidos no grupo dos animais adultos.

Transformação das concentrações determinadas por RIE

As concentrações determinadas primariamente por RIE foram expressas para progesterona em ng/ml e para estradiol em pg/ml. Para melhor adequação dos resultados ao extrato do qual ele foi obtido, foi necessária sua conversão para $\mu\text{g/g}$ de fezes secas e ng/g de fezes secas, respectivamente. Portanto, os resultados obtidos foram transformados pela seguinte equação:

Material e Métodos

$$CF = \frac{C \times Vfe \times D \times [1 + (1-R)]}{Pi} / 1000$$

CF = concentração final;

C = concentração fornecida pelo RIE;

Vfe = volume das fezes ao final da etapa de extração;

D = diluição empregada;

R = taxa da recuperação obtida para cada hormônio extraído.

Pi = peso inicial

3.5 CICLOS OVARIANOS

Os valores dos estrógenos fecais encontrados para cada fêmea adulta, nas fases de estro e inter-estro, foram calculados por um processo matemático sucessivo, onde os valores que excediam a média total $\pm 1,5$ desvio padrões, eram excluídos (Brown et al., 1996). Seguiu-se então, uma nova etapa onde os valores eram recalculados, sendo o processo repetido até que os valores de cada etapa não excedessem a média $\pm 1,5$. O critério adotado para determinar o limite entre valores basais e não basais, foi a intensidade da queda, ou seja, quando a diferença entre dois valores sucessivos da média $\pm 1,5$ ficou inferior a 5,0 (Anexo III, Figura 1).

Os valores basais foram determinados após a exclusão das amostras de concentração alta. Os valores altos excluídos foram agrupados, e os valores observados que permaneceram altos por três dias consecutivos foram considerados como pico. Para a avaliação das progestinas fecais, foi adotado o mesmo procedimento acima descrito, no entanto, foi considerado a média total $\pm 2,0$ desvios padrões. Para a avaliação da ocorrência da ovulação, foram considerados valores de progestinas fecais que permaneceram elevados por, pelo menos, uma semana.

Material e Métodos

A duração do estro foi calculada pelo número de dias em que o estrógeno permaneceu acima dos valores basais, e a extensão do ciclo ovariano foi determinada entre os valores de dois picos consecutivos.

Alinhamento dos ciclos

O alinhamento dos ciclos foi feito considerando-se o dia zero (D0) como o primeiro valor basal de estrógenos fecais. Assim, os dias que antecederam o D0, correspondem à fase de estro e os dias seguintes correspondem à fase de inter-estro.

Atividade ovariana no grupo PP

Como os valores das concentrações de estrógenos fecais encontrados no grupo PP eram basais, optou-se por fazer uma análise bimestral, até que fosse detectado o início da atividade ovariana.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis foram primeiramente analisadas quanto a sua distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (teste KS) para verificação de normalidade dos resíduos e pelo teste de Bartlett, para verificação de homogeneidade das variâncias. Como os valores não obedeceram as premissas para a utilização de testes paramétricos, foram utilizados os teste não paramétricos Kruskal-Wallis e Wilcoxon (SIEGEL, 1975).

Os dados referentes às concentrações hormonais foram expressos em função das suas médias ($\pm$ erro padrão da média) para as fêmeas da espécie estudada.

Material e Métodos

Para verificação de paralelismo nos métodos empregados na validação dos radioimunoensaios, foi realizado uma análise de regressão simples e o índice de correlação adotado superior a 0,95 (GRAHAM, 2001).

Para a análise da validação fisiológica, as médias das concentrações dos estrógenos e progestinas fecais do grupo PP (n=3) foram comparadas pelo teste de Wilcoxon com a média das concentrações das fêmeas adultas (n=2).

Para avaliar o efeito bimestre sobre o início da atividade ovariana, foram analisadas as concentrações médias dos estrógenos fecais (ng/g de fezes secas) quanto a sua distribuição pelo teste Kruskal-Wallis, e para comparação entre médias, dois a dois, aplicou-se o teste de Wilcoxon.

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO

Foram utilizadas 953 amostras fecais, sendo 509 para o grupo AA e 444 para o grupo PP. O percentual médio da recuperação hormonal obtido, para estrógenos fecais foi de $80 \pm 4,05$ (n=100) e para progestinas fecais foi de $89 \pm 6,09$ (n=50).

4.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS

O controle de qualidade dos ensaios de RIE, foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio, que foi inferior a 13% e inter-ensaio, inferior a 2,1%. A sensibilidade mínima detectada foi de 1,47pg/ml nos ensaios para estrógenos fecais, e de 0,005ng/ml para progestinas fecais (Quadros 1 e 2). O “pool” de amostras fecais utilizado em todos os ensaios evidenciou um coeficiente de variação menor que 12% entre os ensaios de estrógenos fecais, e menor que 7% entre os ensaios de progestinas fecais.

Resultados

Quadro 1 - Controle de qualidade obtido nos ensaios de estrógenos fecais. São Paulo, 2003.

Ensaio	Controle				CPM	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
	C1	C2	C3	C4	ponto 0	total	BFB0	(%)	% (dose pg/ml)	Baixo	Alto
1	28,03	1761,30	33,59	1893,30	12918,8	29501,8	44%	1,00%	92,3(1,94)	12,78%	5,11%
2	26,12	1600,40	21,94	1577,50	12603,3	28963,3	44%	0,99%	93,0(1,47)	12,29%	1,02%
3	22,63	1759,40	22,02	1664,20	13412,3	22257,8	60%	1,20%	96,1(1,88)	1,95%	3,93%
4	21,28	1948,00	20,83	1720,80	13353,8	22234,3	60%	1,23%	93,8(3,82)	1,52%	8,76%
5	11,48	1606,00	10,96	1714,60	13122,3	21366,3	61%	1,27%	94,2(2,36)	3,32%	4,63%
6	22,67	1730,10	22,52	1743,70	12458,8	20407,3	61%	1,35%	93,5(3,68)	0,47%	0,55%
7	23,94	1793,60	25,01	1838,50	12316,8	19980,8	62%	1,36%	94,3(2,01)	3,09%	1,75%
8	17,80	1666,20	18,48	1898,20	12526,3	25265,3	50%	0,91%	92,1(1,78)	2,64%	9,20%
9	21,74	2098,90	25,50	1756,60	11531,8	23104,3	50%	0,85%	97,4(3,05)	11,28%	12,56%
10	14,56	2001,70	14,00	1871,20	9510,3	18878,8	50%	0,94%	87,6(4,48)	2,79%	4,77%
CV Inter ensaio	21,02	1796,56	21,48	1767,86						1,53%	1,14%

Quadro 2 - Controle de qualidade obtido nos ensaios de progestinas fecais. São Paulo, 2003.

Ensaio	Controle				CPM	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
	C1	C2	C3	C4	ponto 0	total	BFB0	(%)	% (dose ng/ml)	Baixo	Alto
1	0,10	21,99	0,11	20,86	18400,8	34137,8	54%	0,52%	95,4(0,005)	5,15%	3,73%
2	0,10	19,81	0,09	19,94	17692,3	32640,8	54%	0,56%	93,4(0,01)	2,14%	0,48%
3	0,09	19,11	0,09	20,96	16740,8	30787,3	54%	0,53%	94,5(0,01)	3,84%	6,54%
4	0,15	20,34	0,16	21,08	20584,8	36967,8	56%	0,56%	94,8(0,03)	2,64%	2,55%
5	0,09	21,39	0,10	21,00	20552,8	36563,3	56%	0,59%	94,9(0,01)	7,63%	1,32%
6	0,13	20,37	0,11	20,32	20680,8	36182,8	57%	0,49%	94,9(0,01)	11,46%	0,17%
7	0,13	21,42	0,12	19,89	18620,8	32568,3	57%	0,47%	94,1(0,03)	4,08%	5,24%
8	0,50	21,71	0,51	22,65	15191,8	27834,3	55%	1,19%	93,9(0,01)	0,74%	3,01%
9	0,17	20,59	0,17	19,33	25532,8	48143,8	53%	0,50%	93,9(0,006)	1,06%	4,46%
10	0,52	19,97	0,58	18,12	17220,8	31787,3	54%	0,69%	96,8(0,008)	7,51%	6,85%
CV Inter ensaio	0,20	20,67	0,21	20,42						2,09%	0,87%

Resultados

4.3 VALIDAÇÃO

Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais da DPC MEDLAB^R em fase sólida, para uso em extratos fecais em onça-pintada. Os resultados obtidos para verificação de paralelismo nos métodos empregados estão representados nas Figuras 1 a 4.

Figura 1 Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estrógenos fecais utilizando a matriz depletada. São Paulo, 2003.

Resultados

Figura 2 Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estrógenos fecais utilizando a matriz íntegra. São Paulo, 2003.

Figura 3 Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progestinas fecais utilizando a matriz depletada. São Paulo, 2003.

Resultados

Figura 4 Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progestinas fecais utilizando a matriz íntegra. São Paulo, 2003.

4.3.1 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA

As médias das concentrações dos esteróides sexuais são apresentados nas tabelas 1 e 2, e Figuras 5 e 6. Houve diferença significativa entre as concentrações médias de estrógenos fecais e entre as concentrações de progestinas fecais ($p < 0,001$) dos grupos PP e AA.

Resultados

Tabela 1 Concentração média dos estrógenos fecais (ng/g de fezes secas) do grupo das fêmeas pré-púberes (n=3) comparada com a média das concentrações das fêmeas adultas (n=2). São Paulo, 2003.

Grupo	Estrógenos fecais (ng/g de fezes secas)	
	Média ($\pm$ EPM)	Variação
PP (n=262)	10,97 $\pm$ 0,91 ^a	0,28 – 59,16
AA (n=509)	68,99 $\pm$ 6,55 ^b	3,50 – 609,37

^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente ($p < 0,001$).

Resultados

Tabela 2 Concentração média das progestinas fecais ($\mu\text{g/g}$ de fezes secas) do grupo das fêmeas pré-púberes ($n=3$) comparada com a média das concentrações das fêmeas adultas ($n=2$). São Paulo, 2003.

Grupo	Progestinas fecais ($\mu\text{g/g}$ de fezes secas)	
	Média ($\pm\text{EPM}$)	Variação
PP ($n=262$)	$0,26 \pm 0,04^a$	0,02 – 4,44
AA ($n=509$)	$0,85 \pm 0,09^b$	0,08 – 6,51

^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente ($p < 0,001$).

Resultados

^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos, em diferentes colunas, diferem significativamente ($p < 0,001$).

Figura 5 Concentração média ($\pm$ EPM) de estrógenos fecais (ng/g de fezes secas), nos diferentes grupos. São Paulo, 2003.

Resultados

^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos, em diferentes colunas, diferem significativamente ($p < 0,001$).

Figura 6 Concentração média ($\pm$ EPM) de progestinas fecais ($\mu\text{g/g}$ de fezes secas), nos diferentes grupos. São Paulo, 2003.

Resultados

4.4 CICLOS OVARIANOS

Neste trabalho, a duração média ($\pm$ EPM) do ciclo ovariano ($n=7$) definido por dois picos consecutivos de estrógenos fecais foi de $38,28 \pm 2,52$ dias, variando de 25 a 44 dias (Figura 7).

P = valor de [] máxima de estrógenos fecais (ng/g de fezes secas)

Figura 7 Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) dos estrógenos fecais de fêmeas de onça-pintada ($n=2$) e da extensão do ciclo ovariano ($n=7$) verificado entre dois picos consecutivos. São Paulo, 2003.

Resultados

Foi possível, a detecção de cinco ciclos ovarianos completos no animal AA 01(FPZSP) e a extensão verificada entre os dois picos consecutivos de estrógenos fecais foi de $36,20 \pm 3,09$ dias, variando de 25 a 41 dias (Figura 8).

P = valor de [] máxima de estrógenos fecais (ng/g de fezes secas)

Figura 8 Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) dos estrógenos fecais de fêmea de onça-pintada animal AA 01 e a extensão do ciclo ovariano (n=5) verificado entre dois picos consecutivos. São Paulo, 2003.

Resultados

Em relação ao animal AA 02 (FRZ), só foi possível a detecção de dois ciclos ovarianos completos, devido a uma falha na colheita das amostras. A extensão verificada entre dois picos consecutivos de estrógenos fecais foi de $43,50 \pm 0,50$ dias, variando de 43 a 44 dias (Figura 9).

P = valor de [] máxima de estrógenos fecais (ng/g de fezes secas)

Figura 9 Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) dos estrógenos fecais de fêmea de onça-pintada animal AA 02 e a extensão do ciclo ovariano (n=2) verificado entre dois picos consecutivos. São Paulo, 2003.

Resultados

A partir do alinhamento, utilizando-se a média de cada dia dos ciclos estudados e considerando-se o erro padrão da média, foi calculada a duração de cada fase do ciclo. A fase de estro teve duração média de $10,42 \pm 1,15$ dias (variando de 7 a 15 dias) e a fase de inter-estro durou em média $28,00 \pm 1,43$ dias (variando de 28 a 31 dias). Foram então elaborados os gráficos correspondentes das concentrações de estrógenos e progestinas fecais.

Os níveis basais médios de estrógenos fecais do ciclo ovariano ($n=7$) variaram na faixa de 15,38 a 48,82ng/g de fezes secas, tendo como média $31,26 \pm 1,34$ ng/g de fezes secas na fase de inter-estro. O perfil indicou a ocorrência de um pico observado entre o D-5 e o D-2, variando de 154,18 a 169,43ng/g de fezes secas (todos os pontos apresentando valor superior a 50% a partir da média basal por, no mínimo, três dias consecutivos). Foi detectado um início de elevação a partir do D-15 do ciclo (66,30ng/g de fezes secas), e a média dos níveis de estrógenos fecais na fase de estro foi de $115,91 \pm 8,82$ ng/g de fezes secas (Figura 10).

Resultados

Figura 10 Representação gráfica das concentrações (média $\pm$ EPM) de estrógenos fecais de fêmeas adultas de onça-pintada ($n=2$) diferenciando-se as fases de estro e inter-estro durante sete ciclos ovarianos (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.

Resultados

Os níveis basais de estrógenos fecais para o animal AA 01, variaram entre 15,38 e 49,47ng/g de fezes secas, tendo como média $31,19 \pm 1,52$ ng/g de fezes secas na fase de inter-estro. Na fase de estro os valores variaram entre 67,31 a 166,57ng/g de fezes secas, tendo como média $121,28 \pm 9,07$ ng/g de fezes secas na fase de estro (Figura 11).

Figura 11 Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) de estrógenos fecais de fêmea de onça-pintada animal AA 01 diferenciando - se as fases de estro e inter-estro durante cinco ciclos ovarianos (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.

Resultados

Para o animal AA O2, os níveis basais de estrógenos fecais, variaram entre 15,40 e 68,55ng/g de fezes secas, tendo como média $31,68 \pm 2,30$ ng/g de fezes secas na fase de inter-estro, e na fase de estro os valores variaram entre 64,70 e 213,05ng/g de fezes secas, tendo como média $125,30 \pm 13,23$ ng/g de fezes secas na fase de estro (Figura 12).

Figura 12 Representação gráfica dos níveis hormonais (média $\pm$ EPM) de estrógenos fecais de fêmea de onça-pintada animal AA 02 diferenciando-se as fases de estro e inter-estro durante dois ciclos ovarianos (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.

Resultados

Os valores médios encontrados para a concentração de progestinas fecais foram de $0,44 \pm 0,05\mu\text{g/g}$ de fezes secas na fase de estro, e de $0,45 \pm 0,04\mu\text{g/g}$ de fezes secas na fase de inter-estro. Não havendo diferença significativa entre as duas fases (Figura 13).

Figura 13 Representação gráfica da variação das concentrações (média $\pm$ EPM) das progestinas fecais durante sete ciclos ovarianos de fêmeas adultas de onça-pintada ($n=2$) diferenciando-se a fases de estro e inter-estro. (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.

Resultados

Os padrões hormonais de estrógenos e progestinas fecais constam na Figura 14 e no Quadro 3.

→ Indica o Dia 0

Figura 14 Representação gráfica da variação das concentrações (média $\pm$ EPM) de estrógenos e progestinas fecais durante sete ciclos ovarianos de fêmeas adultas de onça-pintada (n=2) diferenciando-se as fases de estro e inter-estro (D0 = primeiro valor basal de estrógenos fecais). São Paulo, 2003.

Resultados

Quadro 3 Concentrações médias ($\pm$ EPM) dos valores basais e de pico dos estrógenos e progestinas fecais para cada indivíduo adulto durante 18 meses de colheita. São Paulo, 2003.

Grupo	Estógenos fecais		Progestinas fecais	
	Valores Basais (ng/g fs)	Pico (ng/g fs)	Valores Basais (μ /g fs)	Pico (μ /g fs)
AA 01 (n=380)	31,06 $\pm$ 1,30	120,34 $\pm$ 11,82	0,44 $\pm$ 0,25	ND
AA 02 (n=129)	24,35 $\pm$ 2,68	174,13 $\pm$ 18,70	1,65 $\pm$ 0,31	ND

ND não detectado; fs = fezes secas

4.5 GRUPO PRÉ-PÚBERE

A partir dos resultados obtidos das análises hormonais, o animal PP03 foi considerado como modelo biológico para os outros animais pré-púberes (PP01 e PP02), pois durante a avaliação do perfil longitudinal das concentrações de estrógenos fecais, foi possível visualizar a diferença biológica entre o período pré-púbere e o período púbere (Tabelas 3 e 4, Figuras 15 e 16). Esse foi o parâmetro utilizado para indicar um possível início da atividade ovariana nos três animais, pois a partir do bimestre agosto-setembro, foram detectados picos de estrógenos fecais (Tabela 5 e Figura 17).

Todos os animais entraram na fase peripuberal, com idade aproximada de 20 meses (18-20 meses de idade).

Resultados

Tabela 3 Concentrações médias dos estrógenos fecais (ng/g de fezes seca) encontrados na avaliação do perfil longitudinal (16 meses) durante o período pré-púbere (pp) e púbere (p) do animal PP03. São Paulo, 2003.

Período	Estrógenos fecais (ng/g de fezes secas)	
	Média $\pm$ EPM	Variação
pp (n=109)	6,11 $\pm$ 0,41	0,28 – 29,99
p (n=165)	20,21 $\pm$ 2,15*	0,80 – 177,09

*p< 0,05, referente a comparação entre os períodos pp e p.

Tabela 4 Concentrações médias dos progestinas fecais (μ g/g de fezes secas) encontrados na avaliação do perfil longitudinal (16 meses) durante o período pré-púbere (pp) e púbere (p) do animal PP03. São Paulo, 2003.

Período	Progestinas fecais (μ g/g de fezes secas)	
	Média $\pm$ EPM	Variação
pp (n=109)	0,10 $\pm$ 0,003	0,02 – 0,23
p (n=165)	0,19 $\pm$ 0,020*	0,01 – 1,56

*p> 0,05, referente a comparação entre os períodos pp e p.

Resultados

Figura 15 Representação gráfica do perfil longitudinal encontrado durante as dosagens de estrógenos fecais para o animal PP 03, evidenciando a detecção do início da atividade ovariana (IAO). São Paulo, 2003.

Figura 16 Representação gráfica do perfil longitudinal encontrado durante as dosagens de progestinas fecais para o animal PP 03, evidenciando a detecção do início da atividade ovariana (IAO). São Paulo, 2003.

Resultados

Tabela 5 Concentração média ($\pm$ EPM) dos valores máximos (n=15) encontrados para estrógenos fecais a cada bimestre, até a detecção do início de atividade ovariana para o grupo PP (n=3). São Paulo, 2003.

Período	Estrógenos fecais (ng/g de fezes secas)	
	Média $\pm$ EPM	Variação
Fev-Mar (n=15)	24,13 $\pm$ 3,97 ^a	6,24 – 42,89
Abr-Mai (n=15)	23,63 $\pm$ 2,65 ^a	10,61 – 40,89
Jun-Jul (n=15)	19,75 $\pm$ 1,55 ^a	6,39 – 33,69
Ago-Set (n=15)	49,89 $\pm$ 11,58 ^b	19,72 – 140,75

^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente (p< 0,05)

Resultados

^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos, em coluna diferente, diferem significativamente ($p < 0,05$)

Figura 17 Representação gráfica da média ($\pm$ EPM) dos valores máximos ($n=15$) encontrados para estrógenos fecais a cada bimestre até a detecção do início de atividade ovariana para o grupo PP ($n=3$). São Paulo, 2003.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A finalidade deste trabalho foi elucidar os fenômenos endócrinos, relacionados à atividade ovariana, através do monitoramento não-invasivo (BROWN; WILDT, 1997). Foram descritos a duração do ciclo ovariano, fase de estro e inter-estro, provável início de atividade ovariana e puberdade.

Encontramos na literatura, diversos trabalhos que validaram o uso de ensaios hormonais para extratos de fezes em felinos silvestres (SHILLE et al., 1991; BROWN et al., 1994, 1995, 1996; CZEKALA et al., 1994, GRAHAM et al., 1995; MOREIRA et al., 2001). Outros validaram o uso de conjunto diagnóstico comercial para radioimunoensaio para quantificação de metabólitos de hormônios fecais, tanto em felinos como em outras espécies de mamíferos (MORATO, 2001; MORAIS et al., 2002; GRAHAM; BROWN, 1996; MATSUMURO et al. 1999; GROSS; RODDEN, 1991). Com base nos resultados obtidos nesse experimento, podemos sugerir que o conjunto diagnóstico comercial utilizado nos ensaios de esteróides fecais foi validado de forma satisfatória para o uso em extratos de fezes em fêmeas de onça-pintada.

Os ciclos ovarianos observados nas fêmeas adultas, desse experimento, tiveram uma duração média de $38,28 \pm 2,52$ dias, considerando o intervalo entre dois picos de estrógenos consecutivos, e pelo alinhamento dos ciclos ovarianos obtivemos uma duração média de $38,42 \pm 1,13$ dias. Os resultados foram semelhantes nos diferentes métodos empregados, sendo que, pelo alinhamento dos ciclos, foi possível uma melhor visualização das fases de estro e inter-estro.

A duração média do ciclo ovariano de 38 dias teve o valor aproximado ao citado na literatura de $47,2 \pm 5,4$ dias ($n=7$) (WILDT et al., 1979) por meio da observação

Discussão

comportamental associada à ovulação induzida artificialmente com tratamento hormonal à base de hCG e LH-RH.

Os dados obtidos em relação à variação encontrada na extensão do ciclo ovariano de 22 a 44 dias, foram compatíveis ao que é relatado para a espécie, com variação de 22 a 65 dias (SADLEIR, 1966; WILTD et al., 1979, TEWES; SCHMIDLY, 1987) baseados em observações comportamentais de onças-pintadas, mantidas em cativeiro.

Os resultados mostraram que após a ocorrência de um pico de estrógenos fecais, observados entre o D-5 e o D-2, com concentrações variando entre 154,18 a 169,43ng/g de fezes secas, os níveis de estrógenos fecais foram caracterizados como basais a partir do D0 do ciclo, com concentrações variando entre 15,38 a 48,82ng/g de fezes secas. Nossos dados estão de acordo com os valores relatados por Brown et al. (1994, 1995 e 1996) para algumas espécies de felinos (*Panthera uncia*, *Neofelis nebulosa* e *Acinonyx jubatus*), onde os valores basais encontrados para estrógenos fecais foram <50,00ng/g e os valores de pico <500,00ng/g. Moreira et al. (2001), encontraram valores de estrógenos fecais mais elevados para pequenos felinos (*Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* e *Leopardus tigrina*), sendo os valores basais >60ng/g e de pico >800ng/g, sugerindo uma tendência dos pequenos felinos apresentarem concentrações mais elevadas de estrógenos fecais do que grandes felinos.

Em média as concentrações de estrógenos fecais observadas nos dias de pico no presente estudo foram menores do que as encontradas na literatura, embora o valor máximo detectado nos ensaios hormonais realizados durante esse experimento fosse de 609,37ng/g de fezes secas.

Brown et al. (1994) submeteram suas amostras fecais de algumas espécies de felinos (*Felis catus*, *Neofelis nebulosa*, *Acinonyx jubatus*, *Panthera uncia*), à técnica de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance), sugerindo que o metabolismo de esteróides se manteve semelhante dentro deste táxon.

Em relação aos dados obtidos para progestinas fecais, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores obtidos na fase de estro ($0,44 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$ de fezes secas), e os valores obtidos na fase de inter-estro ($0,45 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ de fezes secas).

Foi possível a observação de elevações destas progestinas, porém elas não se sustentaram, apresentando um perfil oscilatório. Diante disso, não estabelecemos correlações com possíveis eventos biológicos. Nosso resultado foi compatível com o esperado para a espécie, que apresenta ovulação induzida segundo relatado por WILDT et al., 1979.

No entanto, deve ser considerada a hipótese de que o anticorpo de alta especificidade do conjunto diagnóstico comercial para progesterona sérica não esteja sendo eficiente na detecção dos metabólitos. Alguns trabalhos, utilizando anticorpo pouco específico de progesterona com elevada porcentagem de reação-cruzada com os principais metabólitos do grupo dos pregnanes (cadeia α e β), conseguiram relacionar os seus dados com os eventos biológicos (BROWN et al., 1994 e MOREIRA et al., 2001)

Os animais desse experimento podem ter apresentado uma fase de diestro, a qual não foi possível ser detectada pelo conjunto diagnóstico comercial utilizado. Para comprovar tal proposição, seriam necessários estudos direcionados para a análise dos

principais metabólitos de progesterona, como os citados nos trabalhos da Brown et al., 1994; Graham et al., 2001 e Lance et al., 2001.

Segundo estudos realizados em fêmeas de espécies de felinos silvestres *Puma concolor* (BONNEY et al., 1981), *Panthera tigris* (SEAL et al., 1985), *Panthera uncia* (SCHIMIDT et al., 1993) e *Felis catus* (SHILLE et al., 1979 e JOHNSTON et al., 1996), esses animais possuem mecanismo de ovulação induzida.

Entretanto, apesar da prevalência de ovulação reflexa, estudos recentes evidenciaram que gatas domésticas podem apresentar ovulações espontâneas. Estes estudos indicam que a ovulação espontânea pode ser possível em resposta a uma variedade de estímulos que podem ser tátil, visual, olfatório ou auditivo (LITTLE, 2001).

Alguns trabalhos sugerem também, a ocorrência de ovulação espontânea em algumas espécies de felinos silvestres *Panthera pardus* – Schmidt et al., 1998; *Panthera leo* - Schmidt et al., 1979; *Leopardus wiedii* – Moreira et al., 2001 e *L. pardalis* e *L. tigrinus* – Moreira¹, 2003 (informação verbal).

Em outra etapa do presente trabalho, foram avaliados os dados obtidos do perfil longitudinal das concentrações de estrógenos fecais, no grupo dos animais pré-púberes, os quais indicam um possível início da atividade ovariana a partir do bimestre agosto-setembro, onde a média dos valores dos picos detectados foram de 135,31 $\pm$ 3,16ng/g de fezes secas.

Esse possível início da função-ovariana detectada na transição das estações inverno/primavera, parecem indicar uma sincronia com os dados obtidos em machos de onça-pintada, em relação as concentrações de andrógenos fecais que foram maiores na primavera e verão, quando comparados ao outono e ao inverno (MORATO, 2001).

Nas regiões dos trópicos, a sazonalidade reprodutiva em decorrência da influência das estações do ano, não é tão evidente quanto a observada em animais que habitam regiões de clima temperado (NOWAK, 1999). Contudo, as disponibilidades de alimentos podem impor ritmos sazonais à reprodução (BRONSON, 1985).

O período reprodutivo pode ocorrer o ano todo, sem uma época definida (MONDOLFI; HOOGESTEIJN, 1986; RODRIGUES; AURICCHIO, 1994), mas alguns picos reprodutivos foram observados com base em observações realizadas em Belize de maio a setembro (RABINOWITZ; NOTTINGHAM JR, B.G., 1986), na Venezuela de dezembro a fevereiro (MONDOLFI; HOOGESTEIJN, 1986) e no extremo norte do México durante a primavera (EWER, 1973). No Brasil, onde as variações fotoperiódicas são mínimas, os nascimentos ocorrem durante o ano todo. Morato (2001), supõe com base nas observações relatadas por Quigley e Crawshaw (1999), que provavelmente ocorra uma certa concentração de atividade reprodutiva na primavera/verão, quando os índices pluviométricos e disponibilidade de alimentos são mais abundantes.

Wildt et al (1979) e Mondolfi e Hoogesteijn (1986), indicam que a maturidade sexual nessa espécie, obtida através de observações comportamentais como a manifestação de estro, ocorre por volta dos 24 a 30 meses. Com base nos resultados deste experimento, observamos que os animais pré-púberes entraram em puberdade com idade estimada em 20 meses. Não realizamos acompanhamento de comportamentos reprodutivos, porém podemos sugerir que durante a fase peripuberal provavelmente esses animais não manifestaram comportamento de estro,

Não encontramos na literatura consultada, trabalhos que relatassem essa fase de instalação da puberdade em felinos silvestres.

De Lucia (2002), observou que a primeira ovulação em novilhas Nelore do seu experimento (n=36), não foi precedida de sinais de estro.

Nogueira (1997) observa que potras (n=9), não manifestaram estro na primeira estação de monta, mas apresentaram estro de menor intensidade na segunda estação reprodutiva, em comparação aos ciclos estacionais observados em animais adultos.

Wildt et al (1981), relatam que metade das cadelas púberes (n=4) que tiveram a primeira ovulação confirmada por exame laparoscópico, não demonstraram comportamento de estro, sugerindo que ocorre uma insuficiência ou uma irregularidade hormonal na fase peripuberal desses animais.

Estudos em fêmeas de gatos domésticos sugerem o início da puberdade em animais com idade entre 8 a 10 meses, variando de acordo com a raça e o peso corpóreo (ROOTS et al., 1995; JOHNSTON et al., 2001; TSUTSUI; STABENFELDT, 1993; FELDMAN; NELSON, 1996 e LITTLE, 2001).

Não foi objeto deste estudo avaliar as condições corpóreas dos animais pré-púberes. Porém, alguns autores já afirmaram para outras espécies, a necessidade de uma condição adequada de manejo e alimentação para instalação da puberdade (NOGUEIRA, 1994 e DE LUCIA, 2002).

Durante a fase do experimento, a fêmea púbere (PP 03) teve o seu perfil endócrino acompanhado até idade aproximada de 31 meses e a ciclicidade observada não foi similar à das fêmeas adultas.

Little (2001), indica que nove fêmeas púberes tiveram sua ciclicidade rapidamente estabelecida, semelhante a gatas adultas.

Wesson e Ginther (1981), sugerem para potras, que a partir da puberdade estabelecida, seus ciclos são similares aos das éguas adultas.

Discussão

No presente estudo todas as fêmeas mantiveram contato com machos, durante o experimento, sendo que as fêmeas pré-púberes tiveram contato somente com machos também pré-púberes.

Segundo Little (2001) a presença do macho adulto estimulou a ovulação espontânea em fêmeas múltiparas e o início da atividade ovariana em fêmeas nulíparas. Porém, não há relatos de que os machos pré-púberes possam estimular a maturação sexual de fêmeas. Assim, se faz necessário à realização de estudos que avaliem se este fator pode influenciar o início da puberdade de fêmeas da espécie felina.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este experimento, podemos inferir que:

O monitoramento não invasivo da função ovariana foi eficiente na detecção dos eventos biológicos estudados: estro, inter-estro, puberdade e provável início da atividade ovariana.

O conjunto diagnóstico comercial em fase sólida utilizado nos ensaios hormonais foi validado para o uso em extratos fecais de fêmeas de onça-pintada.

Foi possível traçar um padrão dos estrógenos fecais durante o ciclo ovariano de fêmeas adultas de *Panthera onca*.

A idade estimada para a puberdade nestes animais foi de alguns meses antes da maturidade sexual descrita para espécie, provavelmente esta diferença está relacionada com a não manifestação do estro no começo da atividade ovariana.

O início da atividade ovariana nesta espécie pode estar relacionado com parâmetros sazonais, indicando uma possível concentração da atividade reprodutiva durante a primavera.

Revisão Bibliográfica

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. **Jaguar hunting in the Mato Grosso**. England, Stanwill Press, 1976. 122p.

BAINBRIDGE, D.R.J.; JABBOUR, H.N. Potencial of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Zoo Biology**, v.143, p.159-68, 1998.

BARONE, MA.; ROELICE, M.E.; HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; ANDERSON, A E, WILDT, D.E. Reproductive characteristics of male Florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American zoos. **Journal of Mammalogy**, v.75, n.1, p.150-62, 1994.

BONNEY, R.C.; MOORE, H.D.; JONES, D.M. Plasma concentrations of oestradiol-17 beta and progesterone, and laparoscopic observations of the ovary in the puma (*Felis concolor*) during oestrus, pseudopregnancy and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.63(2), p.523-531, 1981.

BRONSON, F.H. Mammalian reproduction: an ecological perspective. **Biology of reproduction**, v.32, p.1-26, 1985.

BRONSON, F.H.; HEIDEMAN, P.D. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: Knobil, E.; Neill, J.D. **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York. Raven Press, p. 541-83, 1994.

BROWN, J.L.; GRAHAM, L.H.; WIELEBNOWSKI, N.; SWANSON W.F.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of fecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p.57-71, 2001.

BROWN, J.L.; TERIO, K.A.; GRAHAM, L.H. Fecal androgen metabolite analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. **Zoo Biology**, v.15, p.424-34, 1996.

BROWN, J.L.; WASSER, S.K.; WILDT, D.E.; GRAHAM, L.H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. **Biology of Reproduction**, v.51, p.776-86, 1994.

BROWN, J.L.; WILDT, D.E., WIELEBNOWSKI, N., GOODROWE K.L., GRAHAM, L.H., WELLS S, HOWARD J.G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p.337-346, 1996.

Referências Bibliográficas

- BROWN, J.L.; WILDT, D.E. Assessing reproductive status in wild felids by noninvasive faecal steroid monitoring. **International Zoo Yearbook**, v.35, p. 173-91, 1997.
- BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; GRAHAM, L.H.; BYERS, AP.; COLLINS, L.; BARRFT, 5.; HOWARD, J.G. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, v.53,p.93-102, 1995.
- COCKREM, J.F.; ROOUNCE, J.R. Faecal measurements of oestradiol and testosterone allow the non-invasive estimation of plasma steroid concentration in the domestic fowl. **British Poultry Science**, v.35, p.433-443, 1994.
- COLLIER, G.E.; O'BRIEN, S.J. A molecular phylogeny of the Felidae: immunological distance. **Evolution**, v. 39, p. 473-487, 1985.
- CRAWSHAW, P.G. e QUIGLEY, H.B. A ecologia do jaguar ou onça pintada no pantanal. **Relatório Final**, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília, DF. 1-112.
- CZEKALA, N.M.; DURRANT, B.S.; CALLISON, L.; WILLIAMS, M.; MILLARD, S. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. **Zoo Biology**, v.13, p.119-128, 1994.
- DAY, M.L.; IMAKAMAWA, K.; GARCIA, W.M.; ZALESKY, D.D.; SCHAMBACHER, B.D.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v.31, p.332-341, 1984.
- DARBRE, P.; YATES, J.; CURTIS, S.; KING, R.J.B. Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. **Cancer Research**, v. 43, p.349-354, 1983.
- DE LUCIA, R.F.S. **Avaliação e caracterização da fisiologia ovariana e da fertilidade de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) de linhagem precoce**. São Paulo, 2002. p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2002.
- EATON, R.L. Why some felids copulate so much: a model for the evolution of copulation frequency. **Carnivore**, v.1, p.42-51, 1978.
- ELZIRIK, E.; BONATTO, S.L.; JOHSON, W.E.; CRAWSHAW JR., P.G.; VIÉ, J.C.; BROUSSET, D.M.; O'BRIEN, S.J.; SALZANO, F.M. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, Felidae). **Journal of Molecular Evolution**, v.47, p.613-624, 1998.

Referências Bibliográficas

- EIZIRIK, E. YUHKI, N.; JOHNSON, W.E.; MENOTTI-RAYMOND, M.; HANNAH, S.S.; O'BRIEN, J.S. Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. **Current Biology**, v.13, p.448-453, 2003.
- EMMONS, L.H. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. Chicago: The University of Chicago Press, 1990. 281p.
- EWER, R.F. (Coord) The evolution of mating systems in the Felidae. In: EATON, R.L. (Comp). **The word's cats: biology, behavior and management of reproduction**. London: Unimark Publishing Co., p. 111-20, 1975.
- EWER, R.F. **The carnivores**. New York, Cornell University Press, 1973. 494 p.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Feline Reproduction. In: _____ **Canine and Feline endocrinology and reproduction**. 2ed. Philadelphia W.B. Saunders Co., 1996, 785p.
- FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS – LISTA DAS ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO DA FAUNA BRASILEIRA. Disponível na internet em: <http://www.biodiversitas.com.br>, acesso em maio de 2003.
- GRAHAM, L.H. Non invasive monitoring of reproductive hormones in zoo and wildlife species. **Apostila Curso UNESP JABOTICABAL**, 2001.
- 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**, v.20, p.227-236, 2001.
- GRAHAM, L.H.; BROWN, J.L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. **Zoo Biology**, v.15, p.71-82, 1996.
- GRAHAM, L.H.; GOODROWE, KL.; RAESDE, J.I.; LIPTRAP, R.M. Non-invasive monitoring of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17 β 3 and progestins. **Zoo Biology**, v. 14, p.223-37, 1995.
- GROSS, T.S.; RODDEN, M. Fecal steroid analyses as an assessment of reproductive function in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), Proceedings of **American Association of Zoo Veterinarians**, p.387-389, 1991.
- HAFEZ, E.S.E. (ED) **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, . 586p. ,1994
- HOWARD, J.C.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Teratospermicy and normospermicv domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonodal hormones, and improvement of spermatozoa motility and morphology after swim-up processing. **Journal of Andrology**, v. 11, n.3, p.204-15, 1990.

Referências Bibliográficas

IUCN/SPECIES SURVIVAL COMISSION/CAT SPECIALIST GROUP/CONSERVATION BREEDING SPECIALIST GROUP. South American felid conservation assessment and management plan. Giand: IUCN, 1994.99p.

JACKSON, P. The status of cats in the wild. **International Zoo Yearbook**, v. 35, p.17-27, 1997.

JOHNSON, W.E.; O'BRIEN, S.J. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. **Journal of Molecular Evolution**, y. 44, p. S98-S116, 1997.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. The Feline Estrous Cycle. In: _____. **Canine and Feline theriogenology**. Saunders Company, 2001.

JOHNSTON, S.D.; ROOT, M.V.; OLSON, P.N.S. Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.261 – 74, 1996.

KITCHENER, A. **The natural history of the wild cats**. Ithaca: Cornell University Press, 1991. 280p.

KITCHENER, A. **The natural history of the wild cats**. Ithaca: Cornell University press, 1991. 280p.

LANCE, V.A.; PATTON, M.L.; HAGEY, R.L. identification of series of C₂₁ O₂ pregnanes from fecal extracts of a pregnant black rhinoceros (*Dinoceros bicornis minor*). **Steroids**, v.66, p.875-881, 2001.

LASLEY, B.L.; KIRKPATRICK, J.F. Monitoring ovarian function in captive and free ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 23-31, 1991.

LASLEY, B.L.; LOSKUTOFF, N.M.; ANDERSON, G.B. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in non-domestic species. **Theriogenology**, v. 41, p. 119-32, 1994.

LEITE, M.R.P. **Relações entre onça-pintada, onça-parda e moradores locais em três unidades de conservação da Floresta Atlântica do Estado do Paraná**. Paraná, 2000. 75p. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná, Paraná.

LEITE, M.R.P.; OLIVEIRA, T.G.; PAULA, R.C.; INDRUSIAK, C. Por que promover a conservação de carnívoros?. In: _____. **Manual de Identificação, preservação e controle de predação por carnívoros**. Brasília: Edição IBAMA, 2002. 83p.

LEITE, R.P.; BOULHOSA, R.L.P. Ecology and Conservation of jaguars in the Atlantic Rainforest of Brazil. In: MEDELIN, R.; REDFORD, K.; HOWARD, Q.; RABINOWITZ, A. **The jaguar in the new milleniom**, Mexico City, Mexico, 1999.

Referências Bibliográficas

- LITTLE, S. Reproduction and breeding management in cats. **SYMPOSIUM Veterinary Medicine**. p.548 – 555, 2001.
- MALPAUX, B.; THIÉRY, J.C.; CHEMINEAU, P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. **Reproduction and nutrition development**, v.39, p.355-66, 1999.
- MATSUMURO, M.; SANKAI, T.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y.; YOSHIDA, T. A two-step extraction method to measure fecal steroid hormones in female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **American Journal of Primatology**, v.48, p.291-298, 1999.
- MELLEN, J.D. A comparative analysis of scent-marking, social and reproductive behavior in 20 species of small cats (*Felis*). **American Zoology**, v.33, p.151-166, 1993.
- MONDOLFI, E. e HOOGESTEIJN, R. Notes on the biology and status of the jaguar in Venezuela. Pp 85-124 in S.D. Miller and D.D. Everett, eds. **Cats of the world: biology, conservation and management**. National Wildlife Federation, Washington D.C., 1986.
- MORAIS, R.N; MUCCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H; SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p. 2027-2041, 2002.
- MORATO, R.G. **Reprodução assistida como ferramenta auxiliar no manejo e conservação da onça-pintada (*Panthera onca* LINNAEUS, 1758)**. São Paulo, 2001.127p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- MORATO, R.G.; GASPARINI, R.L. Levantamento preliminar da situação da onça pintada nos zoológicos brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS, **Anais**, Rio de Janeiro, 1994.
- MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; PASQUALI, O. L.; GOMES, M.L.F.; MORAIS, R.N.; WILDT, D.E.; BROWN, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology** v.20, p.103-116, 2001.
- NOGUEIRA, G.P.; BARNABE, R.C.; VERRESCHI, I.T.N.; Puberty and growth rate in through breed fillies. **Theriogenology**, v.48, p. 581-88, 1997.
- NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world**. 6.ed. v.1 Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1999.836p.
- O'BRIEN, S.J.; NAOYA, Y. Comparative genome organization of the major

Referências Bibliográficas

- histocompatibility complex: lessons from the Felidae. **Immunological Reviews**, v. 167, n. 2, p. 133-44, 1999.
- O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E.; BUSH, M.; HOWARD, J.C. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. **Science**, v.227, p. 1423-35, 1985.
- OLIVEIRA, T. G. **Cats: ecological and conservation**. São Luis, Edusma, 1994. 244p.
- OLIVEIRA, T.G.; CASSARO, K. **Guia de identificação dos felinos brasileiros**. São Paulo: Sociedade de Zoológicos do Brasil (FPZ-SP), 1997. 60p.
- QUIGLEY, H.B e CRAWSHAW, P.G. Jaguar conservation in the pantanal. *In*: RA MEDELLIN, C CHETKIEWICZ, A RABINOWITS, KH REDEFORD, JG ROBISON, E SANDERSON AND TABER. **El jaguar en Nuevo Milenio: Deteccion de prioridades y Recomendaciones para la Conservacion de los Jaguares en America**. Universidad Nacional Autonoma de México/Wildlife Conservation Society, México DF, 1999.
- RABINOWITZ, A.; NOTTINGHAM JR, B.G. Ecology and behaviour of the jaguar (*Panthera onca*) in Belize, Central America. **Journal of Zoology**, Lond. (A) 210(1): 149-159, 1986.
- RALLS, K.; BRUGGER, K.; BALLOU, 3, Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. **Science**, v.206, p.110-113, 1979
- REDDEL, R.R.; MURPHY, L.C.; SUTHERLAND, R.L. factors affecting the sensitivity of T-47 human breast cancer cell to tamoxifen. **Cancer Research**, v.44, p.2398-2405, 1984
- REICHLIN, S. Neuroendocrinology: hypothalamus and pituitary. *In*: WILSON, J. D.; FOSTER, D.W. **Textbook of endocrinology**. 8 ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1992. p.135-93.
- RODRIGUES, A.S.M.; AURICCHIO, P. **Felinos do Brasil – Terra Brasilis**, 1994.
- ROOT, M.V.; JOHNSTON, S.D.; OLSON, P.N. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.31, p.429-433, 1995
- SADLEIR, R.M.F.S. Notes on reproduction in the larger Felidae. **International Zoo Yearbook**, v.6, p.184-7, 1966.
- SCHIMIDT, A.M.; HESS, D.L., SCHIMIDT, M.J.; SMITH, R.C.; LEWIS, C.R. Serum concentrations of oestradiol and progesterone, and sexual behavior in the leopard (*Panthera pardus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, 43-9, 1988.

Referências Bibliográficas

SCHIMIDT, A.M.; HESS, D.L.; SCHMIDT, M.J.; LEWIS, C.R. Serum concentrations of oestradiol and progesterone frequency of sexual behavior during the normal oestrus cycle in the snow leopard (*Panthera uncia*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p. 91-95, 1993.

SCHIMIDT, A.M.; NADAL, L.A.; SCHMIDT, M.J.; BEAMER, N.B. Serum concentrations of oestradiol and progesterone and sexual behaviour during the normal oestrus cycle and early pregnancy in the lion (*Panthera leo*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57, p. 267-272, 1979.

SEAL, U.S. et al. Immunoreactive luteinizing hormone, estradiol, progesterone, testosterone and androstenedione levels during the breeding season and anestrus in Siberian Tigers. **Biology of Reproduction**, v.32, p.361-8, 1985.

SEYMOUR, K.L. *Panthera onca*. **Mammalian Species**, v. 340, p. 1-9, 1989.

SIMPSON, G.M.; HARVEY, M. BSAVA Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology. **British Small Animal Veterinary Association**, Cheltenham UK, 1998. ISBN 0-905214-36-6

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. 2ed. New York: Raven press, 1994. p.1363-434.

SHILLE, V.M.; KOLLIS, G.V.; THATCHER M.J.; WATERMAN, S. Determination of reproductive status in the serval and bobcat using a validated, direct radioimmunoassay of fecal estradiol. **Biology of Reproduction** (suppl) 44: 121 (abstr), 1991.

SHILLE, V.M.; LUNDSTRON, K.E.; STABENFELDT, G.H. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. **Biology of Reproduction** 21:953-963, 1979.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350p.
SOUTH AMERICAN FELID CONSERVATION ASSESSMENT AND MANAGEMENT PLAN, São Paulo, 1994

SWANSON, W.F.; WILDT, D.E.; Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. **International Zoo Yearbook**, v.35, p.152-9, 1997.

TEWES, M.E.; SCHMIDLY, D.J. The Neotropical felids: jaguar, ocelot, margay and jaguarundi. In: NOVAK, M.; BACKER, J.A.; OBBARD, M.E.; MALLOCH, B. **Wild furbearer management and conservation in North America**. Ontario Ministry of Natural Resources, Toronto, Canada, 1987. p.697-711.

THORNBACK, J.; JENKINS, M. **The IUCN mammal red data book**. UK, the Grssham

Referências Bibliográficas

Press, 1982.

TSUTSUI, T.; STABENFELDT. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. **Journal of Reproduction and Fertility (suppl)**, v.47, p. 29-35, 1993.

WASSER, S.K.; RISLER, L.; STEINER, R.A. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.39, p.862-72, 1991.

WESSON, J.A.; GINTHER, O. Puberty in the female pony: reproductive behavior, ovulation and plasma gonadotropin concentration. **Biology of Reproduction**, v.24, p.977-86, 1981.

WILDT, D.E.; BUSH, M.; COODROWE, KL, PACKER, C.; PUSEY, A.E.; BROWN, J.L.; JOSLIN, P.; O'BRIEN, S.J. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. **Nature**, v.329,p.329-31, 1987.

WILDT, D.E.; BUSH, M.; HOWARD, J.C.; O'BRIEN, S.J. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. **Theriogenology**, v.25, n.1, p.33-51, 1989

WILDT, D.E.; HOWARD, J.G.; HALL, L.I.; BUSH, M. Reproductive physiology of the clouded Leopard. I. Electroejaculates contain high level of pleiomorphic spermatozoa throughout the year. **Biology of Reproduction**, v.34, p.937-47, 1986.

WILDT, D.E.; PLATZ, C.C.; CHAKRABORTY, P.K.; SEAGER, S.W.J. Oestrus and ovarian activity in a female jaguar (*Panthera onca*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 25, p.555-558, 1979.

WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.; CHAKRABORTY, P.K. Behavioral, ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch. **Journal Animal Science**, v.53(1) p. 182-191, 1981

WILDT, D.E.; SEAL, U.S.; RALL, W.F. Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife conservation. In: CLOUD, J.C.; THORGAARD, G.H. **Genetic conservation of salmonid fishes**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1993.p. 159-73.

WILSON, D.E.; REEDER, D.M. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, v. 4, p. 556-63, 1998.

Anexos

Anexo I

Quadro 1 Dieta alimentar fornecida às fêmeas adultas de onça-pintada das instituições FPZSP (n=1) e FRZ (n=1).

Alimento e quantidade fornecida aos animais	Dias da Semana					
	S	T	Q	Q	S	S
Carne – 2 Kg (músculo ou coração bovino)	X	X	X	X	X	X

* Jejum aos Domingos

Quadro 2 Dieta alimentar fornecida às fêmeas pré-púberes de onças-pintadas (n=2) do PZMQB.

Alimento e quantidade fornecida aos animais	Dias da Semana					
	S	T	Q	Q	S	S
Pescoço de frango inteiro (800g)	X	X	X	X	X	X
Ração felina (800g)	X	X	X	X	X	
Coração bovino (800g)						X

* Todos os ingredientes oferecidos as quartas e quintas-feiras são moidos e são acrescidos 30g de complexo vitamínico;

** Jejum aos Domingos.

Anexo I

Quadro 3 Dieta alimentar fornecida à fêmea pré-púbere de onça-pintada (n=1) do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira - CESP.

Alimento e quantidade Fornecida aos animais	Dias da Semana						
	S	T	Q	Q	S	S	D
Pescoço de frango sem pele (500g)	X	X	X	X	X	X	X
Ração felina (500g)				X	X		
Coração bovino (500g)				X	X		
Carne bovina (500g)						X	X
							X

* Foi realizada a partir de set/01 uma mudança gradual na dieta do animal passando a ser oferecida diariamente uma galinha poedeira viva, sendo que no ano de 2002 a dieta passou a ser composta por galinhas.

Figuras 1 a 7 - Ilustração das etapas de extração

Figura 1 - Pesagem das amostras fecais

Figura 4 - 1º etapa de centrifugação

Figura 2 - amostra fecal após fervura

Figura 5 - 2º etapa de centrifugação

Figura 3 - centrífuga (QUIMIS)

Figura 6 - Extrato em solução no etanol

Figura 7 - Fluxo de secagem (LÁCTEA) com banho-maria.

Anexo III

Figura 1 Representação gráfica do método adotado para determinação dos valores basais de estrógenos fecais (ng/g de fezes secas) utilizando a média + 1.5 Desvios Padrões (Animal AA 01, n=380). São Paulo, 2003.