

MARCELO ALCINDO DE BARROS VAZ GUIMARÃES

Monitoração não- invasiva da supressão da atividade ovariana cíclica e do comportamento de estro em fêmeas de leão africano (*Panthera leo*), induzidos pelo uso de implantes de análogo de GnRH, deslorelina

São Paulo
2008

MARCELO ALCINDO DE BARROS VAZ GUIMARÃES

Monitoração não- invasiva da supressão da atividade ovariana cíclica e do comportamento de estro em fêmeas de leão africano (*Panthera leo*), induzidos pelo uso de implantes de análogo de GnRH, deslorelina

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para o Concurso para Professor Livre-Docente do Departamento de Reprodução Animal

São Paulo
2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2042
FMVZ

Guimarães, Marcelo Alcindo de Barros Vaz
Monitoração não- invasiva da supressão da atividade ovariana
cíclica e do comportamento de estro em fêmeas de leão africano
(*Panthera leo*), induzidos pelo uso de implantes de análogo de
GnRH, deslorelina / Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães. –
São Paulo : M. A. B. V. Guimarães, 2008.
78 f. : il.

Tese (livre-docência) - Universidade de São Paulo. Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de
Reprodução Animal, 2008.

1. Leão africano. 2. *Panthera leo*. 3. Ciclo ovariano.
4. Comportamento. 5. Deslorelina I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GUIMARÃES, Marcelo Alcindo de Barros Vaz

Título: Monitoração não- invasiva da supressão da atividade ovariana cíclica e do comportamento de estro em fêmeas de leão africano (*Panthera leo*), induzidos pelo uso de implantes de análogo de GnRH, deslorelina

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para o Concurso para Professor Livre-Docente do Departamento de Reprodução Animal

Data ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre à minha família, meu pai Marcelo (*in memorian*), minha mãe Maria Hebe e minhas irmãs Miriam e Liliane. Eles são a base de tudo que aconteceu em minha vida.

À Dra. Cristiane Schilbach Pizzutto, minha amiga e colaboradora, pelo apoio de sempre e pela grande ajuda no processamento das amostras

À Dra. Sandra Helena Ramiro Correa, médica veterinária da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, pela amizade, ajuda e apoio na realização deste trabalho.

À Daniela Braga, pelo auxílio nas observações comportamentais e pelos contactos na Austrália, que possibilitaram a doação dos implantes.

À aluna de graduação Fernanda Mouco, pela ajuda no processamento das amostras, durante o seu estágio no LDH.

Ao Laboratório de Dosagens Hormonais do VRA, nas pessoas do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira e da Dra. Priscila Viau Furtado, pela realização das dosagens hormonais.

Aos colegas do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, pelo contínuo apoio às minhas iniciativas.

Ao biólogo Mário Borges da Rocha, responsável pelo Zoo Safari, pela disponibilização dos animais e por sempre facilitar nosso acesso às instalações e colaborar com a colheita de amostras.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo pela permissão para realizarmos este trabalho com animais de seu plantel.

Às secretárias do VRA, Harumi Doi Shiraishi, Thais Soto Xavier de Brito e Maria Alice de Oliveira, sempre me auxiliando em todos os momentos. Todos mesmo.

Ao Dr. Tim Trigg, gerente técnico da Peptech Animal Health, pela doação dos implantes de deslorelina.

À Biblioteca Virginie Buff D'Apice, em especial à Elza Maria R. B. Faquim, pela normatização desta tese.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese para as mulheres que tanto amo e compõem o meu pequeno "clã".

Minha esposa Maria Lúcia e minha filha Heloisa. Elas são a razão de tanta luta.

RESUMO

GUIMARÃES, M. A. B. V. **Monitoração não- invasiva da supressão da atividade ovariana cíclica e do comportamento de estro em fêmeas de leão africano (*Panthera leo*), induzidos pelo uso de implantes de análogo de GnRH, deslorelina.** [Non invasive monitoring of suppression of the ovarian cyclic activity and estrus behavior of female African Lions (*Panthera leo*), induced by the use of implants of GnRH analog, deslorelin]. 2008. 78 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da utilização da aplicação de implantes sub-cutâneos de um análogo de GnRH, Deslorelina, para a supressão da atividade cíclica ovariana e do comportamento de estro, em cinco fêmeas adultas de leão africano (*Panthera leo*). A monitorização endócrina foi realizada pela extração e dosagem de metabólitos fecais de esteróides sexuais, progesterona e estradiol. Foi também observada a presença ou não de comportamento típico de estro (cio). O efeito do implante superou as expectativas, abolindo o comportamento de cio por 22, 31 e 33 meses para três das fêmeas. A quarta leoa, ainda não demonstrou comportamento de cio e já está implantada há 35 meses. A quinta leoa foi eutanasiada por razões não relacionadas ao trabalho. Da mesma forma, a monitoração não-invasiva mostrou-se eficiente e precisa, demonstrando a abolição da atividade ovariana durante todo o período do experimento. Durante o período estudado, houve marcada redução da agressividade das leoas, com conseqüente melhoria do aspecto geral. Embora a reversibilidade da função ovariana não tenha sido demonstrada no decorrer do período experimental, os resultados obtidos sugerem que esta deverá se re-estabelecer em breve. Estas informações são de grande relevância para a utilização do método em programas de controle populacional e para a redução da agressividade de leões e potencialmente de outros felinos silvestres.

Palavras-chave: Leão africano. *Panthera leo*. Ciclo ovariano. Comportamento Deslorelina.

ABSTRACT

GUIMARÃES, M. A. B. V. **Non invasive monitoring of suppression of the ovarian cyclic activity and estrus behavior of female African Lions (*Panthera leo*), induced by the use of implants of GnRH analog, deslorelin.** [Monitoração não- invasiva da supressão da atividade ovariana cíclica e do comportamento de estro em fêmeas de leão africano (*Panthera leo*), induzidos pelo uso de implantes de análogo de GnRH, deslorelina]. 2008. 78 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The objective of this study was to evaluate the efficiency of the use of application of subcutaneous implants of a GnRH analog, Deslorelin, for the suppression of the ovarian cycle activity and estrus behavior, in 5 adult female African Lions (*Panthera leo*). The endocrine monitoring was performed by the extraction and measurement of fecal metabolites of sexual steroids, progesterone and estradiol. It was also observed the occurrence of typical estrus behavior (heat). The effect of the implant overcame the expectations, abolishing the heat behavior for 22, 31 and 33 months for three of the females. The fourth lioness, has not yet shown heat behavior and has already been implanted for 35 months. The fifth lioness was euthanized for reasons unrelated to this study. In the same manner, the non invasive monitoring was shown to be effective and precise, demonstrating the abolishment of ovarian activity during the whole period of the experiment. During the period studied, there was a remarkable decrease of aggressiveness between the lionesses, with a consequent overall improvement. Although the reversibility of the ovarian function has not been demonstrated during the experimental period, the results obtained suggest that it should re-establish soon. This information is of great relevance for the applying of the method for population control programs and for the reduction of aggressiveness in lions and potentially in other wild felids.

Key words: African Lion, *Panthera leo*, ovarian cycle, behavior, deslorelin.

LISTA DE TABELAS

Tabela1-	Composição do grupo experimental de leões (<i>Panthera leo</i>), com nomes, idades e tempo de cativeiro na Fundação Parque zoológico de São Paulo.....	36
Tabela 2 -	Percentuais de reações cruzadas dos conjuntos diagnósticos comerciais para Radioimunoensaio para dosagem de estradiol ("Estradiol Coat-a-Count [®] (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA) e progesterona ("Progesterone DSL-3900 [®] Diagnostic System Laboratories Inc., Webster, EUA)	45
Tabela 3 -	Controles de Qualidade dos ensaios hormonais de progesterona	54
Tabela 4 -	Controles de Qualidade dos ensaios hormonais de estradiol	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exemplar de leoa africana (<i>Panthera leo</i>), identificada como Salita	37
Figura 2 -	Exemplares de leoas africanas (<i>Panthera leo</i>), identificadas como Ilara (ao fundo) e Rouge.....	38
Figura 3 -	Exemplar de leoa africana (<i>Panthera leo</i>) , identificada como Zomba	39
Figura 4 -	Exemplar de leoa africana (<i>Panthera leo</i>), identificada como Pretória.....	40
Figura 5 -	Exemplar macho, vasectomizado, de leão africano (<i>Panthera leo</i>), identificado como Kirongozi	41
Figura 6 -	Leoa Zomba, sob efeito da anestesia, com venda e membros amarrados	47
Figura 7-.	Embalagem do implante de deslorelina (Suprelorin®), com o aplicador.....	48
Figura 8 -	Aplicação sub-cutânea do implante de deslorelina na leoa Zomba	49
Figura 9 -	Resultados da validação laboratorial do conjunto comercial Estradiol ® Cont-a-Count DPC MEDlab, para dosagem de estradiol.....	52
Figura 10 -	Resultados da validação laboratorial do conjunto comercial Progesterone ® DSL, para dosagem de progesterona	53
Figura 11 -	Perfil dos metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Ilara (<i>Panthera leo</i>) - São Paulo - 2007	55
Figura 12 -	Perfil de metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Pretória (<i>Panthera leo</i>) - São Paulo - 2007	56
Figura 13 -	Perfil de metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Rouge (<i>Panthera leo</i>) - São Paulo - 2007	57
Figura 14 -	Perfil de metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Salita (<i>Panthera leo</i>) - São Paulo - 2007	58
Figura15 -	Perfil de metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Zomba (<i>Panthera leo</i>) - São Paulo - 2007	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Aspectos culturais e históricos	17
3.2	Sistemática, ocorrência e situação populacional do leão africano (<i>Panthera leo</i> Linnaeus, 1758)	18
3.3	Características e organização sociais dos clãs de leões	20
3.4	Características reprodutivas, endócrinas e comportamentais	22
3.5	Contraceção em espécies silvestres	26
3.5.1	Métodos cirúrgicos	27
3.5.2	Métodos hormonais	27
3.5.2.1	<i>Progestágenos</i>	28
3.5.2.2	<i>Andrógenos</i>	30
3.5.2.3	<i>Agonistas de GnRH</i>	30
3.5.3	Métodos imun contraceptivos	31
3.5.3.1	<i>Vacina de Zona Pelúcida Porcina (PZP)</i>	32
3.6	Métodos não-invasivos para o estudo endócrino-reprodutivo	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Os animais	36
4.2	Colheita de amostras	42
4.3	Monitoração endócrina	42
4.3.1	Técnica de extração	43
4.3.2	Técnica de dosagens hormonais	43
4.4	Monitoração comportamental	46
4.5	Aplicação dos implantes	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Comentários gerais	63
5.2	Considerações finais	64
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	69



Fonte: GUIMARÃES, M. L. A. C. V. - Praga, Rep. Tcheca, 2008 .

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A reprodução de animais silvestres em cativeiro é uma importante ferramenta para a conservação *ex-situ* de espécies ameaçadas de extinção. No entanto, algumas espécies, como o leão africano (*Panthera leo*), adaptaram-se de tal forma às condições de cativeiro, que passaram a se reproduzir de maneira excessiva, gerando situações aonde o crescimento populacional levou ao esgotamento do espaço físico e dos recursos financeiros para a sua manutenção (LINDBURG; LINDBURG, 1995; ASA et al., 1996).

Fenômeno semelhante está ocorrendo com essa espécie em reservas na África, onde o espaço físico não pode ser aumentado (e às vezes é até reduzido) e o excessivo número desses predadores inviabiliza a manutenção do equilíbrio populacional da área (BERTSCHINGER et al., 2002). Muitas vezes, a solução torna-se emergencial e apela-se para o abate de parte da população de leões para tentar restabelecer o equilíbrio perdido. Esta ação, cada vez mais se torna inaceitável do ponto de vista ético, sendo necessária a implementação de outros métodos de controle populacional.

Neste contexto, os métodos contraceptivos surgem como opção para que se possa controlar o tamanho da população sem ter que realizar abates periódicos (GRANDY; RUTBERG, 2002). Dentre os métodos contraceptivos alguns possuem ainda a característica da reversibilidade, o que é de grande interesse, uma vez que uma espécie hoje numerosa, por diversas razões, pode ser amanhã reduzida e tornar-se ameaçada de extinção. Outra razão que recomenda o uso de métodos reversíveis é a possibilidade de ser preservada a diversidade genética de uma população pela potencial re-introdução de material genético ainda pouco representado.

O leão africano, além de se encaixar nas condições citadas, ainda pode ser um modelo biológico importante para o desenvolvimento de técnicas que poderão ser utilizadas na manutenção de populações cativas de outros grandes felinos, como a onça-pintada (*Panthera onca*) ou a onça-parda (*Puma concolor*), devido a sua proximidade filogenética. Estas duas espécies citadas pertencem à fauna nativa

brasileira e vêm sofrendo redução das populações de vida livre em decorrência da ocupação das áreas verdes e da fragmentação de seu habitat. Da mesma forma que o leão africano, são animais cujas populações mantidas em cativeiro devem ser manejadas de maneira a ser evitada a superpopulação e, simultaneamente, ser preservada uma reserva genética, como um verdadeiro banco genético, a ser utilizado futuramente para projetos de re-introduções (RODGER, 2003).

A opção pelo implante de um análogo de GnRH, a deslorelina, deveu-se ao fato de existirem informações promissoras quanto ao seu uso como contraceptivo reversível, sem efeitos colaterais importantes, tanto em fêmeas de carnívoros domésticos (MUNSON et al., 2001; TRIGG et al., 2001; WRIGHT et al., 2001), quanto selvagens (BERTSCHINGER et al., 2001, 2002).

A monitoração dos níveis de metabólitos fecais dos esteróides sexuais, progesterona e estradiol, permitirá a verificação da supressão da atividade ovariana e da ovulação, sendo este aspecto essencial para a constatação do efeito do tratamento proposto. Técnicas não-invasivas, como a mensuração de metabólitos fecais de hormônios esteróides, são recomendadas para estudos em espécies silvestres, por possibilitarem colheitas sucessivas durante longos períodos de forma segura e sem induzir reações do tipo estresse (BROWN, 2006).



Fonte: GUIMARÃES, M. L. A. C. V. - Praga, Rep. Tcheca, 2008.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Este projeto teve por objetivo avaliar a eficiência e reversibilidade do uso de implantes de um análogo de GnRH, a Deslorelina, para a obtenção da supressão da atividade ovariana cíclica e do comportamento de estro em 5 fêmeas de leão africano, por um período de 32 meses.

Também foi objetivo validar a monitoração da atividade ovariana de forma indireta com o uso de método não-invasivo, extração e dosagem de metabólitos fecais dos hormônios esteróides sexuais estradiol e progesterona.



Fonte: GUIMARÃES, M. A. B. V. - Budapeste, 2008.

Revisão Bibliográfica

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos culturais e históricos

Diferentes culturas, religiões e povos, no decorrer da história da humanidade, utilizaram imagens de animais como personificações de seres mágicos ou divinos, como os gatos domésticos no Antigo Egito, criaturas míticas na Grécia Antiga, como o cavalo alado Pégasus, a serpente com múltiplas cabeças, conhecida como a Hydra de Lerna ou mesmo combinações de diferentes animais em um só, como as Quimeras. Personagens meio humanos – meio animais freqüentam também as lendas e mitos de antigas culturas, sendo bons exemplos o Minotauro (meio homem – meio touro) e a Esfinge (cabeça de mulher – corpo de leoa). Representações sagradas de animais ou combinações de homem e animal são também encontradas como incorporações de espíritos ou deuses de antigas religiões, como os bisões norte americanos (*Bison bison*) em culturas indígenas da América do Norte e o deus egípcio Anúbis (homem com cabeça de chacal), que conduzia a alma dos mortos até a presença de Horus (representado por um corpo humano com cabeça de gavião) para o julgamento final.

Igualmente rico e interessante é o uso de animais como símbolos de qualidades ou atributos humanos desejáveis como a “força” dos touros, a “sabedoria” dos elefantes ou a “esperteza” dos macacos. Da mesma forma, atributos humanos indesejáveis ou desprezíveis, foram culturalmente associados a animais, como a “baixa confiabilidade” dos escorpiões, a “dissimulação” das raposas e acima de todos, o maior exemplo, a “falsidade” das serpentes, imortalizada pela cultura cristã como a forma assumida pelo demônio para induzir Adão e Eva a cometerem o pecado original, traindo a confiança de Deus. Pobres serpentes condenadas pelo homem à eterna associação com o diabo.

Neste discutível, porém fascinante cenário zoológico-cultural-religioso, poucos animais ocupam uma posição tão relevante e tão profundamente associada às boas qualidades como o leão. Símbolo incontestado de coragem, força, majestade e virilidade,

a imagem do leão aparece com freqüência na iconografia heráldica medieval, representando famílias nobres e até mesmo como principal símbolo de grandes impérios como o Império Britânico. Da mesma forma, em seu próprio continente, a África, o leão é personagem assíduo de lendas e histórias, com freqüência, representado como símbolo de tribos e nações, sempre associado à coragem e à força. Exemplo deste aspecto é a alcunha do famoso imperador etíope da década de 30 no século XX, Hailé Selassié I, o auto proclamado “Leão de Judah”.

Possivelmente, parte do fascínio do ser humano por este animal remonte às relações do tipo, presa - predador, que sempre permearam essa coexistência. No início, com o homem primitivo no papel de presa sendo caçado por estes grandes felinos. Depois, com o passar do tempo, tornando-se ele o grande predador que além de dizimar as populações de leões, também destruiu e ainda destrói o seu habitat. Não é difícil imaginar o terror que certamente inspirava aos primitivos hominídeos refugiados em suas cavernas, os rugidos destes grandes carnívoros, ecoando em meio à escuridão da noite. Até hoje, nós homens modernos e senhores do planeta, trememos ao escutar este som. Certamente, esta relação de fascínio e medo faz com que estes animais sejam tão carismáticos para o ser humano.

3.2 Sistemática, ocorrência e situação populacional do leão africano (*Panthera leo* Linnaeus, 1758)

Este mamífero da ordem Carnívora e da família Felidae é classificado como *Panthera leo* , uma única espécie, mas existindo porém duas sub-espécies, *P.leo leo* – o leão africano e *P.leo persica* – o leão indiano. Outrora, este animal era encontrada por toda a África, Oriente Médio e Índia (HANBY; BYGOTT, 1991). Hoje, o *Panthera leo leo* ocorre em algumas regiões africanas ao sul do Sahara e Botswana e o *Panthera leo persica*, encontra-se ameaçado de extinção, por existirem poucos exemplares em apenas uma região da Índia, conhecida como a Floresta de Gir (SUNQUIST, 1991).

Os machos adultos da espécie medem 123 cm de altura da cernelha, 170 a 250 cm da extremidade do focinho à base da cauda e 90 a 105 cm de cauda. As fêmeas são menores, medindo 107 cm de altura na cernelha, 140 a 175 cm de comprimento e cauda com 70 a 100 cm. O peso dos machos varia de 150 a 250 Kg, enquanto as fêmeas pesam de 120 a 182 Kg (SUNQUIST, 1991).

Com o avanço da ocupação humana e conseqüente degradação e fragmentação do ambiente natural, as áreas de ocorrência estão cada vez mais restritas às reservas e parques, que por não poderem ser ampliadas, limitam o tamanho que as populações podem alcançar. Desta forma, existe hoje a necessidade de controlar o crescimento das populações de leões em vida livre ou “*in situ*”, preferencialmente com o uso de métodos contraceptivos, reversíveis se possível, em vez dos abates periódicos de indivíduos considerados excedentes.

Da mesma forma, as populações cativas, ou “*ex-situ*”, distribuídas em diversas partes do mundo, cada vez mais requerem a utilização de métodos de controle populacional de forma a evitar a superpopulação. Neste caso, razões de falta de espaço físico e limitações financeiras devido ao alto custo de manutenção de grandes animais carnívoros, são determinantes para a tomada de decisões (ASA; PORTON, 2005).

Em ambas as situações, cativeiro e vida livre, o aumento da consangüinidade, resultante de seguidos cruzamentos entre os mesmos indivíduos, podem comprometer a saúde e a viabilidade genética das populações (WILDT, 1991; BROWN et al., 1993a; RYAN; LACY; MARGULIS, 2003).

A contracepção reversível, além de fornecer as ferramentas para esse desejado e necessário controle populacional, possibilita também que, na eventualidade de uma brusca redução do número de indivíduos de uma dada população (epidemias por exemplo), indivíduos geneticamente importantes possam ser “revertidos”, no sentido de voltar a se reproduzir, e contribuir para a recomposição saudável dessa população (SEAL et al., 1975; ASA; PORTON, 2005). Por estas razões, métodos contraceptivos, preferencialmente reversíveis, são altamente desejados como verdadeiras ferramentas para a conservação, tanto “*in situ*”, quanto “*ex-situ*” (SEAL et al., 1975; ASA; PORTON, 2005).

3.3 Características e organização sociais dos clãs de leões

Este fascinante animal apresenta características comportamentais únicas entre os felinos, sendo o único representante da família Felidae que apresenta hábitos gregários, se organizando em grupos denominados “*prides*”, termo inglês que pode ser traduzido como clãs (SCHALLER, 1972; PUSEY; PACKER, 1987; PACKER; TATAR; COLLINS, 1988; HANBY; BYGOTT, 1991; SUNQUIST, 1991; SCHRAMM; BRIGGS; REEVES, 1994).

Os clãs são grupos sociais compostos por machos e fêmeas adultos (4 anos ou mais), sub-adultos (2 a 3,5 anos), filhotes grandes (1 a 2 anos) e filhotes pequenos (0 a 1 ano), segundo classificação etária proposta por Schaller (1972). Estes grupos podem conter de 4 a 37 indivíduos, sendo 15 a média. Apesar dos clãs serem uma unidade social coesiva, onde os indivíduos se inter-relacionam, isto não significa que todos os seus membros permaneçam sempre juntos. Na realidade, é comum que o clã se divida em grupos menores e estes se afastem por muitos quilômetros, caçando em separado e assim permanecendo por longos períodos, sem, no entanto, perder o vínculo original com o clã (SCHALLER, 1972; HANBY; BYGOTT, 1991). Quando indivíduos de um mesmo clã se encontram, mesmo que após longos períodos de separação, existe o reconhecimento e a receptividade entre eles. No caso do encontro com animais de outros clãs, a reação é quase invariavelmente agonística (SCHALLER, 1972; HANBY; BYGOTT, 1991).

De maneira geral, um clã é dominado por um macho adulto ou por uma associação de 2 a 4 machos adultos, sendo as associações claramente vantajosas para a conquista e manutenção de um clã (BYGOTT; BERTRAM, HANBY, 1979). Esta liderança é mantida por períodos variáveis de tempo, sendo que em média dura de 5 a 6 anos (CRANDALL, 1964; SCHALLER, 1972; HANBY; BYGOTT, 1991). Ocorre que, machos adultos nômades, viajando sozinhos, em pares ou trios, tentam tomar posse dos clãs que encontram, lutando e expulsando os machos residentes dominantes. Desta forma, uma nova liderança se estabelece e possibilita a estes machos o acesso às

fêmeas do clã (SCHALLER, 1972; BYGOTT; BERTRAM; HANBY, 1979; PACKER; PUSEY, 1982; HANBY; BYGOTT, 1991; SUNQUIST, 1991).

As fêmeas adultas dos clãs constituem a unidade básica e estável destes grupos, existindo diferentes graus de parentesco entre elas, ou seja, são irmãs, filhas, tias e avós (SCHALLER, 1972). Este chamado “núcleo duro” do clã sofre poucas alterações ao longo do tempo, sendo que a maioria delas ocorre por morte e não por expulsão ou abandono. No entanto, existe a expulsão de membros, geralmente machos jovens que acabaram de alcançar a puberdade e são expulsos pelos machos adultos dominantes. Fêmeas jovens, mais raramente, também podem ser expulsas pelas fêmeas adultas. No caso de saídas de fêmeas, o mais comum é que algumas jovens, com o tempo, comecem a se afastar do grupo e o abandonem geralmente aos pares. Estes indivíduos que abandonam os clãs, às vezes retornam e são bem recebidos, no entanto, outras vezes nunca mais retornam ou ao tentar fazê-lo são hostilizados pelos demais membros (SCHALLER, 1972; BERTRAM, 1991; HANBY; BYGOTT, 1991; SUNQUIST, 1991).

Essa dinâmica da troca de machos dominantes, da expulsão de machos jovens, da saída de fêmeas jovens e de eventuais chegadas de novas fêmeas (não muito freqüente, mas possível), permite um controle natural dos níveis de consangüinidade, promovendo variabilidade genética na população (HANBY; BYGOTT, 1991).

Em um clã, as relações entre os indivíduos são bastante complexas, mas, alguns aspectos são conhecidos, como a divisão de tarefas entre as fêmeas. Quando um grupo de fêmeas sai para caçar, algumas permanecem para cuidar dos filhotes de todas. Os laços familiares são fundamentais para a manutenção da coesão entre as fêmeas. Essa convivência próxima entre elas, possibilita uma sincronização de estros, com conseqüente sincronização de nascimentos, o que facilita muito as tarefas no grupo (HANBY; BYGOTT, 1991).

3.4 Características reprodutivas, endócrinas e comportamentais

Em termos reprodutivos, o papel dos machos adultos dominantes é o de copular com as fêmeas em estro e afastar concorrentes, para tentar garantir a paternidade. Quando um novo dominante ou associação de dominantes, se estabelece, é comum que os filhotes existentes sejam mortos por eles. Acredita-se que este comportamento esteja ligado ao fato das fêmeas apresentarem aciclia lactacional (EATON; YORK, 1971) e, portanto, o desmame compulsório, permitiria que elas voltassem a ciclar, ao mesmo tempo em que o investimento paterno seria apenas nos filhotes de sua descendência (HANBY; BYGOTT, 1991).

A maturidade sexual se dá entre dois a três anos para os machos e três e meio a cinco para as fêmeas (SEAGER; DEMOREST, 1978) ou aproximadamente aos 24 meses de idade para ambos os sexos (HANBY; BYGOTT, 1991).

As leas são poliétricas anuais, portanto apresentam ciclos férteis e se reproduzem em qualquer época do ano (EATON; YORK, 1971; SCHALLER, 1972; BERTRAM, 1975; SMUTS; HANKS; WHITE, 1978; BRIGGS et al., 1990; SCHRAMM; BRIGGS; REEVES, 1994). Daí a importância da sincronização dos nascimentos, fazendo com que os filhotes tenham maior chance de sobrevivência, seja pela proteção do grupo, seja pela maior disponibilidade de presas em determinadas épocas do ano (HANBY; BYGOTT, 1991). A ovulação é induzida como na maioria das espécies felinas (BERTRAM, 1975), mas é possível que ocorra sem a cópula (SEAL, 1979; SCHMIDT et al., 1979; SCHRAMM; BRIGGS; REEVES, 1994). Autores acreditam que a ovulação possa ocorrer de forma espontânea (SEAL, 1979; SCHMIDT et al., 1979) ou induzida pela interação física com outras fêmeas em cio, realizando montas entre si, sugerindo que o fato de ser esta uma espécie altamente social, possa favorecer este comportamento homossexual e induzir ovulações mesmo sem a ocorrência de cópulas (SCHRAMM; BRIGGS; REEVES, 1994). No entanto, a espécie é considerada como sendo predominantemente de ovulação induzida ou reflexa (BERTRAM, 1975; SCHMIDT et al., 1979; SEAL, 1979; SCHRAMM; BRIGGS; REEVES, 1994).

O ciclo ovariano das leas dura em média, 50 dias (SADLEIR, 1966a,b), 76,45 dias (EATON, 1974) ou três a oito semanas (SCHMIDT et al., 1979). O proestro geralmente não é observado ou dura 1 ou 2 dias. O estro ou cio, dura de quatro a 16 dias (SADLEIR, 1966a,b; SEAGER; DEMOREST, 1978), três a 13 dias (EATON; YORK, 1971), ou quatro a oito dias, porém variando muito entre diferentes indivíduos (EATON, 1974). Neste período, as fêmeas se mostram mais atrativas, proceptivas e receptivas, vocalizando de forma característica, movimentando-se com frequência e assumindo posturas e comportamentos típicos de cio, como rolar, se esfregar em troncos de árvores, apresentar lordose com desvio lateral da cauda e às vezes chegando a se colocar sob o macho, quase que o constringendo a copular (SCHALLER, 1972). Durante a cópula, o macho monta na fêmea que permanece deitada, imóvel, com a cauda desviada lateralmente e a segura, mordendo a parte dorsal do pescoço, enquanto realiza a penetração (SCHALLER, 1972).

As cópulas são freqüentes, ocorrendo aproximadamente a cada 20 a 30 minutos, durante todo o período do cio (HANBY; BYGOTT, 1991). Possivelmente esta capacidade dos machos de copular com tanta intensidade e freqüência, seja a base para toda a alegoria e mística que existe sobre o popular “rei dos animais”. Cópulas fora do cio são extremamente raras, uma vez que as fêmeas reagem com violência às tentativas dos machos. No entanto, este comportamento, descrito como “estupro”, já foi observado em leões de vida livre, possivelmente como parte de rituais de afirmação de superioridade hierárquica (comunicação pessoal)¹.

A gestação pode durar de 111 a 119 dias (SADLEIR, 1966a,b), 102 DIAS (EATON, YORK, 1971), 100,48 dias (EATON, 1974), de 98 a 114 dias (SEAGER; DEMOREST, 1978), 106,2 dias (SEIFERT, 1978), 108 dias (SCHMIDT et al., 1979), 120 dias (HANBY; BYGOTT, 1991), produzindo tipicamente 2 a 4 filhotes por ninhada (SMUTS; HANKS; WHITE, 1978). O investimento parental das fêmeas é muito maior que dos machos, que se limitam a copular com o maior número possível de fêmeas em cio e depois atuam como protetores do clã, contra invasores, indiretamente auxiliando na proteção dos filhotes. Já as fêmeas, além de amamentarem os filhotes, são

¹ Informação fornecida por BERTSCHINGER, em Omaha, EUA. no ano de 2005.

responsáveis pela sua proteção direta e pelo ensino das técnicas de caça e proteção (SCHALLER, 1972; HANBY; BYGOTT, 1991).

Conforme já mencionado, durante a lactação, que dura de seis a oito meses (SEAL, 1975), ocorre aciclia lactacional, não havendo, portanto neste período, atividade ovariana cíclica e nem estros comportamentais (EATON; YORK, 1971).

O comportamento homossexual entre machos foi observado em leões de vida livre (SCHALLER, 1972) e em cativeiro (GUIMARÃES et al., 2002a). No primeiro caso, possivelmente este comportamento estivesse relacionado com a dominância e a manutenção das alianças entre machos dominantes. No segundo caso, os autores descrevem um caso clínico de disfunção hormonal, onde um macho adulto apresentou uma síndrome feminizante com alterações fenotípicas (perda da juba e redução de volume testicular), endócrinas (baixos níveis de testosterona sérica) e comportamentais (aceitação de cópula por parte de outros machos e apresentação de cuidados com os filhotes). Neste caso, possivelmente, este comportamento estivesse relacionado aos baixos níveis de testosterona detectados. No caso de fêmeas, foram relatados comportamentos homossexuais entre fêmeas no estro, sem a presença de machos, ocorrendo até mesmo montas e indução da ovulação (SCHMIDT et al., 1979; SCHRAMM; BRIGGS; REEVES, 1994).

O comportamento sexual está relacionado, aos níveis hormonais de esteróides sexuais. A função testicular é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG), da mesma forma que a atividade ovariana cíclica. Nos machos, o comportamento sexual, a libido, a agressividade, a força muscular e a fertilidade apresentam relação direta com os níveis de andrógenos, principalmente a testosterona (LUMIA; THORNER; MCGINNIS, 1994; SENGER, 2003), responsável também pela manutenção dos caracteres sexuais secundários, como a juba dos leões (NELSON, 2000a; WEST; PACKER, 2002). Aspectos comportamentais mais complexos como a relação de características fenotípicas dos machos e a escolha destes pelas fêmeas, foram estudadas por West e Packer (2002), que descreveram a preferência das leas por machos portadores de juba maiores e mais escuras. Estas características de juba foram correlacionadas com níveis séricos de testosterona (WEST; PACKER, 2002). Outros autores estudaram a população de leões naturalmente sem juba no Parque

Nacional de Tsavo, no Kênia, onde resultados preliminares apontam que a ausência desta característica parece não interferir de maneira significativa na organização dos clãs (KAYS; PATTERSON, 2002).

Nas fêmeas, a integridade funcional do eixo HHG responde pela atividade ovariana cíclica, que por sua vez caracteriza as alterações dos níveis hormonais de estradiol e progesterona, que estão na base do comportamento sexual das leas. Com o intuito de detalhar e melhor compreender o comportamento sexual das fêmeas mamíferas em geral, este comportamento foi desdobrado em três fases distintas conceituadas por Beach (1976), sendo elas: 1) Atratividade: Demonstrada pelo quanto determinada fêmea têm de capacidade de atrair machos para perto de si. 2) Proceptividade: Caracterizada pelo comportamento claramente ativo de buscar o macho e sinalizar disposição para a atividade sexual. 3) Receptividade: Representada pela aceitação da cópula. Sabe-se que nos mamíferos em geral, a atratividade, a proceptividade e a receptividade estão positivamente correlacionadas aos altos níveis de estradiol, em especial se houver uma prévia exposição aos níveis aumentados de progesterona (BEACH, 1976; SHILLE; LUNDSTRÖM; STABENFELD, 1979; NELSON, 2000b; SENGER, 2003; UMAPATHY et al., 2007). Da mesma forma, altos níveis de progesterona reduzem ou até abolem o comportamento de atratividade, variando bastante o seu papel nas outras fases, na dependência da espécie estudada (NELSON, 2000b).

Uma vez que se consiga abolir a atividade ovariana cíclica, também estarão abolidos ou ao menos sensivelmente reduzidos os comportamentos sexuais relacionados a ela, ou seja, se não houver atividade ovariana cíclica, não se espera que ocorra comportamento de cio e nem cópulas. É o que ocorre no diestro, quando os altos níveis de progesterona inibem a liberação hipofisária de gonadotrofinas, impedindo a estimulação ovariana e mantendo os níveis de estradiol baixos (BRIGGS et al., 1990; UMAPATHY et al., 2007). No entanto, em leas, Schmidt et al. (1979), observaram que o comportamento de cio poderia, em alguns casos, não ser observado apesar dos níveis séricos de estradiol serem característicos da fase de estro. Em outras palavras, poderia haver dissociação entre o comportamento de estro e os níveis aumentados de estradiol.

3.5 Contraceção em espécies silvestres

Contraceção é a prevenção deliberada da prenhez (HUTCHINS, 2005). Tratando-se da reprodução sexuada e de espécies mamíferas, diversos métodos podem ser utilizados. Começando com a simples separação física, entre fêmeas e machos passando por procedimentos cirúrgicos para bloquear a passagem dos gametas ou para retirar órgãos do sistema reprodutor, chegando a diferentes tratamentos hormonais para alterar funções reprodutivas ou a aplicação de vacinas que induzam a produção de anticorpos que, ocupando receptores, interfiram com a função espermática, ciclos hormonais das fêmeas ou com a fertilização (BÖER; COHNEN; MEINICKE, 1996; HUTCHINS, 2005).

Para a maioria das espécies, é consideravelmente maior o número de opções existentes para contraceção desenvolvidas e aplicadas em fêmeas do que em machos. Em parte, isto se deve, ao fato de as fêmeas produzirem menos gametas e de forma descontínua quando comparadas com os machos. No entanto, deve-se também aos aspectos histórico-sociais-culturais humanos envolvidos, que geraram um mercado onde a maioria dos contraceptivos é direcionada às mulheres (ASA, 2005).

No caso específico dos leões, o crescimento descontrolado das populações cativas e de vida livre, gerou uma grande preocupação. Tanto do ponto de vista operacional (custos e espaço físico), passando por razões sanitárias (controle de doenças infecciosas) e chegando aos aspectos genético-populacionais, onde o alto grau de consangüinidade tornaria estas populações, com o tempo, inviáveis, tornou claro que o crescimento populacional teria que ser controlado (SEAL et al., 1975). Por estas razões, iniciaram-se estudos buscando métodos de controle populacional que fossem eficientes e simultaneamente, reversíveis, como forma de se assegurar que em uma eventualidade de súbita mortandade em uma população, viesse a ser possível lançar mãos de outros indivíduos para recompor a variabilidade genética (SEAL et al., 1975; ASA; PORTON, 2005).

3.5.1 Métodos cirúrgicos

Métodos cirúrgicos tradicionais como a orquiectomia, a vasectomia (ou deferentectomia), a ovário-salpingo-histerectomia, se mostraram eficientes, porém irreversíveis. Possíveis exceções seriam a vasectomia, na dependência da técnica utilizada, como a proposta por Silber e Junge (2005), aplicada em cachorro-vinagre (*Spheotos venaticus*) e a cauterização tubária realizada por via laparoscópica em leas (SUDEMEYER et al., 2003). Em ambos os casos, os autores relataram a reversibilidade das técnicas utilizadas.

Outro aspecto relevante a ser considerado é que após a orquiectomia, ocorre marcada redução dos níveis séricos de testosterona, o que leva a alterações das características sexuais secundárias fenotípicas (perda da juba nos leões) e do comportamento (relações de dominância e posições hierárquicas), com graves repercussões em espécies de hábitos gregários. No caso específico dos leões, tanto aspectos comportamentais modulados por esteróides sexuais, como a agressividade, quanto características fenotípicas ligadas a estes hormônios, como tamanho e cor de juba, interferem de maneira significativa nas interações sociais e sexuais, afetando a manutenção dos clãs (WEST; PACKER, 2002). Segundo estes autores, existe uma preferência por parte das leas, por machos com juba maiores e mais escuras, conforme já mencionado no item 3.2.

3.5.2 Métodos hormonais

Tratamentos hormonais vêm sendo utilizados para a obtenção da contracepção de diversas espécies de animais domésticos e silvestres (BRODNEY; FIDLER, 1966; SEAL et al., 1975; SEAL et al., 1976; BURKE; REYNOLDS; SOKOLOWSKI, 1977; TRIGG et al., 2001; WRIGHT et al., 2001; PELICAN et al., 2005; ASA; PORTON; JUNGE, 2007; CHUEI et al., 2007; HALL-WOODS et al., 2007; PATTON; JÖCHLE;

PENFOLD, 2007; PENFOLD et al., 2007; WHEATON et al., 2007; SCHOEMAKER et al., 2008). A seguir analisaremos aspectos ligados à eficiência, reversibilidade, praticidade e segurança daqueles mais utilizados em felinos domésticos e silvestres, com especial ênfase nestes últimos.

3.5.2.1 Progestágenos

Durante muitos anos, foi preconizado o uso de contraceptivos à base de progestágenos sintéticos como Acetato de Megestrol - MA (via oral), o Acetato de Medroxiprogesterona- MPA (via oral e injetável), Acetato de Melengestrol- MGA (implantes) e Levonorgestrel- LNG (implantes), tanto para felinos domésticos quanto para espécies silvestres (MUNSON, 2006). O mecanismo (ou mecanismos) específico pelo qual a contracepção se daria, não é totalmente elucidado, existindo possíveis teorias: 1- “*Feedback*” negativo no hipotálamo e na hipófise, levando à supressão da secreção de GnRH, FSH e LH, abolindo a folículo-gênese e a ovulação. 2- Alteração na motilidade do trato tubular, causando falha de transporte do oócito e da fertilização. 3- Receptividade alterada do endométrio resultando em falha na implantação (MUNSON, 2006). A literatura relata que nem implantes de MGA em felinos selvagens (KAZENSKY; MUNSON; SEAL, 1998) e nem os de LNG em gatos domésticos (BALDWIN et al., 1994) suprimiram o desenvolvimento folicular ou a ovulação, sugerindo que a hipótese da supressão hipotálamo-hipófise não seja o mecanismo pelo qual estes progestágenos efetuem a contracepção.

O Acetato de Megestrol (MA) têm sido utilizado para suprimir o estro em gatos domésticos (OEN, 1977; HOUDESHHELL; HENNESSEY, 1977; MC DONALD, 1980) e felinos silvestres em zoológicos, sendo muitas vezes a administração oral diária um fator limitante para o seu uso (CAG-AZA [2003]).

O Acetato de Medroxiprogesterona (MPA) também foi utilizado como contraceptivo para felinos domésticos (HENIK; OLSON; ROSYCHUK, 1985; SORENSON; SCHULTZ, 1997) e de zoológico (SEAL et al., 1975; KIRKPATRICK et al.,

1991). Para felinos selvagens, o tratamento com injeção de 5mg/kg, IM é recomendado a cada dois meses pelo Grupo de Aconselhamento em Contracepção da Associação Americana de Aquários e Zoológicos (CAG-AZA [2003]). Também foi utilizado com sucesso na dose de 1000mg (IM), seguido de 500mg (IM) a cada três meses, suprimindo o estro em leões (SEAL et al., 1976).

O Acetato de Melengestrol (MGA) têm sido o contraceptivo mais amplamente utilizado em felinos de zoológicos, dada a sua confiabilidade, reversibilidade e ação duradoura em todas as espécies testadas (SEAL et al., 1975; SEAL et al., 1976; DEMATTEO, 2005). O MGA também foi utilizado para controlar a reprodução de leões de vida livre (ORFORD; PERRIN, 1988). O MGA é utilizado em implantes silásticos, que aplicados SC ou IM, promovem a liberação contínua do progestágeno e desta forma, mantendo a contracepção. O uso de implantes contendo 20 mg de MGA/kg, pode promover a contracepção por no mínimo dois anos, com algumas variações entre as espécies (DEMATTEO, 2005).

O Levonorgestrel (LNG) têm sido utilizado em implantes com 16 mg em gatos domésticos, promovendo contracepção por até 1 ano de forma reversível (BALDWIN et al., 1994). No entanto, não existem estudos que avaliem a sua eficiência, segurança e reversibilidade a longo prazo (MUNSON, 2006).

Embora os progestágenos tenham se mostrado eficientes, econômicos e até reversíveis, foram observados inúmeros efeitos colaterais indesejáveis em todas as espécies estudadas (MUNSON, 2006).

Com o tempo, informações foram compiladas e consolidadas pelo (CAG-AZA [2003]), que concluiu ser este método eficiente, porém desaconselhável o seu uso a longo prazo. A utilização destes produtos por mais de 6 anos, mesmo que de forma descontinuada, aumentava significativamente a incidência de problemas como : hiperplasia endometrial cística, piometra (LONG, 1972; HENIK; OLSON; ROSYCHUK, 1985; BELLENGER; CHEN, 1990; MUNSON, 2002; MUNSON; MORESCO; CALLE, 2005), neoplasias ovarianas, uterinas e em glândulas mamárias (HERNANDEZ; CHERTACK; GAGE, 1975; KOLLIAS; CALDERWOOD-MAYS; SHORT, 1984; LINNEHAN; EDWARDS, 1991; MUNSON; STOKES; HARRENSTIEN, 1995; HARRESTIEN; MUNSON; SEAL, 1996; MISDORP, 2002; MUNSON, 2006), diabetes

(KOLLIAS; CALDERWOOD-MAYS; SHORT, 1984; KOLLIAS JR., 1996; MUNSON, 2006), androgenização (SEAL et al., 1976) e ganho de peso (CHEN; BELLENGER, 1987; BALDWIN et al., 1994).

3.5.2.2 Andrógenos

A utilização de andrógenos em fêmeas de felinos foi tentada com o objetivo de promover bloqueio da liberação hipofisária de LH e conseqüente supressão da função gonadal (BURKE, 1977). Com esta intenção, foram aplicadas diferentes doses (7- 8 µg/dia V.O.) do andrógeno mibolerone em fêmeas de três espécies de felinos selvagens, onça-pintada (*Panthera onça*), leopardo (*Panthera pardus*) e leão africano, concluindo serem os tratamentos eficientes na supressão do estro nas três espécies. No entanto, efeitos colaterais indesejáveis como aumento da agressividade e masculinização (crescimento de juba na leoa) foram observados, contra indicando o seu uso (GARDNER et al., 1985).

3.5.2.3 Agonistas de GnRH

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é produzido no hipotálamo e age sobre o lobo anterior da hipófise, promovendo a liberação das gonadotrofinas FSH e LH (MUNSON, 2006). Agonistas de GnRH apresentam a mesma ação, porém com maior intensidade e duração. Diversos agonistas de GnRH são comercializados, como o acetato de triptorelina, o acetato de leuprolide, a buserelina, a nafarelina, a goserelina e a deslorelina (ASA, 2005). Entre os produtos disponíveis no mercado, a deslorelina (Suprelorin®, Peptech Animal Health, Austrália), sob a forma de implantes SC, vêm sendo utilizada em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres

(BERTSCHINGER et al., 2001, 2002; MUNSON et al., 2001; TRIGG et al., 2001; WRIGHT et al., 2001;).

O tratamento com a deslorelina, inicialmente promove uma estimulação da liberação das gonadotrofinas, com conseqüente indução da foliculogênese e da ovulação, podendo também induzir o comportamento de estro devido ao aumento dos níveis séricos de estradiol. Com a manutenção da liberação do agonista pelos implantes, ocorre uma redução da liberação das gonadotrofinas provocada pela saturação dos receptores hipofisários (“*down regulation*”), e esta redução por sua vez, diminui a produção de esteróides sexuais pelos ovários, bloqueando a foliculogênese e a ovulação. Como efeito final deste processo, a inatividade ovariana proporciona uma condição anticoncepcional mantendo os níveis de esteróides sexuais, estradiol e progesterona, em níveis basais, evitando assim os efeitos colaterais indesejados (BERTSCHINGER et al., 2001; MUNSON et al., 2001; BERTSCHINGER et al., 2002).

Implantes de deslorelina contendo de 5 a 10 mg (na dependência do peso do animal) mostraram-se eficientes por até dois anos em leopardo da neblina (*Neofelis nebulosa*) e guepardo (*Acinonyx jubatus*), sem a ocorrência de efeitos adversos (BERTSCHINGER et al., 2001; BERTSCHINGER et al., 2002). No entanto, a reversibilidade do método ainda necessita de mais tempo e experimentos para ser determinada.

3.5.3 Métodos imun contraceptivos

O processo de fertilização envolve a ligação do espermatozóide à zona pelúcida, composta de glicoproteínas que recobrem o oócito. A imunização de animais, não suínos, contra estas proteínas induz a produção de anticorpos que interferem com o processo de fertilização por ocuparem os sítios de ligação (PATERSON; AITKEN, 1990).

3.5.3.1 Vacina de Zona Pelúcida Porcina (PZP)

Conhecida pela sua sigla inglesa PZP, esta vacina têm sido utilizada com sucesso em diferentes espécies de ungulados silvestres (KIRKPATRICK, 1996a,b; PATTON; JÖCHLE; PENFOLD, 2007). Esta técnica, têm se mostrado eficiente, reversível, podendo ser aplicada durante a prenhes e a lactação. Entretanto, estudos de longo prazo realizados com o veado-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) e cavalos ferais (*Equus caballus*), demonstraram que a manutenção do tratamento por cinco ou mais anos estava associada a uma crescente falência ovariana (KIRKPATRICK et al., 1997). Outro aspecto importante é que este método impede a fertilização, mas mantém a ciclicidade ovariana, podendo prolongar a duração da estação reprodutiva e até mesmo aumentar a agressividade dos machos, uma vez que as fêmeas apresentam cios por mais tempo.

A PZP foi testada em diferentes espécies de felinos silvestres, com resultados insatisfatórios. Além de não promover a contracepção, também produziu níveis inaceitáveis de efeitos colaterais produzidos pelos adjuvantes vacinais, como extensas e dolorosas reações nos locais de aplicação, levando ao surgimento de processos necróticos cutâneo-musculares e aumentando a agressividade dos animais (HARRESTIEN et al., 2004; MUNSON, 2006).

3.6 Métodos não-invasivos para o estudo endócrino-reprodutivo

Os tradicionais métodos de estudos endócrinos pressupõem colheitas seriadas de sangue para que sejam realizadas as mensurações hormonais. Estes métodos se mostraram inadequados, ou mesmo inexecutáveis para a maioria das espécies silvestres, tanto pelo alto risco de acidentes nos procedimentos das colheitas, como pela impossibilidade de se anestesiarem seguidamente um mesmo indivíduo. Outro aspecto não menos importante é alto nível de estresse produzido durante as

contenções para as colheitas. A interferência no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadas, produzido pelos hormônios liberados durante a resposta do tipo estresse, cortisol e corticosterona, já foi descrita e pode comprometer os resultados do experimento (BROWN et al., 2006). Desta forma, tornava-se necessária a implementação de métodos não invasivos que permitissem colheitas seriadas, sem produzir respostas estressantes e que pudessem ser utilizados de maneira segura para os operadores e para os animais.

No fim da década de 70 e meados da de 80, surgiram os primeiros trabalhos que propunham extrair e dosar metabólitos fecais ou urinários de hormônios esteróides, como uma ferramenta auxiliar para o estudo da endocrinologia de primatas não humanos (HODGES; CZEKALA; LASLEY, 1979; RISLER.; WASSER; SACKETT, 1987). A partir de trabalho pioneiro, realizado em seres humanos (ADLERCREUTZ; MARTIN, 1976), foram realizados também estudos com eqüinos (BAMBERG et al., 1984) e bovinos (MÖSTL et al., 1984) domésticos. Uma série de estudos longitudinais foram realizados com diferentes espécies silvestres ao longo dos anos 80, 90 e nesta década, abordando aspectos reprodutivos como sazonalidade, ciclicidade ovariana, prenhes, comportamento reprodutivo e a influência do estresse alterando características hormonais e comportamentais (POOLE et al., 1984; KIRKPATRICK et al., 1991; MONFORT; ARTHUR; WILDT, 1991; BROWN et al., 1993a,b,1994; WASSER et al., 1994; WHITE et al., 1995; BROWN et al., 1996, 1997; CREEL et al.,1997; WASSER et al., 1997; MORROW; MONFORT, 1998; STRIER; ZIEGLER; WITTEWER, 1999; ALBUQUERQUE et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2002b).

Outro aspecto de grande relevância é que a utilização da extração e dosagem de metabólitos fecais e urinários de hormônios esteróides, possibilitou também que os resultados pudessem ser analisados sem a interferência das flutuações circadianas, uma vez que o que se mensura é a somatória de todas as variações que ocorreram em um determinado período de tempo. Na dependência da matriz utilizada e da espécie em questão, existirá um intervalo de tempo onde as variações de um determinado hormônio, após a metabolização e excreção, serão refletidas ou manifestadas nos níveis de seus metabólitos fecais e urinários (MONFORT et al., 1997). Por esta razão as colheitas devem ser realizadas sempre em um mesmo período do dia.

No caso de metabólitos urinários, o tempo necessário para a eliminação dos metabólitos é geralmente inferior a 12 horas (MONFORT et al., 1997) e no caso dos fecais, de 12 a 24 horas para ruminantes (MORROW; MONFORT, 1998), 24 horas para carnívoros e 24 a 48 horas para primatas (WASSER et al., 1994) e herbívoros monogástricos (WASSER et al., 1996).

As vias de metabolização e excreção também variam de acordo com o hormônio e com a espécie, sendo que para felinos, mais de 90% dos metabólitos de esteróides gonadais, são eliminados pelas fezes (BROWN et al., 1994).

Com a introdução destas ferramentas não invasivas, tornou-se possível a realização de estudos endócrino-reprodutivos em espécies silvestres em cativeiro e em vida livre, gerando dados de grande relevância para o conhecimento da fisiologia e do comportamento destas espécies.



Fonte: GUIMARÃES, M. A. B. V. - Budapeste, 2008.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Os animais

Foram estudados 5 exemplares adultos, fêmeas de leão africano (*Panthera leo*), identificadas como: Zomba, Salita, Pretória, Ilara e Rouge. (Figuras 1 a 4), mantidas em cativeiro com um exemplar macho vasectomizado, chamado Kirongozi (Figura 5), na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, em São Paulo, capital. Todas as leas apresentavam em seu histórico reprodutivo a ocorrência de prenhes com parto, sendo que nenhuma delas foi submetida anteriormente a qualquer tipo de manejo contraceptivo, exceto a separação física e a manutenção com machos vasectomizados.

As idades e o tempo de cativeiro no zoológico estão expressos na tabela1. As leas Salita, Ilara e Rouge nasceram no Zoológico de São Paulo e Zomba e Pretória chegaram de outro cativeiro, com 6 meses de idade.

Tabela1- Composição do grupo experimental de leas (*Panthera leo*), com nomes, idades e tempo de cativeiro na Fundação Parque zoológico de São Paulo

Nomes	Zomba	Salita	Pretória	Ilara	Rouge
Idade	7 anos	6 anos	7 anos	13 anos	6 anos
T C Z S P*	6,5 anos	6 anos	6,5 anos	13 anos	6 anos

* Tempo de cativeiro no Zoológico de São Paulo.



Figura 1 - Exemplo de leoa africana (*Panthera leo*), identificada como Salita



Figura 2 - Exemplos de leas africanas (*Panthera leo*), identificadas como Ilara (ao fundo) e Rouge



Figura 3 - Exemplar de leoa africana (*Panthera leo*) , identificada como Zomba



Figura 4 - Exemplo de leoa africana (*Panthera leo*), identificada como Pretória



Figura 5 - Exemplar macho, vasectomizado, de leão africano (*Panthera leo*), identificado como Kirongozi

Os animais eram mantidos em uma área composta por um solário, medindo aproximadamente 300m² e uma área coberta, medindo aproximadamente 200m², dividida em seis compartimentos, aonde a alimentação era colocada no fim do dia e os animais ali permaneciam por toda noite. Para facilitar as colheitas de fezes, os animais dormiam separadamente. Durante o dia, permaneciam no solário. A alimentação fornecida foi a padronizada pela Fundação Parque Zoológico de São Paulo, constituída de músculo e vísceras de bovino, pescoço de frango e suplementos vitamínicos. Os leões eram alimentados uma vez ao dia, seis dias por semana. O suprimento de água era “ad libitum”.

4.2 Colheita de amostras

Por um período de 2,5 meses foram colhidas duas amostras fecais semanais de cada uma das fêmeas, sempre no período da manhã. Este período inicial de colheita visava caracterizar hormonalmente a ciclicidade das leoas, antes da colocação dos implantes de deslorelina.

As amostras fecais colhidas foram homogenizadas e acondicionadas em sacos plásticos do tipo "zip-lock" e mantidas congeladas em freezer à - 29°C até o momento das extrações. Também foram observados os aspectos comportamentais relativos à ocorrência deaios e cópulas.

Após a aplicação dos implantes, foram realizadas colheitas de fezes das leoas, duas vezes por semana por 32 meses, sempre pela manhã, armazenadas de forma semelhante a já descrita, com o objetivo de monitorar os níveis de metabólitos hormonais fecais buscando caracterizar a ocorrência de ciclos ovarianos. Também neste período, foram observados padrões comportamentais sugestivos de estro.

Caso, após este período, alguma leoa ainda não demonstrasse sinais de retorno ao estro comportamental ou de atividade hormonal cíclica ovariana, o período de monitoração poderia ser prorrogado por mais três meses.

4.3 Monitoração endócrina

A ciclicidade ovariana das leoas foi monitorada, em termos endócrinos, com o uso de extração e dosagem de metabólitos fecais de hormônios esteróides sexuais, a saber: estradiol e progesterona (neste trabalho também chamadas de progestinas), conforme recomendado por Graham e Brown (1996).

4.3.1 Técnica de extração

A técnica utilizada para a extração foi a descrita por Brown et al. (1993a,b, 1994,1996) e Brown e Wildt (1997). O procedimento utilizado para cada amostra será descrito de forma sumária a seguir: Inicialmente, as amostras foram liofilizadas para padronização da matéria seca, em aparelho liofilizador Speed Vac (Speed vc-Sc110, Savant). Foram pesadas 0,2 g de fezes liofilizadas, de cada amostra e foram acrescidos 5 ml de etanol 90% (90% etanol:água destilada). Após homogeneização em aparelho vortex (PHOENIX, MOD AT 56) por 1 minuto, as amostras foram fervidas por 25 minutos. Durante esse tempo, o etanol evaporado foi gradativamente repostado para que nenhuma amostra ficasse seca, de forma que ao final desta etapa, o volume inicial estivesse mantido. Foram então centrifugadas por 15 minutos a 500G em centrífuga Excelsa (Mod 206 MP-Fanem), e o sobrenadante recuperado. O “pellet” foi ressuspensionado em 5 ml de etanol 90%, homogenizado em aparelho vortex por 1 minuto e recentrifugado. Os dois sobrenadantes foram combinados, secos completamente e então, ressuspensionados em 1 ml de metanol. Os extratos foram homogenizados por 1 minuto, colocados em copo limpador ultrassônico (Ultra Sonic Cleaner, USC-1450 – Unique) por 15 minutos e encaminhados para dosagem por radioimunoensaio. Para estas dosagens, foram adicionadas às amostras, uma solução tampão de PBS + gelatina 0,1 mol.

4.3.2 Técnica de dosagens hormonais

Após a ressuspensão das amostras, uma alíquota de 200 μ l da solução foi encaminhada para realização das dosagens através da técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida com o uso de conjunto comercial “Estradiol Coat-a-Count[®] (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA) para metabólitos fecais de estradiol. Para as dosagens de metabólitos fecais de progesterona, optou-se pelo

conjunto comercial “Progesterone DSL-3900[®]” (Diagnostic System Laboratories Inc., Webster, EUA), por apresentar anticorpo com maior percentual de reações cruzadas com os metabólitos de progesterona.

Os percentuais de reações cruzadas de ambos os conjuntos comerciais estão informados na tabela 2. As leituras foram realizadas em duplicata, em contador Packard Cobra Auto-Gamma[®], no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os resultados foram obtidos em ng/ml em cada tubo e depois convertidos para ng/g de fezes liofilizadas ou secas com o uso da fórmula:

$$CF = \frac{C \times VF}{Pi}$$

Sendo:

CF = concentração final em ng/g de fezes

C = concentração fornecida pelo RIE em ng/ml

VF = volume final da resuspensão em ml

Pi = peso inicial da amostra em gramas

Foram realizadas validações para os ensaios de ambos os hormônios. As validações são necessárias porque os conjuntos comerciais para dosagens hormonais são confeccionados para dosar hormônios na forma química íntegra, ou seja, com a estrutura molecular com a qual eles circulam no sangue em seres humanos e deveriam ser dosados os metabólitos destes hormônios em fezes de animais. O método utilizado para as validações é teste do paralelismo, onde uma curva de diluição seriada do hormônio padrão foi comparada com outra, obtida por diluição semelhante do mesmo padrão na matriz (extrato fecal) depletada de esteróides com o uso de carvão dextran. A existência de paralelismo entre as curvas foi mensurada pela análise de regressão linear.

Para a caracterização de picos nos níveis de metabólitos de ambos os hormônios estudados, foram calculados média e desvio-padrão de todo o período estudado para cada animal. Em seguida foi utilizado o critério matemático de considerar

como pico todos os valores que excederem ao valor da soma da média mais um e meio desvios-padrão. Os valores inferiores foram considerados como elevações e quedas dentro dos níveis basais.

Tabela 2 - Percentuais de reações cruzadas dos conjuntos diagnósticos comerciais para Radioimunoensaio para dosagem de estradiol ("Estradiol Coat-a-Count[®]" (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA) e progesterona ("Progesterone DSL-3900[®]" Diagnostic System Laboratories Inc., Webster, EUA)

Estradiol Coat-a-Count[®]

% de reação cruzada	Esteróide
100	Estradiol 17β
10,0	Estrona
4,4	d- Equinilina
1,8	Etrona-β-D-glucoronide
0,8	Equilina
0,58	Sulfato de estrona

Progesterone DSL-3900[®]

% de reações cruzadas	Esteróide
100	Estradiol 17β
6,9	Estrona
0,27	Estradiol 17β-3-glucuronide
0,03	Equilina
0,4	Equilenina

4.4 Monitoração comportamental

Os animais foram observados por, no mínimo, três vezes por semana, em 2 períodos de 30 minutos, pela manhã e à tarde. As variáveis comportamentais avaliadas para identificação de estro foram:

- Vocalização, inquietação, rolamento, lordose, atração do macho e aceitação de monta e cópula, conforme descritos por Schaller (1976).

4.5 Aplicação dos implantes

Os animais foram contidos químicamente com o uso de cloridrato de cetamina (Vetaset®, Fort Dodge do Brasil) na dose de 10mg/Kg, I.M., associado ao cloridrato de xilazina (Rompun®, Bayer do Brasil) na dose de 1mg/Kg, I.M. (Figura 6). O implante utilizado contém 9,5 mg de acetato de deslorelina (Suprelorin® Peptech Animal Health, Sidney), (Figura 7). Foi aplicado 1 implante por animal, por via sub-cutânea na região do dorso, no espaço inter-escapular, seguindo a recomendação de Trigg et al. (2001), com o auxílio de aplicador específico fornecido pelo fabricante (Figura 8). Os implantes são absorvidos pelos animais, não sendo necessária a sua retirada.



Figura 6 - Leoa Zomba, sob efeito da anestesia, com venda e membros amarrados

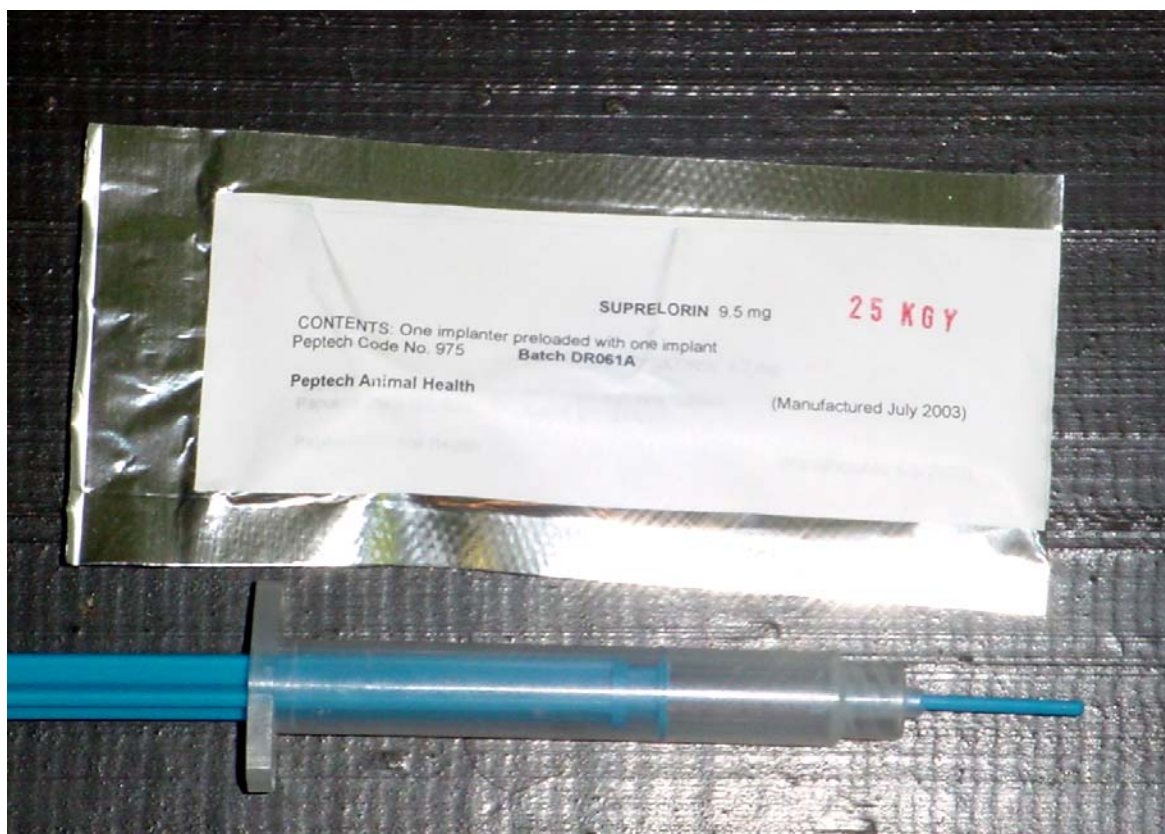


Figura 7-. Embalagem do implante de deslorelina (Suprelorin®), com o aplicador



Figura 8 - Aplicação sub-cutânea do implante de deslorelina na leoa Zomba



Fonte: GUIMARÃES, M. A. B. V. - Budapeste, Hungria 2008.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira fase, com duração de 2,5 meses, foram observados 9 estros comportamentais, sendo 3 da leoa Zomba, 2 de Salita, 2 de Pretória, 1 de Ilara e 1 de Rouge. As características comportamentais observadas foram as mesmas descritas na literatura (SCHALLER, 1976), como rolamento, vocalizações, lordose e aumento da proceptividade da fêmea em relação ao macho presente e mesmo à outras fêmeas. Durante estas manifestações de estro, ocorreram diversas brigas entre as leoas, concordando com o comportamento descrito por Schaller (1976). A duração média dos estros foi de $5,8 \pm 2,2$ dias, dentro do intervalo reportado na literatura por Sadleir (1966a,b) e Seager e Demorest (1978), 4 a 16 dias (média 8,7) e por Eaton (1974), de 4 a 8 dias. Na literatura existem referências a grandes variações em animais de vida livre em, como mencionado por Schaller (1976), variando de menos de 24 horas até 22 dias. Se excluirmos a leoa Rouge, que apresentou apenas um estro comportamental e com duração de 2 dias, obteremos uma média de $6,3 \pm 1,8$ dias.

Por um período de 1 a 9 dias, após a colocação do implante, foram observados comportamentos de estro em duas leoas, Pretória (duração de sete dias) Ilara (duração de 9 dias), sendo que em nenhum dos casos houve cópula, apenas vocalizações e mímicas posturais como, rolamento, lordose, e evidente aumento da proceptividade das fêmeas em relação ao macho vasectomizado que era mantido no grupo. É interessante notar que em ambos os casos, o cio foi mais longo do que o observado antes da colocação dos implantes, sem, no entanto, ter ocorrido cópula. Os resultados da validação laboratorial de ambos os hormônios estão apresentados a seguir, nas figuras 9 e 10.

Regression Summary**Curva adapt E2 fezes vs. Curva kit E2**

Count	6
Num. Missing	0
R	,995
R Squared	,990
Adjusted R Squared	,987
RMS Residual	134,503

ANOVA Table**Curva adapt E2 fezes vs. Curva kit E2**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Regression	1	7156899,701	7156899,701	395,606	<,0001
Residual	4	72363,993	18090,998		
Total	5	7229263,694			

Regression Coefficients**Curva adapt E2 fezes vs. Curva kit E2**

	Coefficient	Std. Error	Std. Coeff.	t-Value	P-Value
Intercept	76,324	69,950	76,324	1,091	,3365
Curva kit E2	,850	,043	,995	19,890	<,0001

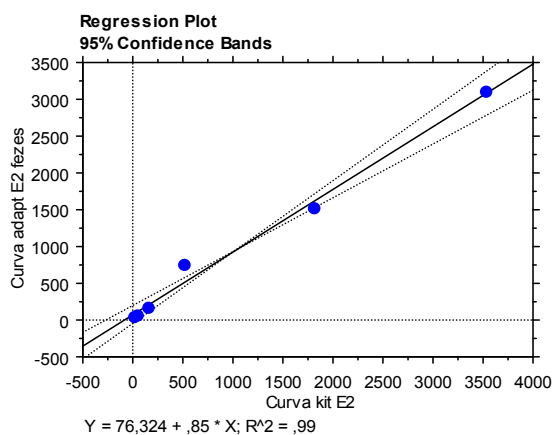
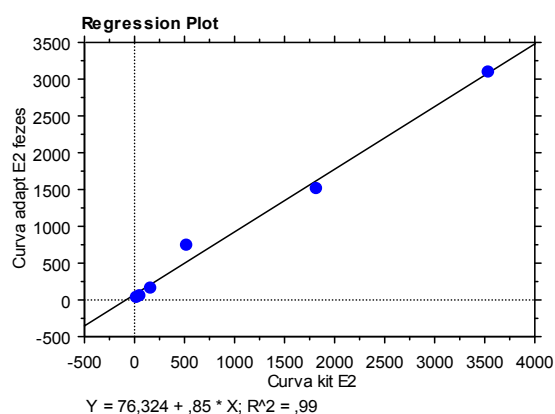


Figura 9 - Resultados da validação laboratorial do conjunto comercial Estradiol ® Cont-a-Count DPC MEDlab, para dosagem de estradiol

Regression Summary
Curva adapt vs. Curva kit

Count	5
Num. Missing	0
R	,990
R Squared	,980
Adjusted R Squared	,973
RMS Residual	3,793

ANOVA Table

Curva adapt vs. Curva kit

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Regression	1	2116,148	2116,148	147,061	,0012
Residual	3	43,169	14,390		
Total	4	2159,317			

Regression Coefficients

Curva adapt vs. Curva kit

	Coefficient	Std. Error	Std. Coeff.	t-Value	P-Value
Intercept	5,028	2,400	5,028	2,095	,1271
Curva kit	1,422	,117	,990	12,127	,0012

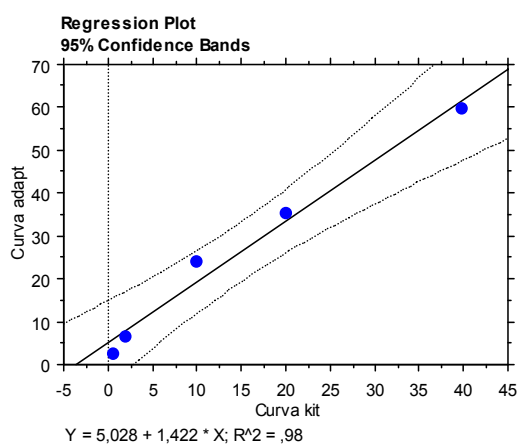
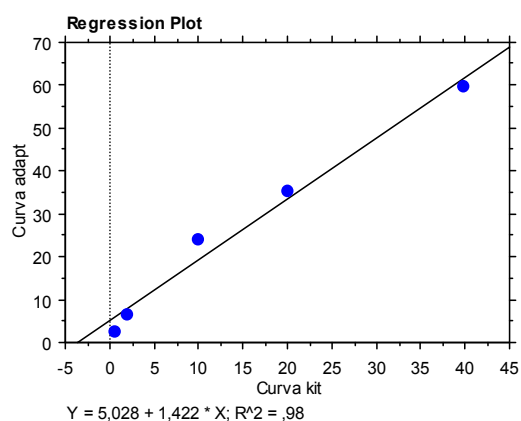


Figura 10 - Resultados da validação laboratorial do conjunto comercial Progesterone ® DSL, para dosagem de progesterona

Analisando os resultados das validações, vemos que em ambos os casos, os anticorpos dos conjuntos comerciais foram eficientes, tanto para progesterona quanto para estradiol, conforme demonstrado pelos valores encontrados para $R^2 = 0,98\%$ e $R^2 = 0,99\%$, respectivamente. Estes resultados validam o uso destes anticorpos comerciais em matriz fecal de leoas.

Os resultados dos Controles de Qualidade dos ensaios hormonais estão expressos nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Controles de Qualidade dos ensaios hormonais de progesterona

HORMÔNIO: PROGESTERONA

Ensaio	Controle				COM	COM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
	C1	C2	C3	C4	Ponto 0	total	B/B0	COM	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	0,89969	8,9012	0,82249	8,1044	15898,5	29111	55%	254,50	0,87%	93,47(0,07)	6,34%	6,63%
2	1,0296	9,0182	1,1226	9,925	15666,5	28752,5	54%	270,00	0,94%	94,38(0,07)	6,11%	6,77%
3	1,1244	10,651	1,1487	11,827	17715,5	32823,5	54%	426,50	1,30%	94,6(0,01)	1,51%	7,40%
CV Inter ensaio	1,0178967	9,5234667	1,0312633	9,9521333							0,92%	3,11%

Tabela 4 - Controles de Qualidade dos ensaios hormonais de estradiol

HORMÔNIO: ESTRADIOL

Ensaio	Controle				CPM	COM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
	C1	C2	C3	C4	ponto 0	Total	B/B0	CPM	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	1790	23,015	1820,8	24,771	9037,5	17413	52%	132,50	0,76%	95,7(3,85)	1,21%	5,20%
2	610,62	22,513	623,05	25,151	13140,5	27273,5	48%	275,50	1,01%	94,9(1,83)	1,42%	7,83%
3	600,02	21,356	612,23	20,452	14732,5	30320,5	49%	331,00	1,09%	95,9(2,07)	1,42%	3,06%
CV Inter ensaio	0,122445	20,9235	0,148015	20,3015							1,29%	3,60%

Como demonstrado, o Coeficiente de Variação (CV) Intra-ensaio e Inter-ensaio para progesterona foram 7,40% e 3,11% e para o estradiol, os CV Intra-ensaio e Inter-ensaio foram 7,83% e 3,60%, respectivamente.

Os resultados das mensurações de metabólitos fecais de ambos os hormônios estudados estão apresentados individualmente, nas figuras 11,12,13,14 e 15.

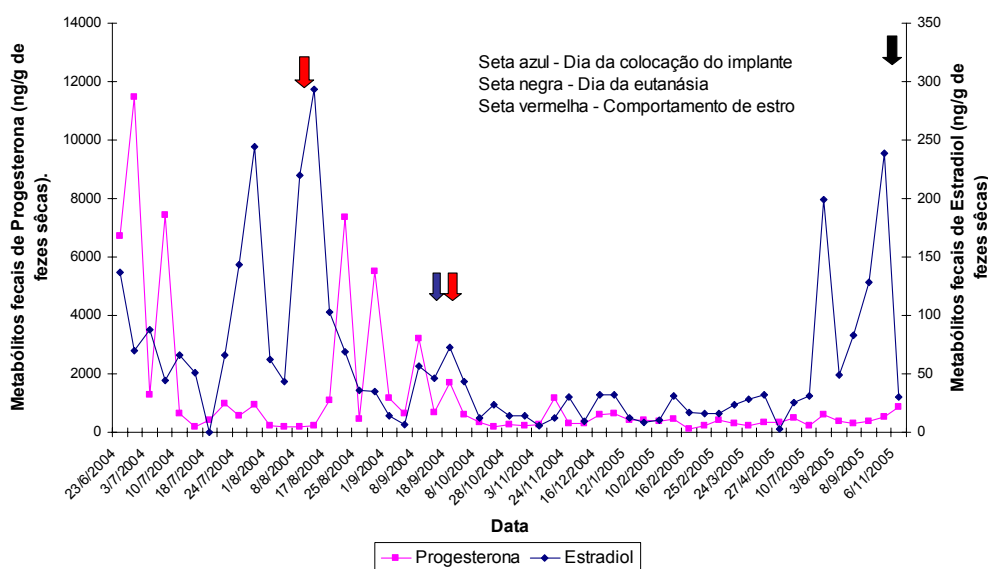


Figura 11 - Perfil dos metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Ilara (*Panthera leo*) - São Paulo - 2007

Analisando o gráfico da figura 11, percebe-se que Ilara após uma fase de progestinas aumentadas, certamente um diestro, apresentou aumento marcado nos níveis de metabólitos de estradiol, coincidindo com a observação de cio comportamental e a ocorrência de cópulas, caracterizando a presença do estro. Em seguida, novo aumento de progestinas, sugerindo ovulação e iniciou-se outro diestro. O implante foi aplicado no fim desse diestro. Após a colocação do implante, foi verificada uma pequena elevação dos metabólitos de estradiol e observado comportamento de cio, desta vez, porém sem cópulas e sem indícios de ter ocorrido ovulação. A partir de então, os níveis de metabólitos de ambos os hormônios se mantiveram em níveis considerados basais e constantes por aproximadamente 12 meses, quando foram notados dois aumentos pronunciados dos metabólitos de estradiol, sem, no entanto ter

sido observado nenhum comportamento de cio. Lamentavelmente, a leoa Ilara foi eutanasiada em dezembro de 2005, aproximadamente 15 meses após a colocação do implante, por ter apresentado uma neoplasia maligna em laringe. Foi uma decisão da instituição mantenedora, a qual respeitamos, especialmente por tratar-se de um procedimento ético no sentido de evitar maiores sofrimentos para o animal, uma vez que a neoplasia era inoperável e o estado geral do animal começou a deteriorar. Por esta razão, todas as informações referentes à leoa Ilara, cessam em dezembro de 2005. Curiosamente, Ilara foi a única dentre todas as leoas a apresentar estes picos de metabólitos de estradiol a partir de aproximadamente 12 meses após a colocação dos implantes. Embora não tenha apresentado comportamento de estro neste período, o perfil hormonal encontrado sugere que poderia estar-se iniciando um processo de retorno da ciclicidade ovariana, que infelizmente, em decorrência de sua morte, não foi possível mais ser acompanhado. Por razões que escaparam à vontade do autor, o aparelho reprodutor de Ilara não foi conservado após a necropsia, inviabilizando um exame macroscópico e histopatológico de útero e ovários, que poderiam fornecer preciosas informações sobre o estado funcional reprodutivo do animal.

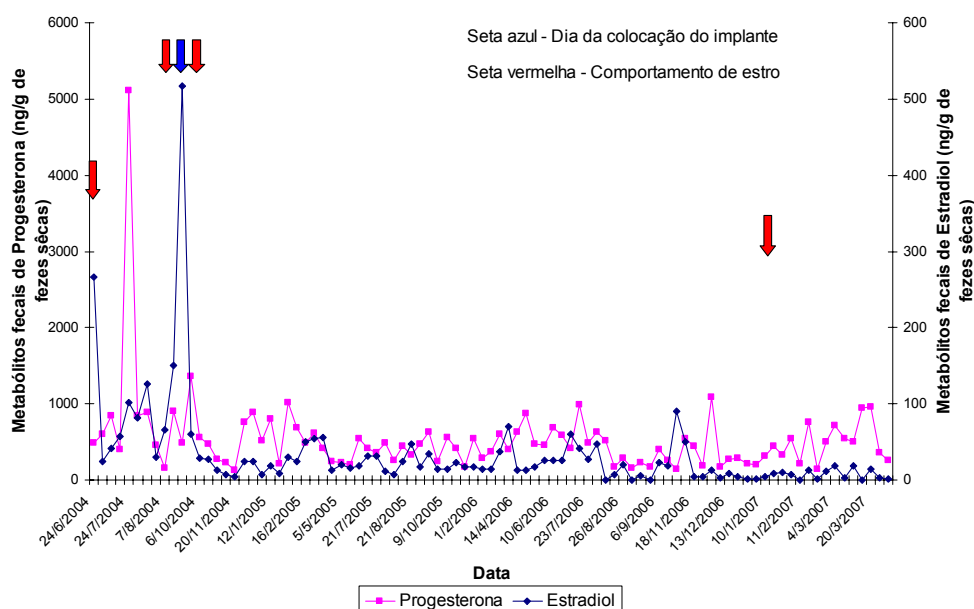


Figura 12 - Perfil de metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Pretória (*Panthera leo*) - São Paulo - 2007

Observando o gráfico da figura 12, nota-se que a leoa Pretória apresentava comportamento de cio coincidente com níveis aumentados de metabólitos de estradiol, demonstrando em seguida aumento dos níveis de progesterinas, compatíveis com a ovulação induzida pelas cópulas observadas durante o estro, portanto, entrando no diestro. Após este diestro, verificou-se novo aumento dos níveis de metabólitos de estradiol, cujo pico foi acompanhado de novo cio comportamental, quando então foi aplicado o implante. Após a colocação do implante, houve manifestação de cio, com os níveis de metabólitos de estradiol ainda altos, porém sem a ocorrência de cópulas e sem indícios de ovulação, uma vez que os níveis de progesterinas não se alteraram. Daí em diante, os níveis de ambos os metabólitos permaneceram basais até o término do experimento, 35 meses depois de aplicado o implante. No entanto, após 31 meses, Pretória apresentou comportamento de cio, com cópulas, sem, no entanto, ter ocorrido aumento dos níveis de metabólitos de estradiol e nem de progesterinas, sugerindo que não tenha ocorrido ovulação apesar das cópulas. É interessante destacar a ocorrência de cio comportamental desacompanhado de aumentos de metabólitos de estradiol.

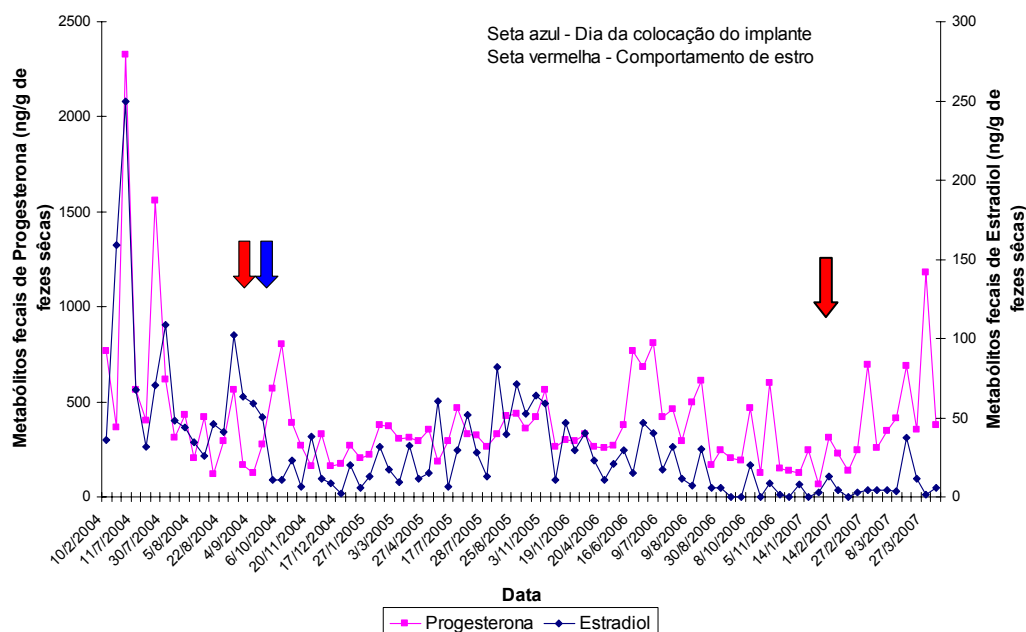


Figura 13 - Perfil de metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Rouge (*Panthera leo*) - São Paulo - 2007

A figura 13 mostra os resultados da leoa Rouge, onde se percebe, logo no início, que apesar dos altos níveis de metabólitos de estradiol, não foi observado comportamento de cio, mas houve aumento subsequente nos níveis de progesterinas, sugerindo a ocorrência de ovulação. Este resultado pode refletir uma ovulação espontânea ou pode ter ocorrido cio comportamental com cópula, que não foi percebido por falha de observação. Em seguida, foi observado comportamento de cio, com cópula, coincidente com aumento dos níveis de metabólitos de estradiol, atingindo valores de pico, embora inferiores aos observados anteriormente. O implante foi aplicado no fim do estro e depois disso, não foram observados comportamentos de cio e os níveis de progesterinas apresentaram discreta elevação, dentro de limites considerados basais. Por 33 meses, ambos os metabólitos apresentaram elevações, porém sempre dentro dos limites basais. Após este período, foram observados comportamentos de estro com cópulas. Este cio comportamental foi observado durante uma fase caracterizada pelos níveis baixos de metabólitos de estradiol e foram sucedidos por um marcado aumento dos níveis de progesterinas, que alcançaram valores de pico, sugerindo que possa ter ocorrido ovulação espontânea. Os níveis de metabólitos de estradiol se mantiveram oscilando dentro de limites basais até o fim do experimento, não havendo, neste caso correlação entre os níveis deste hormônio e o comportamento de cio observado.

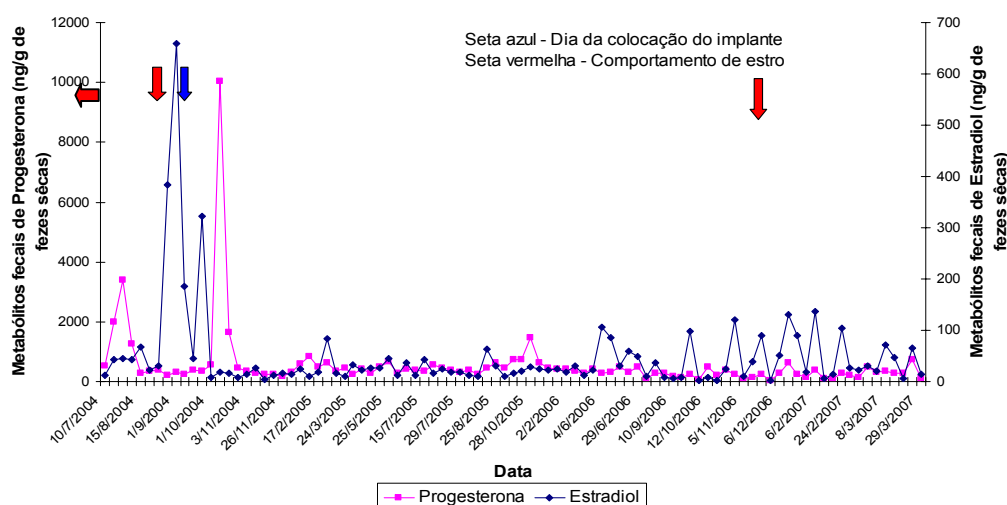


Figura 14 - Perfil de metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Salita (*Panthera leo*) - São Paulo - 2007

A figura 14 apresenta os resultados hormonais da leoa Salita. Este animal apresentava cio comportamental com cópulas e subsequente aumento de progesterona, sugerindo ovulação e caracterizando a ocorrência de diestro. Em seguida iniciou outro ciclo, com marcado aumento dos níveis dos metabólitos de estradiol, alcançando valores de pico e apresentando comportamento de cio, com cópulas. O implante foi colocado durante o estro e subsequentemente, os níveis de metabólitos de estradiol apresentaram um novo pico, quando não foi observado comportamento de cio. Os níveis de progesterona apresentaram um marcado aumento logo após esta última elevação de estradiol, atingindo valores de pico e sugerindo que tenha ocorrido ovulação, mesmo na ausência de cópula, caracterizando um diestro. Estes resultados podem indicar a ocorrência de ovulação espontânea ou pode ter ocorrido cio comportamental que não foi observado. Outra hipótese é que a aplicação do implante induziu a ovulação de folículo ou folículos pré-ovulatórios já presentes naquele momento. Após este diestro, os níveis de progesterona se mantiveram basais pelo resto do experimento. Os níveis de metabólitos de estradiol apresentaram discretas elevações sucessivas, a partir do 22^o mês, acompanhadas de comportamento de cio, com cópulas, mas sem indícios de ovulação, uma vez que não houve elevações das progesteronas. Estes resultados podem ser interpretados como indícios de início de atividade ovariana, sendo esta capaz de produzir elevações de estradiol suficientes para desencadear o comportamento de cio com cópulas, mas ainda não funcional a ponto de sensibilizar o hipotálamo e permitir, após o estímulo mecânico da cópula, o surgimento de pulsos ovulatórios de LH.

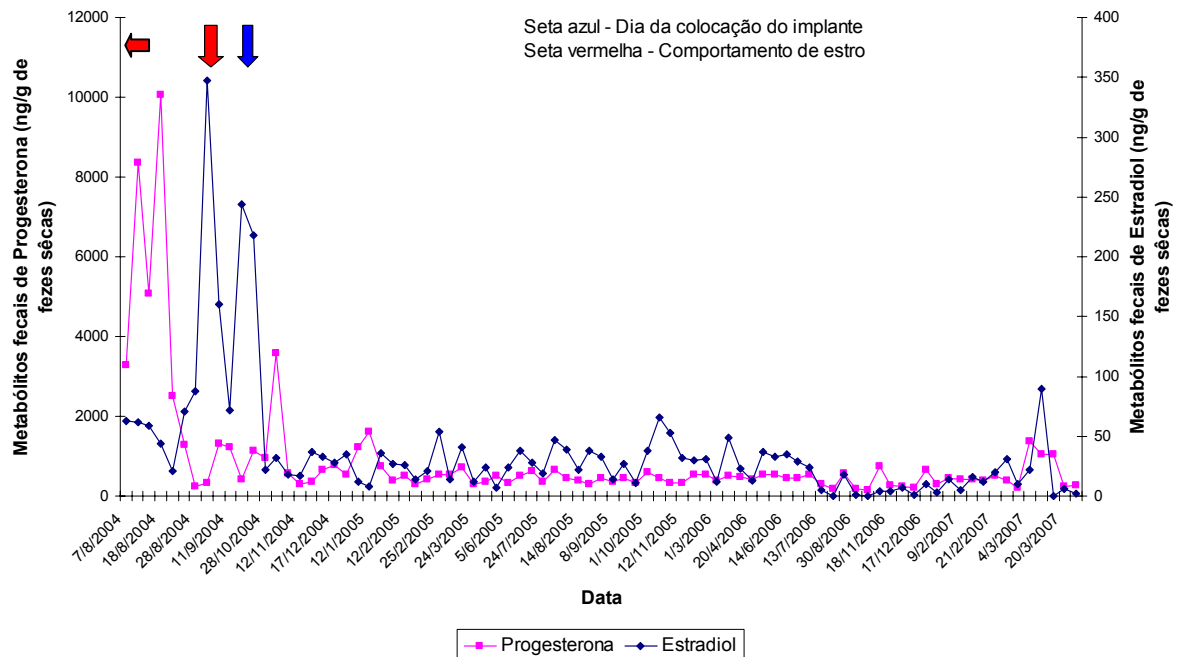


Figura15 - Perfil de metabólitos fecais de progesterona e estradiol da leoa Zomba (*Panthera leo*) - São Paulo - 2007

Na figura 15, o gráfico mostra os resultados da leoa Zomba e percebe-se que estes se iniciam com um marcado aumento de progestinas após a observação de cio comportamental com cópulas, portanto caracterizando um diestro. Em seguida ocorre aumento pronunciado dos níveis de metabólitos de estradiol, alcançando valores de pico, coincidindo com novo comportamento de cio e cópulas, enquanto os valores de progestinas se encontravam basais, caracterizando o estro. O implante foi aplicado próximo ao fim do estro e em seguida houve um aumento marcado nos níveis de metabólitos de estradiol, sem comportamento de cio e nem cópulas. No entanto, após esta elevação, houve um aumento marcado nos níveis de progestinas, atingindo valores de pico, sugerindo ter ocorrido uma ovulação. Estes resultados podem estar refletindo a ovulação espontânea ou o comportamento de cio pode ter ocorrido e não ter sido observado ou até mesmo, como já sugerido para a leoa Salita, ter ocorrido a ovulação induzida pela ação do agonista do implante sobre folículos pré-ovulatórios já existentes naquele momento. Depois deste evento, os níveis de ambos os metabólitos

se mantiveram basais até o fim do experimento. Até o término deste trabalho, a leoa Zomba não apresentou sinais comportamentais de cio ou hormonais de retorno da função ovariana.

Analisando os gráficos das figuras 11, 12, 13, 14 e 15, percebe-se que antes da colocação dos implantes, todas as leas apresentavam atividade ovariana e comportamento de estro. Os aumentos verificados neste período para os níveis de metabólitos fecais de estradiol coincidiram com a ocorrência dos comportamentos de estro, havendo até mesmo cópulas. Os aumentos de metabólitos de progesterona ou progestinas foram evidenciados em todas as leas durante, ou logo após o estro comportamental observado, caracterizando a ovulação e início do diestro. Estes resultados coincidem com os descritos na literatura em leões, utilizando dosagens hormonais séricas (SCHMIDT et al., 1979; BROWN et al., 1993b; SCHRAMM; BRIGGS; REEVES, 1994) e fecais (GRAHAM et al., 1995; UMAPATHY et al., 2007).

Após a colocação dos implantes, Ilara e Pretória, apresentaram comportamento de estro nos dias imediatos ao procedimento, coincidindo com o relatado por Bertschinger et al. (2001, 2002). Os perfis hormonais deste período sugerem que houve atividade ovariana e possivelmente ovulação. Este fato era esperado, uma vez que a literatura relata que nos dias subseqüentes à colocação do implante, como há exacerbação da ação de GnRH, ocorre estimulação da liberação de gonadotrofinas hipofisárias, que por sua vez agiriam sobre os ovários, promovendo recrutamento e maturação de folículos, aumentando os níveis de estradiol, levando ao comportamento de estro, podendo haver cópula seguida de ovulação, confirmada pelos aumentos de progestinas (BERTSCHINGER et al., 2001, 2002; TRIGG et al., 2001; WRIGTH et al., 2001). No entanto, nossos resultados mostram que mesmo estas duas leas que apresentaram cio comportamental após o implante, não copularam. Este fato pode se dever ao fato de os níveis de estradiol serem insuficientes para desencadear a receptividade, mas eficientes no sentido de desencadear a proceptividade.

Passados estes primeiros dias após o implante, todas as leas apresentaram resultados comportamentais e hormonais compatíveis com a supressão do

comportamento de estro e da atividade cíclica ovariana, evidenciada esta última pelos perfis basais dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona.

Conforme já mencionado, a leoa Ilara foi a única a apresentar sinais de um possível retorno à atividade ovariana em aproximadamente 12 meses após a colocação do implante, porém sem demonstrar comportamento de estro.

Três outras leoas, somente começaram a demonstrar o comportamento de estro após 22 meses (Salita), 31 meses (Pretória) e 33 meses (Rouge). Pretória manteve níveis basais de metabólitos fecais de estradiol e de progesterona, mesmo durante o retorno do comportamento de estro (Figura12). Salita, manteve os níveis de metabólitos de progesterona basais e apresentou discretas elevações de metabólitos de estradiol, coincidentes com o retorno do comportamento de estro (Figura14), sugerindo que mesmo esta atividade ovariana aparente não foi ainda suficiente para alcançar o estágio ovulatório, mas o foi para desencadear o comportamento de estro, permitindo inclusive cópulas. Rouge, após 33 meses apresentou comportamento de cio, com cópulas, coincidindo com elevações nos níveis de metabólitos de estradiol, seguidas de marcados aumentos nos níveis de progestinas, que alcançaram valores de pico, sugerindo fortemente a ocorrência de ovulação (Figura 13). Este resultado é muito importante por poder caracterizar o único caso observado de retorno funcional da atividade ovariana.

Cópulas desvinculadas do comportamento de estro já foram observadas em leões de vida livre, podendo estar relacionadas a rituais de afirmação de dominância pelos machos sobre as fêmeas (comunicação pessoal)². No entanto, neste trabalho, em nenhum momento este fato foi observado, sendo que todas as cópulas ocorreram durante o comportamento de cio. No entanto, os resultados sugerem que possa haver uma desvinculação dos níveis de estradiol e do comportamento de cio, uma vez que este foi observado em fases de altos e baixos níveis de metabólitos de estradiol.

A leoa Zomba não apresentou até o presente momento (35 meses após o implante), qualquer comportamento de estro e manteve os perfis de ambos os metabólitos hormonais fecais em níveis basais (Figura 15).

² Informação fornecida por Henk Berschinger, Omaha, Estados Unidos, 2005.

Acreditamos que as variações encontradas nos valores absolutos dos metabólitos de ambos os hormônios, entre as diferentes leas devam ser atribuídas às características da variação individual, uma vez que sabemos ser o número amostral muito reduzido.

Embora a reversibilidade do tratamento não tenha sido demonstrada do ponto de vista endócrino, com a possível exceção de Rouge, o fato de três das quatro leas restantes já estarem apresentando o retorno do comportamento de estro e uma delas, Salita, possa estar demonstrando discretos sinais de retorno da atividade ovariana, nos faz crer que será apenas uma questão de tempo para que a total reversão, comportamental e funcional ovariana, se estabeleça em todas elas.

Estes resultados apontam para um possível uso destes implantes como contraceptivos reversíveis em leas, sendo, no entanto, necessário aguardar mais algum tempo para se ter certeza deste retorno. Da mesma forma, acreditamos que o uso como contraceptivo terá que ser comprovado com o desafio de alojar leas implantadas com machos adultos comprovadamente férteis e intactos.

Neste trabalho, não foi possível realizar este desafio dado ao caráter experimental da metodologia e o não interesse da instituição mantenedora em obter filhotes, caso o método falhasse.

5.1 Comentários gerais

Outro possível uso para os implantes, baseado nos resultados encontrados, seria a sua utilização para a redução de agressividade, evitando assim lutas e ferimentos constantes, tão comuns nos animais mantidos em cativeiro. O resultado encontrado em leas concorda com as informações publicadas que descrevem a eficiência da deslorelina na redução da agressividade em machos de diversas espécies de carnívoros domésticos e silvestres (BERTSCHINGER et al., 2001; TRIGG et al., 2001; BERTSCHINGER et al., 2002). No entanto, por se tratar de fêmeas, foi inesperada a redução de agressividade observada após a colocação dos implantes.

É importante destacar que todas as leas melhoraram o aspecto da pelagem, sendo de especial interesse, o fato de 4 delas, Zomba, Ilara, Rouge e Salita, que sistematicamente lambiam e chupavam a extremidade da cauda até provocar lesões, pararam com este comportamento após a aplicação dos implantes. Possivelmente, esta melhora do aspecto geral deveu-se ao fato dos animais economizarem energia, uma vez que durante um longo período não houve mais comportamento de estro, nem cópulas e nem lutas.

A duração do efeito do tratamento e a facilidade de aplicação, fazem deste método uma importante opção para o manejo contraceptivo de leas.

5.2 Considerações finais

A expectativa inicial do projeto era de se alcançar pelo menos 12 meses de supressão da atividade ovariana cíclica e do comportamento de estro, conforme descrito na literatura, porém sem nenhum acompanhamento hormonal (BERTSCHINGER et al., 2001). Os resultados superaram amplamente esta expectativa, sendo que a primeira leoa a demonstrar comportamento de estro foi Salita, após 22 meses da colocação do implante. A segunda a retomar este tipo de comportamento foi Pretória, 31 meses e Rouge, após 33 meses. Zomba, após 35 meses, ainda não havia apresentado sinais de estro.

Considerando a duração média de $28,67 \pm 5,86$ meses (sem contar Zomba), e tendo obtido no mínimo 22 meses sem sinais comportamentais de cio ou perfis endócrinos de atividade ovariana cíclica, este método pode ser considerado eficiente e prático. A reversibilidade comportamental demonstrada em três das quatro leas estudadas, a facilidade de aplicação e a ausência de efeitos colaterais indesejados, leva a crer que o método utilizado possa ser aplicado para o controle populacional de leões africanos, tornando-se uma importante ferramenta para a conservação da viabilidade genética populacional desta espécie. Não foi possível demonstrar a

restauração da atividade ovariana durante a duração do experimento, no entanto, os resultados obtidos sugerem que esta deva ser re-estabelecida em breve.



Fonte: GUIMARÃES, M. L. A. C. V. - Praga, Rep. Tcheca, 2008.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu demonstrar que o uso de implantes sub-cutâneos do análogo de GnRH, Deslorelina, foi eficiente na supressão da atividade ovariana cíclica e do comportamento de estro, em leoas.

Da mesma forma, a monitoração não-invasiva com o uso da extração e dosagem dos metabólitos fecais de esteróides sexuais, estradiol e progesterona, mostrou-se uma ferramenta eficiente e precisa para avaliação do “status” endócrino-reprodutivo de leoas.

O método utilizado mostrou-se seguro e de fácil aplicação.

Não foi possível demonstrar o retorno da atividade ovariana cíclica até o término do experimento, mas foi demonstrado o retorno do comportamento de cio em três das quatro leoas estudadas.

Este método também pode ser utilizado na redução da agressividade de leoas africanas.



GUIM

Fo

Fonte: GUIMARÃES, M. A. B. V. - Praga, Rep. Tcheca, 2008.

Referências

REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, H.; MARTIN, F. Oestrogen in human pregnancy faeces. **Acta Endocrinologica**, v. 83, p.410-419, 1976.

ALBUQUERQUE, A. C. S. R.; SOUZA, M. B. C.; SANTOS, H. M.; ZIEGLER, T. E. Behavioral and hormonal analysis of social relationships between oldest females in a wild monogamous group of common marmosets (*Callithrix jacchus*). **International Journal of Primatology**, v. 22, p. 631-645, 2001.

ASA, C. S. Types of contraception: the choices. In: ASA, C. S.; PORTON, I. J. (Ed.). **Wildlife contraception**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p. 29-52.

ASA, C. S.; PORTON, I. J. The need for wildlife contraception. In: ASA, C. S.; PORTON, I. J. (Ed.). **Wildlife contraception**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p.25-32.

ASA, C. S.; PORTON, I.; BAKER, A. M.; PLOTKA, E. D. Contraception as a management tool for controlling surplus animals. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S. (Ed.). **Wild mammals in captivity**. Chicago: University of Chicago Press, 1996. p.451-467.

ASA, C. S.; PORTON, I. J.; JUNGE, R. Reproductive cycles and contraception of Black Lemurs (*Eulemur macaco macaco*) with depot medroxyprogesterone acetate during the breeding season. **Zoo Biology**, v. 26, p. 289-298, 2007.

BALDWIN, C.J.; PETER, A.T.; BOSU, W.T.K.; DUBIELZIG, R.R. The contraceptive effects of levonorgestrel in the domestic cat. **Laboratory Animal Science**, v.44, p.261-269, 1994.

BAMBERG, E.; CHOI, H. S.; MÖSTL, E.; WURM, W.; LORIN, D.; ARBEITER, K. Enzymatic determination of unconjugated oestrogens in faeces for pregnancy diagnosis in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, p. 537-539, 1984.

BEACH, F. A. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in female mammals. **Hormones and Behavior**, v. 7, p. 105-138, 1976.

BELLENGER, C. R.; CHEN, J. C. Effect of megestrol acetate on the endometrium of the prepubertally ovariectomised kitten. **Research Veterinary Science**, v. 48, p. 112-118, 1990.

BERTRAM, B. Kin selection in lions. In: SEIDENSTICKER, J.; LUMPKIN, S. (Ed.). **Great cats, majestic creatures of the wild**. Emmaus: Rodale Press Inc, 1991.p. 90 -91.

BERTRAM, B. C. R. Social factors influencing reproduction in wild lions. **Journal of Zoology**, v. 177, p. 463-482, 1975.

BERTSCHINGER, H. J.; ASA, C. S.; CALLE, P. P.; LONG, J. A.; BAUMAN, K.; DEMATTEO, K.; JÖCHLE, W.; TRIGG, T. E.; HUMAN, A. Control of reproduction and sex related behaviour in exotic wild carnivores with the GnRH analogue deslorelin: preliminary observations. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 275-283, 2001.

BERTSCHINGER, H. J.; TRIGG, T. E.; JÖCHLE, W.; HUMAN, A. Induction of contraception in some African wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. **Reproduction Supplement**, v. 60, p. 41-52, 2002.

BÖER, M.; COHNEN, K.; MEINICKE, B. Eine Übersicht über bisher in Zoologischen Gärten angewandte Methoden der Kontrazeption. **Der Zoologische Garten**, v. 66, p. 93-105, 1996.

BRIGGS, M. B.; FITHIAN, C. L.; STARKEY, P. R.; RICHARDS, R. E. Endocrine profiles in estrus, pregnant and pseudopregnant African lions (*Panthera leo*) throughout the year. In: THE ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1990, Denver. **Proceedings...** 1990. p. 317-319.

BRODNEY, R. S.; FIDLER, I. J. Clinical and pathological findings in bitches treated with progestational compounds. **Journal of American Veterinary Association**, v.186, p.783-788, 1966.

BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, v. 66, p. 25-36, 2006.

BROWN, J. L.; BUSH, M.; PACKER, C.; PUSEY, A. E.; MONFORT, S. L.; O'BRIEN, S. J.; JANSSEN, D. L.; WILDT, D. E. Hormonal characteristics of free-ranging female lions (*Panthera leo*) of the serengeti plains and ngorongoro crater. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p.107-114, 1993a.

BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; HOWARD, J.; WELLS, S.; LANG, K.; COLLINS, L.; RAPHAEL, B.; SCHWARTZ, R.; EVANS, M.; HOYT, T.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Development and utility of fecal progesterone analysis to assess reproductive status in felids. In: THE ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1993, Chicago. **Proceedings...** 1993b. p. 273 – 276.

BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Measurement of fecal estrogen and progesterone metabolites for assessing ovarian activity in felids. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 776 – 786, 1994.

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

BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; WIELEBNOWSKY, N.; GOODROWE, K. L.; GRAHAM, L. H.; 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.

BYGOTT, J. D.; BERTRAM, B. C. R.; HANBY, J. P. Male lions in large coalitions gain reproductive advantages. **Nature**, v. 282, p. 839-841, 1979.

BURKE, T. J.; REYNOLDS, H. A.; SOKOLOWSKI, J. H. A 180-day tolerance – efficacy study with mibolerone for suppression of estrus in the cat. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 469-477, 1977.

CAG-AZA . Contraception Advisory Group of the American Zoological and Aquária Association. . **Wildlife Contraception Center**. [2003]. Disponível em: <<http://www.stlzoo.org/contraception>>. Acesso em: 10 nov. 2003.

CHEN, J. C.; BELLENGER, C. R. Obese appearance, mammary development and retardation of hair growth following megestrol acetate administration to cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 28, p. 1161-1167, 1987.

CHUEI, J. Y.; ASA, C. S.; HALL-WOODS, M.; BALLOU, J.; TRAYLOR-HOLZER, K. Restoration of reproductive potential after expiration or removal of melengestrol acetate contraceptive implants in Tigers (*Panthera tigris*). **Zoo Biology**, v. 26, p. 275-288, 2007.

CRANDALL, L. **The Management of wild mammals in captivity**. Chicago: University of Chicago Press, 1964.

CREEL, S.; CREEL, N. M.; MILLS, M. G. L.; MONFORT, S. L. Rank and reproduction in co-operatively breeding African wild dogs: behavioral and endocrine correlates. **Behavioral Ecology**, v. 8, p. 298-306, 1997.

DEMATTEO, K. E. Contraception in carnivores. In: ASA, C. S.; PORTON, I. J. (Ed.). **Wildlife contraception: issues, methods and applications**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p.105-118.

EATON, R. L. Reproductive age in lions (*Panthera leo*): A record. **Mammalia**, v. 36, p. 165-166, 1972.

EATON, R. L. The biology and social behavior of reproduction in the lion. In: EATON, R. L. (Ed.). **The world's cat**. Seattle: [s.n], 1974.

EATON, R. L.; YORK, W. Reproductive biology , and preliminary observations on mating preferences, in a captive lion (*Panthera leo*). **International Zoo Yearbook**, v. 11, p. 198-202, 1971.

GARDNER, H. M.; HUESTON, W. D.; DONOVAN, E. F. Use of mibolerone in wolves and three *Panthera* species. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 187, n. 11, p. 1193-1194, 1985.

GRAHAM, L. H.; GOODROWE, K. L.; RAESIDE, J. I.; LIPTRAP, R. M. Non-invasive monitoring of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17 β and progestins. **Zoo Biology**, v. 14, p. 223-237, 1995.

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, n. 1, p. 71-82, 1996.

GRANDY, J. W.; RUTBERG, T. An animals welfare view of wildlife contraception. **Reproduction Supplement**, v. 60, p. 1-7, 2002.

GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; CORREA, S. H. R.; VIAU, P.; ZÜGE, R. M.; FELIPPE, E. C. G. Feminizing syndrome in African Lion: behavioral, phenotypic and hormonal aspects. In: THE ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 2002a, Milwaukee. **Proceedings...** 2002. p. 313-315.

GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; RIBEIRO, E. A. A.; ROSA E SILVA, A. A. M.; FRANCI, C. R.; BATISTA, S. A. Z.; BARNABE, R. C. Monitoring ovarian function in the Capuchin monkey (*Cebus apella*) using fecal and urinary hormones analyses. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY FOR THE CONSERVATION AND GENETIC MANAGEMENT OF WILDLIFE, 2., 2002b, Milwaukee. **Proceedings...** 2002. p. 290-291,

HALL-WOODS, M. L.; BAUMAN, K. L.; BAUMAN, J. E.; FISCHER, M.; HIUSTON, E. W.; ASA, C. S. Melengestrol acetate implant contraception in Addax (*Addax nasomaculatus*) and Arabian Oryx (*Oryx leucoryx*). **Zoo Biology**, v. 26, p. 299-310, 2007.

HANBY, J. P.; BYGOTT, J. D. Lions. In: SEIDENSTICKER, J.; LUMPKIN, S. (Ed.). Great cats, majestic creatures of the wild. Emmaus: Rodale Press Inc, 1991. p. 80-89.

HARRESTIEN, L. A.; MUNSON, L.; SEAL, U. S. The American Zoo and Aquarium Association Mammary Cancer Study Group. Mammary cancer in captive wild felids and risk factors for its development: a retrospective study of the clinical behavior of 31 cases. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 27, p. 468-476, 1996.

HARRESTIEN, L. A.; MUNSON, L.; CHASSY, L. M.; LIU, I. K. M.; KIRKPATRICK, J. F. Effects of porcine zona pellucida immunocontraceptives in zoo felids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 3, p. 271-279, 2004.

HENIK, R. A.; OLSON, P. N.; ROSYCHUK, R. A. Progestogen therapy in cats. **Compendium of Continued Education**, v. 7, p. 132-141, 1985.

HERNANDEZ, F. J.; CHERTACK, M.; GAGE, P. A. Feline mammary carcinoma and progestogens. **Feline Practice**, v. 5, p. 45-48, 1975.

HODGES, J. K.; CZEKALA, N. M.; LASLEY, B. L. Estrogen and luteinizing hormone secretion in diverse primate species from simplified urinary analysis. **Journal of Medical Primatology**, v. 8, p. 349-364, 1979.

HUTCHINS, M. Foreword. In: ASA, C. S.; PORTON, I. J. (Ed.). *Wildlife contraception*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005.

KAZENSKY, C. A.; MUNSON, L.; SEAL, U. S. The effects of melengestrol acetate on the ovaries of captive wild felids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 1998.

KAYS, R. W.; PATTERSON, B. D. Mane variation in African lions and its social correlates. **Canadian Journal of Zoology**, v. 80, p. 471-478, 2002.

KIRKPATRICK, J. F. CALLE, P. P.; KALK, P.; LIU, I. K. M.; TURNER, J. W. Immunocontraception of captive exotic species.II. Formosian sika deer (*Cervus nippon taiouwanus*), Axis deer (*Cervus axis*), Himalayan tahr (*Hemitragus jemlahicus*), Roosevelt elk (*Cervus elaphus roosevelti*), Reeve's muntjac (*Muntiacus reevesi*) and sambar deer (*Cervus unicolor*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 27, p. 482-495, 1996b.

KIRKPATRICK, J. F.; KINCY, V.; BANCROFT, K.; SHIDELER, S. E.; LASLEY, B. L. Oestrus cycle of the North American bison (*Bison bison*) characterised by urinary pregnanediol-3-glucuronide. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, p. 541-547, 1991.

KIRKPATRICK, J. F.; TURNER, J. W.; LIU, I. K. M.; FAYRER-HOSKEN, R. Applications of pig zona pellucida immunocontraception to wildlife fertility. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**, v. 50, p. 183-189, 1996a.

KIRKPATRICK, J. F.; TURNER JR., J. W.; LIU, I. K. M.; FAYRER-HOSKEN, R.; RUTBERG, A. T. Case studies in wildlife immunocontraception: wild and feral equids and white-tailed deer. **Reproduction Fertility Development**, v. 9, p. 105-110, 1997.

KOLLIAS JR., G. V. Complications of progesterone contraception in exotic felids. In: COHN, P. N.; PLOTKA, E. D.; SEAL, U. S. (Ed.). **Contraception in wildlife**. Lewinston: Edwin Mellen Press, 1996. p. 171-184.

KOLLIAS, G. V.; CALDERWOOD-MAYS, M. B.; SHORT, B. G. Diabetes mellitus and abdominal adenocarcinoma in a jaguar receiving megestrol acetate. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.185, p. 1383-1386, 1984.

LINDBURG, D.; LINDBURG, L. Success breeds a quandary: to cull or not to cull. In: NORTON, B. G.; HUTCHINS, M.; STEVENS, E. F.; MAPLE, T. L. (Ed.). **Ethics on the Ark**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1995. p. 195-208.

LINNEHAN, R. M.; EDWARDS, J. L. Endometrial adenocarcinoma in a Bengal tiger (*Panthera tigris bengalensis*) implanted with melengestrol acetate. **Journal of Zoo and Wildanimals Medicine**, v. 22, p. 130-134, 1991.

LONG, R. D. Pyometritis in spayed cats. **Veterinary Records**, v. 91, p. 105-106, 1972.

LUMIA, A. R.; THORNER, K. M.; MCGINNIS, M. Y. Effects of chronically high doses of the anabolic androgenic steroid, testosterone, on intermale aggression and sexual behavior in male rats. **Physiology and Behavior**, v. 55, n. 2, p. 331-335, 1994.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MOUTON, D.J.(ed.) **Tumors in Domestic Animals**, Ames: Iowa State Press, p. 575-606, 2002.

MONFORT, S. L.; ARTHUR, N. P.; WILDT, D. E. Monitoring ovarian function and pregnancy by evaluating excretion of urinary oestrogen conjugates in semi-free-ranging Przewalski's horses (*Equus przewalskii*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 155-164, 1991.

MONFORT, S. L.; WASSER, S. K.; MASHBURN, K. L.; BURKE, M.; BREWER, B. A.; CREEL, S. R. Steroid metabolism and validation of non invasive endocrine monitoring in the African wild dog (*Lycaon pictus*). **Zoo Biology**, v. 16, p. 533-548, 1997.

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

MÖSTL, E.; CHOI, H. S.; WURM, W.; ISMAIL, N.; BAMBERG, E. Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17 α in faeces. **British Veterinary Journal**, v. 140, p. 287-291, 1984.

MUNSON, L. Contraception in felids. **Theriogenology**, v. 66, p. 126-134, 2006.

MUNSON, L. Reproductive diseases resulting from contraceptive treatments. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY FOR THE CONSERVATION AND GENETIC MANAGEMENT OF WILDLIFE, 2., 2002, Milwaukee. **Proceedings...** p. 2002. 143-150.

MUNSON, L.; BAUMAN, J. E.; ASA, C. S.; JÖCHLE, W.; TRIGG, T. E. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 269-273, 2001.

MUNSON, L.; MORESCO, A.; CALLE, P. P. Adverse effects of contraceptives. In: ASA, C. S.; PORTON, I. J. (Ed.). **Wildlife contraception**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p.66-82.

MUNSON, L.; STOKES, J. E.; HARRENSTIEN, L. M. Uterine cancer in zoo felids on progestin contraceptives. **Veterinary Pathology**, v. 32, p. 578, 1995.

NELSON, R. J. Female reproductive behavior. In: NELSON, R. J. (Ed.). **An introduction to behavioral endocrinology**. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2000b. p.273-335.

NELSON, R. J. Male reproductive behavior. In: NELSON, R. J. (Ed.). **An introduction to behavioral endocrinology**. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2000a. p.199-271.

PACKER, C.; HERBST, L.; PUSEY, A. E.; BYGOTT, J. D.; HANBY, J. P.; CAIRNS, S. J.; MULDER, M. B. Reproductive success of lions. In: CLUTTON-BROCK, T. H. (Ed.). **Reproductive success**. Chicago: University of Chicago Press, 1988. p.363-383.

PACKER, C.; PUSEY, A. E. Cooperation and competition within coalitions of male lions: kin selection or game theory? **Nature**, v. 296, p. 740-742, 1982.

PACKER, C.; PUSEY, A. E.; EBERLY, L. E. Egalitarianism in female African Lions. **Science**, v. 293, p. 690-693, 2001.

PACKER, C.; TATAR, M.; COLLINS, A. Reproductive cessation in female mammals. **Nature**, v. 392, p. 807-811, 1998.

PATERSON, M.; AITKEN, R. Development of vaccines targeting the zona pellucida. **Current Opinion Immunology**, v. 2, p. 723-747, 1990.

PATTON, M. L.; JÖCHLE, W.; PENFOLD, L. M. Review of contraception in ungulate species. **Zoo Biology**, v. 26, p. 311-326, 2007.

PELICAN, K. M.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; OTTINGER, M. A.; HOWARD, J. G. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. **General and Comparative Endocrinology**, v. 144, p. 110-121, 2005.

PENFOLD, L. M.; MUNSON, L.; PLOTKA, E.; CITINO, S. B. Effect of progestins on serum hormones, semen production, and agonistic behavior in the Gerenuk (*Litocranius walleri walleri*). **Zoo Biology**, v. 26, p. 245-257, 2007.

POOLE, J. H.; KASMAN, L. H.; RAMSAY, E. C.; LASLEY, B. L. Musth and urinary testosterone in the African elephant (*Loxodonta africana*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 255-290, 1984.

PUSEY, A. E.; PACKER, C. The evolution of sex-biased dispersal in lions. *Behaviour*, v. 101, p. 275-310, 1987.

RISLER, L.; WASSER, S. K.; SACKETT, G. P. Measurement of excreted steroids in *Macaca nemestrina*. *American Journal of Primatology*, v. 12, p. 91-100, 1987.

RODGER, J. C. Fertility control for wildlife. In: HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; RODGER, J. C.; WILDT, D. E. (Ed.). **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p. 281-290.

RYAN, K. K.; LACY, R. C.; MARGULIS, S. W. Impacts of inbreeding on components of reproductive success. In: HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; RODGER, J. C.; WILDT, D. E. (Ed.). **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p. 82-96.

SADLEIR, R. M. F. S. Investigations into the reproduction of larger Felidae in captivity. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 12, p. 411-412, 1966b.

SADLEIR, R. M. F. S. Notes on reproduction in the larger Felidae. **International Zoo Yearbook**, v. 6, p. 184 – 187, 1966a.

SCHALLER, G. B. *The serengeti lion: a study of predator-prey relations*. Chicago: University of Chicago Press, 1972. 480 p.

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

SCHOEMAKER, N. J.; Van DEIJK, R.; MUIJLAERT, B.; KIK, M. J. L.; KUIJTEN, A. M.; DE JONG, F. H.; TRIGG, T. E.; KRUITWAGEN, C. L. J. J.; MOL, J. A. Use of gonadotropin releasing hormone agonist implant as an alternative for surgical castration in male ferrets (*Mustela putorius furo*). **Theriogenology**, v. 70, p. 161-167, 2008.

SCHRAMM, R. D.; BRIGGS, M. B.; REEVES, J. J. Spontaneous and induced ovulation in the Lion (*Panthera leo*). **Zoo Biology**, v. 13, p. 301-307, 1994.

SEAGER, S. W. J.; DEMOREST, C. N. Reproduction in carnivores. In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Zoo and wild animals medicine**. Philadelphia: W.B.Saunders, 1978. p.667-706.

SEAL, U. S. Endocrine changes associated with reproduction in the lion. In: 4th INTERNATIONAL CONGRESS OF WORLD'S CATS AND SOCIOBIOLOGY OF CARNIVORES, 4., 1979, Seattle. **Proceedings...** 1979.

SEAL, U. S.; BARTON, R.; MATHER, L.; GRAY, C. W.; PLOTKA, E. D. Long-term control of reproduction in female lions (*Panthera leo*) with implanted contraceptives. In: THE ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1975, San Diego. **Proceedings...** 1975. p.66-80.

SEAL, U. S.; BARTON, R.; MATHER, L.; OLBERDING, K.; PLOTKA, E. D.; GRAY, C. W. Hormonal contraception in captive female lions (*Panthera leo*). **Journal of Zoo Animal Medicine**, v.7, p.12-20, 1976.

SEIFERT, S. **Untersuchungen zur fortpflanzungsbiologie der im zoologischen garten leipzig gehaltene grosskatzen (Panthera, Oken, 1816) unter besonderer berücksichtigung des Löwen Panthera leo (Linné, 1758)**. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1978.

SENGER, P. L. Reproductive behavior. In: SENGER, P. L. (Ed.). Pathways to pregnancy and parturition. Pullman: Current Conceptions Inc., 2003. p.240-265.

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

SILBER, S.; JUNGE, R. A new reversible male contraceptive: Open-ended vasectomy and microscopic reversal. In: THE ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, PROCEEDINGS, 2005, Omaha. **Proceedings...** 2005. p. 236-237.

SILVA, G. C. O.; BERBARE, P. E. B.; ZACARIOTTI, R. L.; CORRÊA, S. H. R.; OLIVEIRA, C. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Estudo da correlação das características citológicas vaginais e os níveis séricos de estradiol e progesterona em leão africano (*Panthera leo*) mantidos em cativeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 227-232, 2006.

SMUTS, G. L.; HANKS, J.; WHITE, I.J. Reproduction and social organization of lions from the Kruger National Park. *Carnivore*, v.1, n.1, p. 17-28, 1978.

STRIER, K. A.; ZIEGLER, T. E.; WITTEW, D. J. Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male muriqui (*Brachyteles arachnoides*). **Hormone and Behavior**, v. 35, p. 125-134, 1999.

SUEDMEYER, K.; STEWART, D.; NIBBELINK, L.; DODAM, J.; SHAFFORD, H. Laparoscopic tubal cauterization in two African Lions (*Panthera leo*). In: THE ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 2003, Minneapolis. **Proceedings...** 2003. p. 303-305.

SUNQUIST, F. C. The living cats. In: SEIDENSTICKER, J.; LUMPKIN, S. (Ed.). Great cats, majestic creatures of the wild. Emmaus: Rodale Press Inc, 1991. p. 28-53.

TRIGG, T. E.; WRIGHT, P. J.; ARMOUR, A. F.; WILLIANSO, P. E.; JUNAIDI, A.; MARTIN, G. B.; DOYLE, A. G.; WALSH, J. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function of male and female domestic dogs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 263-268, 2001.

UMAPATHY, G.; SONTAKKE, S. D.; SRINIVASU, K.; KIRAN, T.; KHOLKUTE, S. D.; SHIVAJI, S. Estrus behavior and fecal steroid profiles in the Asiatic lion (*Panthera leo persica*) during natural and gonadotropin-induced estrus. **Animal reproduction Science**, v. 101, p. 313-325, 2007.

WASSER, S. K.; BEVIS, K.; KING, G.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the Northern spotted owl. **Conservation Biology**, v. 11, p. 1019-1022, 1997.

WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; SOUTHERS, J.; WILDT, D. E. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 213-220, 1994.

WASSER, S. K.; PAPAGEORGE, S.; FOLEY, C.; BROWN, J. L. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and pattern of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 102, p. 255-262, 1996.

WEST, P. M.; PACKER, C. Sexual selection, temperature and the Lion's mane. **Science**, v. 297, p. 1339-1343, 2002.

WHEATON, C. J.; JOSEPH, S.; REID, K.; WEBSTER, T.; RICHARDS, M.; FORDE, H. M.; SAVAGE, A. Suppression of ovulation in Nile Hippopotamus (*Hippopotamus amphibius*) using melengestrol acetate – treated feed or high dose depo-provera injection. **Zoo Biology**, v. 26, p. 259-274, 2007.

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

WILDT, D. E. Consequences of inbreeding in lions. In: SEIDENSTICKER, J.; LUMPKIN, S. (Ed.). **Great cats, majestic creatures of the wild**. Emmaus: Rodale Press Inc., 1991. p. 86.

WRIGHT, P. J.; VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; JÖCHLE, W.; ARMOUR, A. F.; MARTIN, G. B.; TRIGG, T. E. Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 263-268, 2001.