

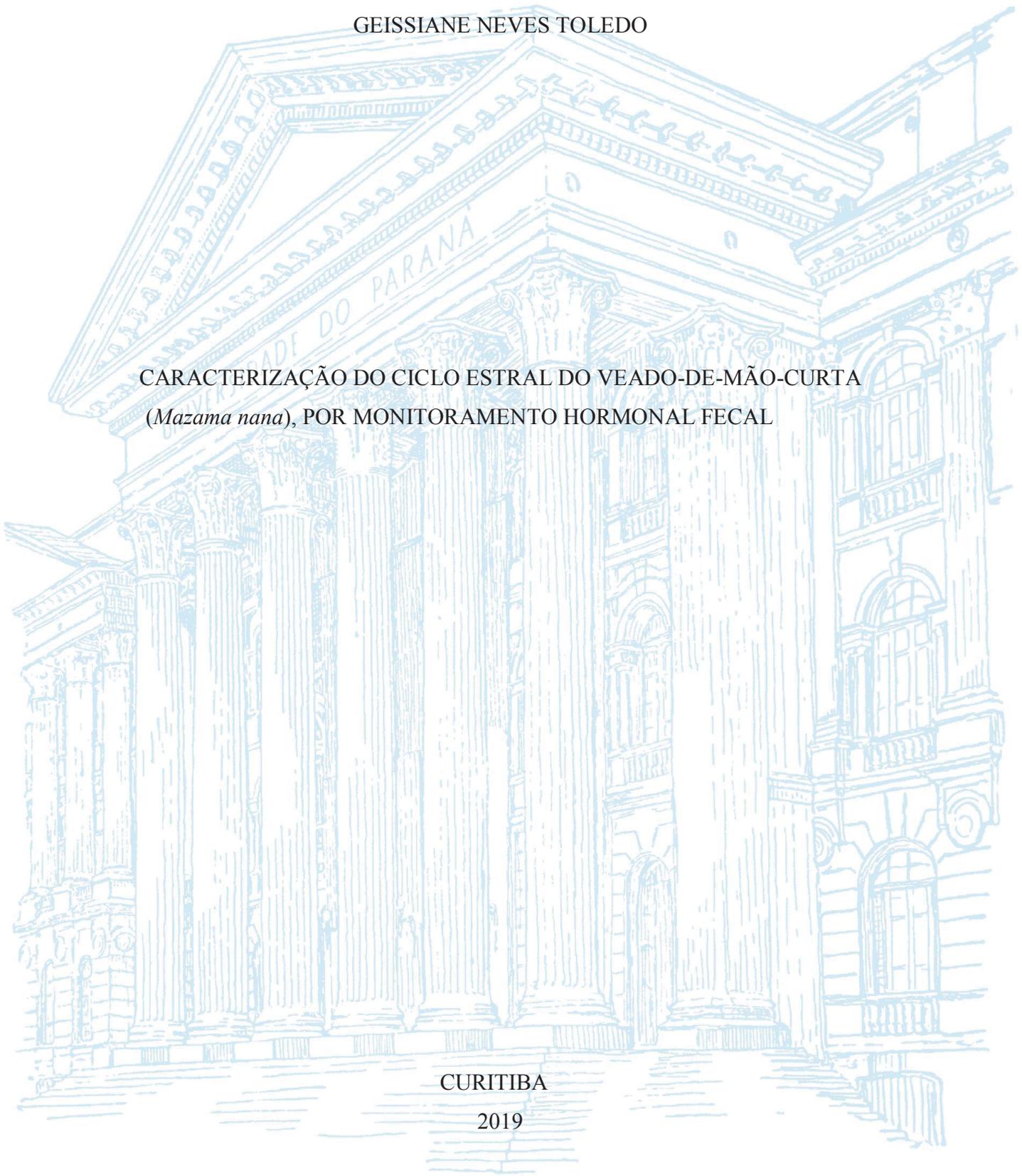
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GEISSIANE NEVES TOLEDO

CARACTERIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL DO VEADO-DE-MÃO-CURTA
(*Mazama nana*), POR MONITORAMENTO HORMONAL FECAL

CURITIBA

2019



GEISSIANE NEVES TOLEDO

CARACTERIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL DO VEADO-DE-MÃO-CURTA
(*Mazama nana*), POR MONITORAMENTO HORMONAL FECAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Toledo, Geissiane Neves

Caracterização do ciclo estral do veado-de-mão-curta (*Mazama nana*) por monitoramento hormonal fecal. / Geissiane Neves Toledo. – Curitiba, 2019.

40 p.: il.

Orientador: Nei Moreira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Veado 2. Fisiologia reprodutiva 3. Cervídeo I. Título II. Moreira, Nei III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (22. ed.) 599.65



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA -
40001016008P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GEISSIANE NEVES TOLEDO** intitulada: **Caracterização do ciclo estral do veado-de-mão-curta (*Mazama nana*), por monitoramento hormonal fecal**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Maio de 2019.

NEI MOREIRA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

EMYGDIO LEITE DE ARAUJO MONTEIRO FILHO

Avaliador Interno (UFPR)

RODRIGO ANTONIO MARTINS DE SOUZA

Avaliador Externo (UNICENTRO)

AGRADECIMENTOS

Não posso deixar de demonstrar o meu reconhecimento, carinho e gratidão a todos que estiveram presentes de forma direta e indireta durante esse período, aos que contribuíram e me ajudaram a concluir este trabalho, pois sem eles seria impossível realizar.

...A Deus, por ter-me concedido determinação, força e discernimento para concluir esta pesquisa...

...A minha família, minha mãe Rita, meu pai Jair, e aos meus irmãos Berg e Tefinha, por estarem presentes em todos os momentos, pelo apoio, amor, carinho, companheirismo e educação recebida...

...Ao meu orientador, Nei Moreira, pela oportunidade...

...Ao meu namorado Darllan Junior, por todo apoio e compreensão, por todas as vezes que me incentivou a seguir em frente...

...À Professora Katherine Maria Spercoski, que se compadeceu do meu desespero e me ajudou em diversos momentos...

...As minhas amigas do grupo “Girl power” Bruna, Laís, Joy e Fran por todos os conselhos, as risadas, os momentos compartilhados, por escutarem todas as minhas lamentações, em especial à Bruna por ter me acolhido como irmã e cuidado de mim como se fosse da família...

...À equipe do Zoológico de Cascavel Dettoni, Vanilce, Hamilton, Seu Jonas e todos que, de alguma forma, contribuíram e não mediram esforços para que o projeto fosse executado, obrigada por acreditarem no projeto...

...Aos estagiários do Zoológico, Marina, Jeferson, Willian, Gabriele, por me ajudarem com o manejo dos animais e com as coletas, obrigada pela companhia e por tornarem o período de coletas menos estressante e cansativo...

...Ao Professor José Maurício Barbanti Duarte, do NUPECCE, por ter aceito a parceria e colocado seu laboratório de endocrinologia à disposição para a realização das dosagens hormonais, e ao David que coletou as amostras da Pitanga e além de ter me ensinado todo o processo de montagem das placas, me ajudou com a interpretação dos resultados, meu muito obrigada...

...Aos colegas de Programa por todos os momentos de descontração vividos na sala dos alunos....

...Aos professores Rogério, Emygdio e Rodrigo por se colocarem à disposição para compor a banca...

...A toda a equipe do Programa de Pós-graduação em Zoologia, os professores, secretários, aos amigos e colegas que conheci durante esses anos que estavam sempre dispostos a ouvir e me ajudar no que fosse preciso...

...À CAPES, pela concessão da bolsa...

...Aos animais mais dóceis que eu poderia ter Vermelha, Azul, Preta, Amarelo e Pitanga...

...A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O gênero *Mazama* é representado por pequenos cervídeos, a espécie *Mazama nana* (Hensel 1872) é a menor representante do gênero, a espécie habita exclusivamente o continente americano, popularmente é conhecida pelos nomes de veado-anão, veado-bororó-do-sul, veado-de-mão-curta. Esta espécie pode ser encontrada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, do norte do Estado do Paraná ao centro do Rio Grande do Sul, até o sudeste de São Paulo. Está registrada como vulnerável segundo a Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN). A biologia reprodutiva do gênero de maneira geral é pouco conhecida, sendo que dados sobre as características reprodutivas de *Mazama nana* são praticamente inexistentes. Isto implica na urgência de realização de trabalhos voltados para o conhecimento destes animais que, mesmo com a carência de informações, sabe-se que é uma das espécies mais ameaçadas entre os cervídeos brasileiros. Considerando o alto declínio das populações existentes em vida livre, pela dificuldade de controle dos fatores que influenciam na redução da população, os trabalhos que possam auxiliar projetos de conservação, realizados com animais em cativeiro, são de suma importância para o entendimento da fisiologia reprodutiva. A análise hormonal de progestágenos fecais (PF) é uma técnica completamente não invasiva que já foi validada com sucesso para monitorar flutuações hormonais em inúmeras espécies. Observou-se que a espécie apresenta ciclo estral com duração média (\pm DP) de $23,8 \pm 1,8$ dias, um estro comportamental com duração média de $1,5 \pm 0,7$ dias e um período gestacional de 7 meses. Este trabalho validou a técnica para o monitoramento de progestágenos fecais em *Mazama nana* com sucesso.

Palavras chave: *Mazama nana*; Fisiologia reprodutiva, Enzimoimunoensaio.

ABSTRACT

The genus *Mazama* is composed by small cervids. *Mazama nana* (Hensel 1872) is the smallest representative of the genus, and this species inhabits exclusively the American continent, popularly known by the names of dwarf deer, Southern bororo deer, short-hand-deer. This species can be found in the South and Southeast regions of Brazil, from the north of the State of Paraná to the center of Rio Grande do Sul, to the southeast of São Paulo. It is registered as vulnerable according to the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) Red List of Threatened Species. Reproductive biology of the genus in general is little known, and data on the reproductive characteristics of *Mazama nana* are practically nonexistent. This implies the urgency to carry out studies with the aim to know this one of the most endangered species among Brazilian cervids. Considering the high decline of existing free living populations, due to the difficulty of controlling the factors that influence the reduction, the work carried out with animals in captivity are of paramount importance to understand reproductive physiology, which can help conservation projects. Hormonal analysis of fecal progestogens is a completely noninvasive technique that has been successfully validated to monitor hormonal fluctuations in numerous animal species. It was observed that the species has estral cycles with a mean (\pm SD) duration of 23.8 ± 1.8 days, a behavioral estrus of $1.5 \pm 0,7$ days and a gestational period of 7 months. This work validated the technique for the fecal progestogens monitoring in *Mazama nana* with success.

Keywords: *Mazama nana*; Reproductive physiology, Enzyme immunoassay.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - A. Fêmea de veado-de-mão-curta (<i>Mazama nana</i>) – Zoológico Municipal de Cascavel - PR; B. Macho de veado-de-mão-curta Zoológico Municipal de Cascavel - PR. Imagens: Geissiane N. Toledo, 2018. | 26 |
| FIGURA 2 - A. Instrumento de coleta, composto por um bastão de metal com coletor urinário acoplado à ponta. B. Amostra de urina coletada | 28 |
| FIGURA 3 - Concentração hormonal em relação ao percentual de ligação enzimática (% L) para as curvas padrão de validação para progestágenos fecais de <i>Mazama nana</i> , mostrando paralelismo entre elas. O percentual de ligação do hormônio conjugado (% L) refere-se ao percentual de hormônio conjugado (progesterona-HRP) ligado aos anticorpos e é inversamente proporcional à concentração do hormônio a ser quantificado | 31 |
| FIGURA 4 – Perfis individuais de metabólitos de progestágenos fecais (MPF), em ng/g de fezes secas, de quatro fêmeas de <i>Mazama nana</i> . Os dados mostram dois ciclos reprodutivos consecutivos para cada fêmea. As setas indicam a observação média do estro comportamental das quatro fêmeas..... | 33 |
| FIGURA 5 – Perfis individuais de metabólitos progestágenos fecais (MPF) em ng/g de fezes secas, de quatro fêmeas de <i>Mazama nana</i> . Os dados mostram dois ciclos reprodutivos consecutivos para cada fêmea. As setas em vermelho indicam a observação do estro comportamental para cada fêmea..... | 34 |
| FIGURA 6 – Concentrações médias (\pm EPM) de progestágenos fecais em ng/g de fezes secas, durante oito ciclos reprodutivos de <i>Mazama nana</i> , sendo dois ciclos por fêmea monitorada. Os dados foram alinhados considerando o dia da observação do estro comportamental (dia 1) | 35 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - Dados referente a local de nascimento, histórico de prenhez e idade das fêmeas de <i>Mazama nana</i> (n=4) monitoradas..... | 27 |
| TABELA 2 - Duração do ciclo estral, fase luteal, fase inter-luteal, estro comportamental e concentrações médias de metabólitos de progestágenos fecais | 32 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| D | - Dias |
| DD | - Dados insuficientes |
| DP | - Desvio padrão |
| EIA | - Enzimoimunoensaio |
| EPM | - Erro padrão da média |
| FAG | - Fundação Assis Gurgacz |
| IUCN | - União Internacional para Conservação da Natureza |
| LC | - Pouco preocupante |
| MPF | - Metabólitos de progestágenos fecais |
| NUPECCE | - Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos |
| RIA | - Radioimunoensaio |
| UFPR | - Universidade Federal do Paraná |
| UNESP | - Universidade Estadual Paulista |
| VU | - Vulnerável |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A BIOLOGIA REPRODUTIVA DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Mazama</i> ENCONTRADAS NO BRASIL | 13 |
| Introdução | 14 |
| Conservação em cativeiro | 15 |
| Fisiologia reprodutiva | 16 |
| Biologia reprodutiva do gênero <i>Mazama</i> | 19 |
| Conclusão | 20 |
| Referências | 20 |
| CARACTERIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL DO VEADO-DE-MÃO-CURTA (<i>Mazama nana</i>), POR MONITORAMENTO HORMONAL NÃO INVASIVO | 24 |
| Resumo: | 24 |
| Abstract: | 24 |
| INTRODUÇÃO | 25 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 1. Coleta de urina | 28 |
| 2. Coleta de fezes | 28 |
| 3. Análise de dados | 31 |
| RESULTADOS | 32 |
| DISCUSSÃO | 35 |
| CONCLUSÕES | 37 |
| REFERÊNCIAS | 37 |

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A BIOLOGIA REPRODUTIVA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Mazama* ENCONTRADAS NO BRASIL

*General considerations on the reproductive biology of the species of the genus
Mazama found in Brazil*

Geissiane Neves Toledo¹, Nei Moreira

Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Zoologia,
PR, Brasil

¹Correspondência para geissyneves@gmail.com

Resumo: A família Cervidae é constituída por 18 gêneros, que estão amplamente distribuídos, com exceção dos extremos polares. O gênero *Mazama* é representado pelos pequenos cervídeos e apresenta a maior riqueza entre os cervídeos neotropicais. É representado por 10 espécies, sendo que 5 dessas ocorrem no Brasil: *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro); *M. nemorivaga* (veado-amazônico); *M. nana* (veado-de-mão-curta); *M. bororo* (veado-bororó-do-sudeste) e *M. americana* (veado-mateiro). Essas espécies apresentam alto índice de risco de extinção, trazendo a preocupação sobre meios de realizar a sua conservação. De maneira geral, a biologia reprodutiva do gênero ainda não foi totalmente descrita, no entanto algumas informações sobre período reprodutivo, ciclo estral e sazonalidade já foram apresentadas para alguns representantes do gênero. O monitoramento dos parâmetros reprodutivos em animais selvagens, especialmente de cervídeos, é uma tarefa complexa. Porém considerando que o conhecimento sobre as estratégias reprodutivas de uma espécie é fundamental para a conservação, projetos que visam a entender essas estratégias reprodutivas são de suma importância para a conservação de espécies ameaçadas.

Palavras-chave: Cervídeos; Biologia reprodutiva; Conservação.

Abstract: The Cervidae family consists of 18 genera, which are widely distributed, with the exception of the polar extremes. The genus *Mazama* is represented by small cervids, with the greatest richness among Neotropical deers. It is comprised by 10 species, 5 of which occur in Brazil: *Mazama gouazoubira* (Gray brocket deer); *M. nemorivaga* (Amazonian brown deer); *M. nana* (Dwarf brocket deer); *M. bororo* (small red deer) and *M. americana* (red brocket deer). These species are in a high extinction risk, raising concern about how to do their conservation. In general, the reproductive biology of the genus has not yet been fully described, however some information about reproductive period, estrous cycle and seasonality have already been published to some species of the genus. Monitoring of reproductive physiology in wild animals, especially deer, is a complex task. However, considering that knowledge about the reproductive strategies of a species is fundamental to conservation, projects with the aim to understand these

reproductive strategies is of paramount importance for the conservation of endangered species.

Keywords: *Cervidae; Reproductive biology; Conservation.*

Introdução

A ordem Artiodactyla é a quinta maior e mais diversa ordem dentre os grandes mamíferos terrestres vivos, constituída por 10 famílias, 93 gêneros e, aproximadamente, 380 espécies, podendo ser encontrados em praticamente todos os tipos de habitat (Etnyre, 2011). A família Cervidae é constituída por 18 gêneros, que estão amplamente distribuídos, com exceção dos extremos polares (Feldhamer et al., 2015).

A família é constituída por animais herbívoros que, como todos os ruminantes, regurgitam e mastigam várias vezes seu alimento, possuem três pré-estômagos e um estômago verdadeiro (adaptado de Duarte & Merino, 1997).

Na maioria das espécies sul-americanas nasce apenas um filhote por cria, podendo ocorrer em casos raros o nascimento de gêmeos. Os filhotes apresentam pintas brancas no dorso e nas laterais do corpo, que são perdidas na primeira muda de pelos que ocorre aos 3 ou 4 meses, quando se inicia o período de desmama (Duarte & Merino, 1997; Vogliotti, 2008).

O gênero *Mazama* é representado por pequenos cervídeos, que apresentam a particularidade de possuírem a região anterior do corpo mais baixa que a posterior e pequenos chifres não ramificados (Oliveira, 2015). O gênero apresenta a maior riqueza entre os cervídeos neotropicais (Duarte e Merino, 1997).

Segundo a IUCN (2015), o gênero *Mazama* é representado por 10 espécies, sendo que 5 dessas ocorrem no Brasil: *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro), *M. nemorivaga* (veado-amazônico) que possuem *status* de conservação pouco preocupante

(LC), mesmo que sua população de vida livre esteja decaindo; *M. nana* (veado-de-mão-curta), *M. bororo* (veado-bororó-do-sudeste) que estão classificados como vulneráveis (VU); e *M. americana* (veado-mateiro) que apresenta dados insuficientes para sua classificação (DD).

Os representantes da família Cervidae estão divididos em dois grandes clados: O clado “**vermelho**” no qual estão as espécies associadas a ambientes florestais como *Mazama americana* (veado-mateiro), *M. nana* (veado-bororó-do-sul), *M. bororo* (veado-vermelho), que pode ocupar uma ampla variedade de habitats; e o clado “**cinza**” no qual estão as espécies encontradas em ambientes abertos como campos e savanas, representado por: *Mazama nemorivaga* (veado-roxo) e *M. gouazoubira* (veado-catingueiro) (Duarte et al. 2008; Oliveira, 2015).

Conservação em cativeiro

A manutenção de populações cativas geneticamente saudáveis exige atenção cuidadosa no gerenciamento da população, incluindo a minimização da consanguinidade. A robustez dos programas de criação é influenciada pela diversidade genética da população existente, quanto maior o número de animais envolvidos, maior a probabilidade de a diversidade genética ser mantida a longo prazo (Pukazhenthil et al. 2012). Uma das estratégias sugeridas por Conde et al. (2011) para a manutenção das populações de espécies ameaçadas mantidas em cativeiro, é a especialização de cada zoológico na reprodução de algumas espécies, ao invés do foco ser em aumentar a riqueza de espécies, uma vez que essa especialização aumenta o sucesso da reprodução e possibilita maior diversidade genética.

No geral, as instituições (zoológicos, criadouros, aquários, santuários, etc.) que mantêm animais selvagens em cativeiro possuem cerca de uma em cada sete espécies

ameaçadas (15%). Quando considerados individualmente, não possuem grandes populações de uma determinada espécie, porém, coletivamente, essas instituições possuem populações consideráveis de várias espécies, inclusive altamente ameaçadas e devem se esforçar para garantir que suas populações possam sobreviver a longo prazo (Conde et al. 2011).

O cumprimento dos objetivos de sustentabilidade para as espécies ameaçadas requer uma combinação de criação natural estratégica e uso de técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial. Para que ambas as abordagens sejam bem-sucedidas, é importante ter uma compreensão completa da biologia reprodutiva básica de cada espécie, incluindo informações sobre padrões hormonais reprodutivos, início da puberdade, duração da gestação, anestro lactacional, gametogênese masculina e feminina e sazonalidade (Pukazhenthil et al., 2012).

Fisiologia reprodutiva

Assim como os processos fisiológicos, a reprodução e a atividade adrenal estão intimamente relacionadas com a flutuação hormonal. O que torna a compreensão dos processos endócrinos a chave para se obter sucesso no manejo de populações de espécies selvagens com baixos estoques populacionais, tanto *in situ* quanto *ex situ*. A flutuação hormonal de um determinado indivíduo pode ser acessada de duas maneiras. Diretamente, por meio da quantificação de hormônios circulantes no sangue ou, indiretamente, através da quantificação de hormônios e metabólitos hormonais excretados em materiais biológicos como urina, fezes, saliva ou pelos (Micheletti et al. 2014).

A dosagem dos hormônios feita a partir das fezes é amplamente utilizada em espécies selvagens, a utilização deste tipo de amostra biológica possibilita a condução de

estudos em ambientes naturais, de indivíduos sozinhos ou em grupos. Este tipo de avaliação possui algumas vantagens, pois como os metabólitos geralmente distribuem-se uniformemente pelas fezes é necessária uma pequena quantidade de amostra bem homogeneizada, além disso a colheita das amostras pode ser feita do chão, sem riscos para os animais ou para o homem (modificado de Polegato, 2008 e Micheletti et al. 2014).

A análise hormonal em amostra fecal e urinária é uma técnica completamente não invasiva e já foi usada e validada com sucesso para monitorar atividade gonadal e adrenocortical em inúmeras espécies de animais de laboratório, domésticos, em cativeiro e de vida livre (Reis, 2013). Uma vez validada, a análise do metabólito hormonal fecal pode ser usada para avaliar variáveis ambientais e sociais que podem estar limitando a manutenção ou o crescimento de populações ameaçadas de extinção (Eckardt et al., 2016).

O monitoramento dos parâmetros reprodutivos e da fisiologia reprodutiva em animais selvagens, especialmente de cervídeos, é uma tarefa complexa. Parte das limitações impostas aos estudos desse grupo está relacionada ao comportamento intratável dos animais e à alta susceptibilidade ao estresse. Nesse contexto, o uso de técnicas invasivas para avaliação reprodutiva é difícil, por se tornarem potenciais fontes de estresse aos animais. Assim, as técnicas de monitoramento não invasivo, com a utilização de amostras biológicas como fezes, saliva e urina, é a melhor opção para trabalhos de monitoramento hormonal diário com cervídeos (Polegato, 2008).

De maneira geral, em mamíferos os metabólitos de hormônios esteroides são excretados nas fezes no intervalo entre oito horas e três dias após sua secreção (Reis, 2009). Com isso, as análises endócrinas são, portanto, uma ferramenta importante para monitorar a reprodução, a saúde e a qualidade de vida dos animais e, consequentemente,

tornaram-se cada vez mais comuns no estudo das populações de zoológicos, mas podem ser difíceis de implementar quando amostras não são facilmente individualizadas em grupos de animais (Fuller et al. 2011).

Técnicas imunológicas não invasivas para monitoramento hormonal, como radioimunoensaio (RIA) e enzimoimunoensaio (EIA), são utilizadas por serem capazes de mensurar pequenas quantidades de hormônios em amostras biológicas de fácil acesso. Os RIAs são altamente sensíveis e têm sido um dos métodos imunológicos mais comumente utilizados para análise hormonal até agora, entretanto, o método necessita do uso de radioatividade, o que traz risco para o pessoal do laboratório, além de produzir resíduo radioativo. Em contraste, os EIAs não utilizam radioatividade, os equipamentos têm preços mais acessíveis, os reagentes são fáceis de preparar e são altamente estáveis com uma longa vida em prateleira. Muitos EIAs são agora tão sensíveis quanto os RIAs e, dessa forma, estão ganhando popularidade entre os pesquisadores, pois envolvem uma série de passos bem controlados, que determinam a presença ou ausência de um hormônio específico na amostra (Brown, 2008).

O monitoramento hormonal não invasivo torna-se chave para o manejo em cativeiro de espécies ameaçadas, pois por meio deste é possível realizar a quantificação hormonal e avaliar as respostas fisiológicas que estão associadas a alterações comportamentais em relação a diferentes condições ambientais. Desta forma é possível compreender através desse método o ciclo estral das espécies, sua duração, níveis hormonais basais e picos, a investigação de sazonalidade reprodutiva, realizar a identificação de fêmeas potencialmente gestantes e até mesmo compreender relações de dominância e subordinação em comunidades, bem como identificar doenças endócrinas (Micheletti et al. 2014).

Biologia reprodutiva do gênero *Mazama*

De maneira geral, a biologia reprodutiva do gênero ainda não foi totalmente descrita, no entanto algumas informações sobre período reprodutivo, ciclo estral e sazonalidade já foram apresentadas para alguns representantes do gênero.

Mazama americana (veado-mateiro): a fisiologia reprodutiva do veado-mateiro é pouco descrita, na literatura são encontradas apenas informações básicas como as fêmeas são poliéstricas, apresentando ciclo estral com duração média de 21 dias e período gestacional de 7 meses, os nascimentos são concentrados no período de março a outubro, dependendo da localidade. Os machos apresentam um par de chifres retos e delgados, com cerca de 12 cm de comprimento (Duarte et al. 2012b; Martins et al. 2018).

Mazama nana (veado-de-mão-curta); *M. bororo* (veado-vermelho) e *M. nemorivaga* (veado-roxo): a biologia reprodutiva dessas espécies ainda é desconhecida, esta ausência de dados sobre as características reprodutivas desses animais indicam a urgência da realização de trabalhos voltados para o conhecimento dessas espécies. De acordo com a literatura disponível no momento, os aspectos reprodutivos desses animais podem ser resumidos na presença de cio pós-parto e no nascimento de apenas um filhote por ano, após uma gestação de aproximadamente sete meses, não apresentam sazonalidade definida, no entanto os nascimentos concentram-se de setembro a fevereiro. (Vogliotti 2003; Mikich & Bérnils 2004; Duarte et al. 2012 a;).

M. gouazoubira (veado-catingueiro) apresenta ciclos estrais mais longos do que outras espécies de cervídeos de pequeno porte, com duração de 21 a 26 dias. O período gestacional varia de 208 a 215 dias. Apresentam cio pós-parto que pode ocorrer entre 2 e 7 dias após o parto, porém a taxa de concepção no cio pós-parto é baixa, sugerindo uma

incompleta involução uterina, pois mesmo em casos onde ocorre a concepção, esta gestação não vai a termo (Pereira et al. 2005).

Conclusão

A biologia reprodutiva do gênero é praticamente desconhecida em muitos aspectos, contendo em poucos casos algumas informações sobre estro e período gestacional. Considerando que o conhecimento sobre as estratégias reprodutivas de uma espécie é fundamental para o desenvolvimento de projetos que visam a conservação de espécies selvagens em longo prazo, sanar essas lacunas no conhecimento é de suma importância para a manutenção e preservação das populações mantidas em cativeiro, com o intuito de no futuro serem desenvolvidos projetos de reintrodução e/ou translocação.

Referências

- Brown, J. L.** *Wildlife Endocrinology Manual* – “Manual de endocrinologia para avaliação hormonal de espécies selvagens”. Smithsonian National Zoological Park, Conservation and Research Center (Publicação interna), 2008.
- Conde, D. A.; Flesness, N.; Colchero, F.; Jones, O. R.; Scheuerlein, A.** An emerging role of zoos to conserve biodiversity. *Science*. p. 331. 2011.
- Duarte, J. M. B.; Braga, F. G.; Vogliotti A.; Abril, V. V.; Piovezan, U.; Reis, M. L.; Ramos, H. G. C.; Zanetti, E. S.** Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de extinção. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBIO, 2012, 128 p. a.
- Duarte, J. M. B.; González, S.; Maldonado E. J.** The surprising evolutionary history of South American deer. Elsevier. 2008.
- Duarte, J. M. B.; Vogliotti, A.; Zanetti, E. S.; Oliveira, M. L.; Tiepolo, L. M.; Rodrigues, L. F.; Almeida, L. B.** Avaliação do risco de extinção do veado-mateiro *Mazama americana* Erxleben, 1777, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 3, p. 33-41, 2012 b.
- Duarte, J.M.B., Merino, M.L.** Taxonomia e Evolução. In: Duarte, J.M.B. (Ed.), *Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP, Jaboticabal, p. 1–21. 1997.
- Eckardt, W.; Stoinski, T. S.; Rosenbaum, S.; Umuhoza, M. R.; Santymire, R.** Validating faecal glucocorticoid metabolite analysis in the *Virunga Mountain Gorilla* using a natural biological stressor. *Conservation Physiology*. V. 4. 2016.

Etnyre, E.; J. Lande; A. Mckenna e J. Berini. "Artiodactyla", Animal Diversity Web. 2011.

Feldhamer, G. A.; Drickamer, L. C.; Vessey, S. H.; Merritt, J. F.; Krajews, C. Mammalogy Adaptation, Diversity, Ecology. Fourth Edition. 748p. 2015.

Fuller, G.; Margulis, S. W.; Santymire, R. The effectiveness of indigestible markers for identifying individual animal feces and their prevalence of use in North American zoos. Zoo Biology. 30: 379–398. 2011.

Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais das espécies ameaçadas (IUNC). *Mazama nana*. 2015. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/details/29621/0>>.

Martins, N. E. X.; Riberio, A. P. C.; Trindade, H. I.; Silva, M. A. G.; Almeida, k. S. Helmintos de veados-mateiros (*Mazama americana*) e suas implicações à criação de ruminantes domésticos – revisão de literatura. Revista Científica de Medicina Veterinária. 2018.

Micheletti, T.; Brown, J. L.; Walker, S. L. Monitoramento hormonal não invasivo. In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. 2ª edição. Tratado de Animais Silvestres. São Paulo: Roca, 2014.

Mikich, S.B. & R.S. Bérnils. 2004. Livro vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná.

Oliveira, M. L. Distribuição e estimativa populacional do veado-mão-curta (*Mazama nana*) utilizando amostragem não invasiva. 2015. 61p. Tese – (Ecologia aplicada) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba. 2015.

Pereira, R.J.G.; Polegato, S.S.; Negrão, J.A.; Duarte, J.M.B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. Theriogenology 65 387–399. 2005.

Polegato, B. F. Determinação dos perfis de estrógenos e progestinas fecais durante o ciclo estral, gestação e período pós-parto em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em cativeiro. 2008. 74p. Dissertação – (Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal. 2008.

Pukazhenth, B.; Quse, V.; Hoyer, M.; Gastelaars, H.V.E.; Sanjur, O.; Brown, J. L. A review of the reproductive biology and breeding management of tapirs. Integrative Zoology; 8: 18–34. 2012.

Reis, A. C. G. Determinação dos perfis de estrógenos e progestinas fecais durante o ciclo estral e gestação em paca (*Cuniculus paca*). 2013. 78p. Tese – (Cirurgia Veterinária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP. Jaboticabal. 2013.

Reis, A. C. G. Estudo colpocitológico e aspectos endócrinos de pacas (*Agouti paca*, L.1766) adultas. 2009. 88p. Dissertação – (Cirurgia Veterinária) - Universidade Estadual Paulista – UNESP. Jaboticabal. 2009.

Vogliotti, A. História natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria. 2003. 96p. Dissertação –

(Ecologia de Agroecossistemas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba. 2003.

Vogliotti, A. Partição de habitats entre os cervídeos do Parque Nacional do Iguaçu. 2008. 73p. Tese – (Ecologia aplicada) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba. 2008.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL DO VEADO-DE-MÃO-CURTA (*Mazama nana*), POR MONITORAMENTO HORMONAL NÃO INVASIVO

Resumo: A fisiologia reprodutiva da espécie ainda é desconhecida em muitos aspectos, como o ciclo reprodutivo e padrões endócrinos associados à reprodução. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo validar técnica não invasiva de monitoramento hormonal fecal e determinar as características do ciclo estral (perfil de progestágenos fecais, duração do ciclo estral, duração da fase de diestro) em fêmeas de *Mazama nana*. O trabalho foi desenvolvido com quatro fêmeas, em dois pontos de coleta, Ponto 1: Três fêmeas alojadas em um recinto coletivo no setor extra do Zoológico Municipal Danilo Galafassi, na cidade de Cascavel, no Estado do Paraná, Brasil. Ponto 2: Uma fêmea alojada em uma baia individual, no NUPECCE, na Seção de Animais Silvestres UNESP - *Campus* de Jaboticabal. Foram realizadas coletas de urina, fezes e análise comportamental. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A duração do ciclo estral e a duração do diestro foram estimados por observação comportamental direta associadas aos resultados das dosagens. Foram realizadas análise de variância seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram feitas com programa estatístico (SAS versão 9.3, *SAS Institute Inc.*, Cary, NC, EUA) e o nível de significância para todos os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$). O método de monitoramento de progestágenos fecais associado à análise comportamental foi validado com sucesso para caracterização do ciclo estral. Foi determinada a duração média (\pm DP) do ciclo estral como $23,8 \pm 1,8$ dias; e do estro comportamental $1,5 \pm 0,7$ dias; bem como as concentrações médias (\pm EPM) de progestágenos fecais para a fase luteal $6.183,0 \pm 2.268,7$ (ng/g) e, para a fase inter-luteal de $754,5 \pm 216,1$ (ng/g). Foi observado também que a espécie apresenta um período gestacional de, aproximadamente, sete meses, o que, mesmo se tratando de um relato de caso, trata-se de importante informação para o manejo reprodutivo da espécie.

Palavras chave: Fisiologia reprodutiva; Progestágenos fecais; Comportamento.

Abstract: The reproductive physiology of the species is still unknown in many aspects as reproductive cycle and endocrine patterns associated with reproduction. The objective of this study was to validate a noninvasive technique of fecal hormone monitoring and to determine the characteristics of the estrous cycle (fecal progestin profile, estrous cycle length, duration of diestrus) in *Mazama nana* females. The research was developed with four females, at two points of collection: Point 1: Three females housed in a collective enclosure in the extra sector of the Municipal Zoo Danilo Galafassi, in the city of Cascavel, in the state of Paraná, southern Brazil. Point 2: A female allocated alone in a bay, at the NUPECCE (Cervids Research Center), at UNESP - Jaboticabal Campus. Collection of urine, feces and behavioral analysis were performed. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The duration of the estrous cycle and diestrus were estimated by hormonal analysis and estrus length by direct behavioral observation. A variant analysis was performed followed by Tukey's test. All analyzes were performed using specific software (version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and the significance level for all statistical tests was 5% ($p < 0.05$). The fecal progestin monitoring method associated with behavioral analysis was successfully validated for characterization of the estrous cycle. The mean (\pm DP) estrus cycle length was determined as 23.8 ± 1.8 days, behavioral estrus as 1.5 ± 0.7 days. Fecal progestogens mean (\pm SEM) for the luteal phase was $6,183.00 \pm 2,268.68$ (ng/g) and for the inter-luteal phase was 754.54 ± 216.06 (ng/g). It was also observed that the gestation length was approximately seven months, besides it is only a case report, it is an important information for the species reproductive management.

Keywords: Reproductive physiology; Fecal progestogens; Behavior.

INTRODUÇÃO

Mazama nana (Hensel 1872) é o menor cervídeo do gênero, presente exclusivamente no continente americano, que também é conhecido popularmente pelos nomes de veado-anão, veado-poca, veado-cambuta, veado-bororó-do-sul, veado-de-mão-curta (Duarte & Merino 1997; Vogliotti 2008; Duarte et al., 2012a).

Habita as regiões Sul e Sudeste do Brasil, nos estados do Paraná, Santa Catarina, norte e centro do Rio Grande do Sul, extremo sul de São Paulo e Mato Grosso do Sul, bem como na porção leste do Paraguai e na Argentina, na província de Misiones (Oliveira 2015). Principalmente áreas com densa vegetação e altas altitudes, como serras do interior da Mata Atlântica no interior de Santa Catarina e Paraná, sobretudo regiões com grande abundância de água. Sendo encontrada, principalmente, nas Florestas com Araucária e formações adjacentes como a floresta ombrófila densa e o cerrado, que cobrem sua área de ocorrência (Mikich & Bérnils 2004; Bressan et al. 2009).

A capacidade adaptativa da espécie provavelmente é baixa; e a ausência de estudos específicos impossibilita o conhecimento de diversos aspectos de sua biologia (Mikich & Bérnils 2004). A conservação da vida selvagem é altamente dependente do sucesso individual ao lidar com seu ambiente, sobreviver e se reproduzir (Micheletti et al. 2014). Por isso, os programas de reprodução em cativeiro talvez sejam a única opção de conservação em curto prazo para muitas espécies atualmente ameaçadas (Conde et al. 2011).

A compreensão dos processos endócrinos é chave para se obter sucesso no manejo de populações de espécies selvagens e a melhor maneira de acessar essas flutuações hormonais é por meio do monitoramento hormonal não invasivo, ou seja, sem a necessidade de contenção do animal evitando o estresse e sem a utilização de fármacos que, em muitos casos, podem interferir na secreção hormonal (Micheletti et al. 2014; Schawarzenberger et al. 1996). Um dos métodos não invasivos mais utilizados para o monitoramento hormonal em animais selvagens é a quantificação de metabólitos de hormônios excretados nas fezes (Hernández-Jáuregui et al. (2005).

Quanto à fisiologia reprodutiva da espécie, dados como ciclo reprodutivo e padrões endócrinos associados à reprodução ainda são pouco conhecidos. Porém, alguns trabalhos citam alguns aspectos como, o nascimento de um único filhote após uma gestação de aproximadamente sete meses, e que não apresentam sazonalidade definida, no entanto acredita-se que os nascimentos sejam concentrados no período de setembro a fevereiro (Duarte et al. 2012 a; Duarte et al. 2012 c).

Considerando estes fatores, a presente pesquisa teve por objetivos: (1) validar técnica não invasiva de monitoramento hormonal fecal em *Mazama nana* (veado-de-mão-curta); (2) determinar as características do ciclo estral (perfil de progesterógenos, duração do ciclo estral, duração da fase de diestro) em fêmeas de *Mazama nana*.

- **A espécie**

Possui entre 45 a 50 cm de altura e de 60 a 100 cm de comprimento. Normalmente pesa menos de 15 kg (Figura 1). Sua cabeça é curta, as orelhas são pequenas e arredondadas, com as extremidades levemente arredondadas e pelos curtos, sua coloração apresenta poucas mudanças com tonalidade marrom-avermelhado por todo o corpo (Tossulino et al. 2006). Suas regiões submandibular, maxilar e ventral não são brancas, mas apresentam uma tonalidade mais clara em relação ao restante do corpo, apresentando pelos brancos apenas na cauda (Vogliotti 2008; Abril & Duarte 2008).



Figura 1. A. Fêmea de veado-de-mão-curta (*Mazama nana*) – Zoológico Municipal de Cascavel - PR; B. Macho de veado-de-mão-curta Zoológico Municipal de Cascavel - PR. Imagens: Geissiane N. Toledo, 2018.

Os machos apresentam chifres simples verdadeiros, direcionados para trás e sem ramificações, possuem ciclos de crescimento e queda, sendo que durante o crescimento são cobertos por um tecido altamente vascularizado, denominado velame (Tossulino et al., 2006; Vogliotti 2008).

Uma particularidade desses animais são membros torácicos mais curtos que os pélvicos (Tossulino et al., 2006; Vogliotti 2008).

Apresentam hábitos noturnos e crepusculares, são solitários, territorialistas, ocupando pequenas áreas de vida, podendo também ocorrer aos pares. Sua dieta é desconhecida, porém acredita-se que seja semelhante às demais espécies do gênero, alimentando-se de frutos, folhas, brotos e gramíneas (Mikich & Bérnils 2004).

Está classificada como vulnerável (A4cde), de acordo com informações sobre declínio populacional passado e projeção de declínio populacional futuro, pela Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN 2015). Essa classificação é ocasionada pela redução contínua das populações, que poderá ser superior a 30% nas próximas três gerações (15 anos) e, ao fato de não haver perspectiva de cessação dos impactos que estão causando essa redução. Esta suspeita de declínio é causada por efeitos de borda

nos pequenos remanescentes florestais, caça ilegal, predação por cães domésticos, agroquímicos, entre outros (IUCN 2015).

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida com quatro fêmeas de veado-de-mão-curta (*Mazama nana*), em duas instituições (Tabela 1):

- **Zoológico Municipal Danilo Galafassi – Cascavel - Paraná.**

Onde estavam alojadas três fêmeas e um macho em um recinto coletivo, aberto de 20 X 30m, com pastagem e iluminação natural, no setor extra do zoológico, onde não tinham contato com visitantes.

Para a determinação do método de coleta e condicionamento dos animais, que estavam no Zoológico, foi realizado um projeto piloto com duração de um mês, onde foi definido como e quando seriam realizadas as coletas, de forma que interferissem minimamente na rotina dos animais. Durante este período, os animais foram condicionados a permitir tanto a coleta de fezes como de urina.

- **Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) – Jaboticabal – São Paulo.**

No qual estava alocada uma fêmea em uma baia individual, dentro de um galpão, na Seção de Animais Silvestres da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - *Campus* de Jaboticabal.

Tabela 1. Dados referente a local de nascimento, histórico de prenhez e idade das fêmeas de *Mazama nana* (n=4) monitoradas.

| Identificação | Origem | Idade | Peso (kg) | Histórico de prenhez |
|------------------------------|-----------------|--------|-----------|----------------------|
| Zoológico de Cascavel | | | | |
| Preta | Nascida no Zoo | 3 anos | 14 | Nulípara |
| Azul | Nascida no Zoo | 4 anos | 16 | Nulípara |
| Vermelha | Doação do IBAMA | 6 anos | 13 | Múltipara |
| NUPECCE | | | | |
| Pitanga | Doação | 5 anos | 12,5 | Múltipara |

1. Coleta de urina

Para os animais que estavam alocados no Zoológico de Cascavel foram realizadas três coletas de urina, para realização de exames laboratoriais quando alguns animais apresentaram sinais clínicos, levando em consideração como parâmetro o comportamento normal apresentado durante o período de observação, como isolamento, pouca movimentação, constipação e pelos arrepiados.

Durante uma semana, o observador passou a colocar o cabo da vassoura utilizada para limpar o recinto em baixo dos animais quando iam urinar (os animais já estavam acostumados com aquele objeto e não permitiam a aproximação com objetos estranhos), com o objetivo de testar a aceitação dos animais. Após o condicionamento, as coletas de urina foram realizadas utilizando um coletor urinário estéril de 100 ml, fixado a um bastão de metal de 50 cm, garantindo uma amostra livre de contaminação (Figura 2). Como os animais urinam frequentemente no mesmo local, o observador ficava próximo esperando e, quando o animal começava a urinar, aproximava-se lentamente e realizava a coleta.



Figura 2. A. Instrumento de coleta, composto por um bastão de metal com coletor urinário acoplado à ponta. B. Amostra de urina coletada.

O material coletado foi submetido a análise laboratorial no Hospital Veterinário do Centro Universitário Fundação Assis Gurgacz (FAG) em Cascavel - PR. Os veterinários do Zoológico de Cascavel após a análise dos resultados constataram um início de infecção urinária em duas fêmeas (Preta e Vermelha). Após o diagnóstico, os animais foram devidamente medicados e, em três dias apresentaram sinais de melhora.

2. Coleta de fezes

As coletas foram realizadas no período de três meses: de março a maio de 2018, nos dois locais de coleta, no mesmo horário entre 08:00 e 10:00 h da manhã. Após a primeira identificação do cio (manifestação comportamental do estro), as amostras fecais foram coletadas

cinco vezes por semana até a ocorrência do terceiro cio, permitindo assim o monitoramento de dois ciclos estrais sucessivos.

Como os animais do Zoológico estavam em recintos coletivos, para facilitar a identificação, os animais possuíam fitas de cetim coloridas amarradas ao pescoço. O recinto possuía três baias individuais de 2 x 1 m, onde as fêmeas passavam a noite, visando garantir a individualização e correta identificação das amostras de fezes coletadas na manhã seguinte.

No dia anterior, no final da tarde, as baias eram fechadas e em seguida todas as fezes do recinto eram removidas com o auxílio de uma vassoura e uma pá, para garantir a confiabilidade da amostra na coleta realizada na manhã seguinte no chão da baia ou logo em seguida à alimentação no chão do recinto. A limpeza das baias era feita no período da manhã, logo após a coleta. Quando estavam soltos no recinto, os animais nunca defecavam dentro da baia.

Os animais recebiam alimentação todos os dias no período das 8:30 às 9:00 h da manhã. Após a abertura das baias, com o intuito de coletar amostras frescas, a alimentação era fornecida e esperava-se até que os animais defecassem para que fosse realizada a coleta. Após a coleta, as amostras eram armazenadas em sacos plásticos tipo *zip lock*, previamente identificados, contendo o número da amostra, identificação dos animais e data da coleta; e congeladas em *freezer* comum à temperatura de -20°C.

Durante a manutenção do recinto e realização das coletas, no Zoológico de Cascavel, como os animais passavam a noite em baias individuais, assim que eram soltos o macho poderia ou não demonstrar interesse por alguma das fêmeas, caso ocorresse uma tentativa de monta, era observado se a fêmea estava ou não receptiva ao macho, em seguida o comportamento era registrado em uma tabela para posterior comparação com o resultados das dosagens hormonais, com o intuito de validar uma possível manifestação de estro comportamental.

No NUPECCE, como a fêmea ficava em uma baia individual, após a detecção do primeiro estro, a fêmea era exposta à presença do macho por 5 minutos, uma vez por dia, por três dias, no intuito de verificar a aceitabilidade da fêmea ao macho. Em seguida, era dado um intervalo de 15 dias e iniciavam novamente os testes até a detecção de um novo cio. Entende-se como cio a manifestação comportamental do estro.

Nos dois pontos era observado se havia tentativa de monta por parte do macho, quando ocorria essa tentativa era observado se a fêmea estava receptiva ou não. Nesta pesquisa, quando as fêmeas permitiam a monta era considerado período de cio.

3.1 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e, em seguida, colocadas em estufa a 56° C por aproximadamente 72 h até que ficassem completamente secas; posteriormente foram trituradas e peneiradas. A extração de progestágenos fecais foi realizada com base em um protocolo adaptado de Graham et al. (2001), que consistiu basicamente em: 5 ml de metanol (80%) adicionados a 0,5g de amostra fecal. Após a agitação da mistura em um vórtex durante 30 segundos, eram colocadas em um homogeneizador por 12 h (Mod. AP22, Phoenix Ltda., Araraquara – SP - Brasil). Em seguida, as amostras eram agitadas novamente em vórtex durante 10 s e depois eram centrifugadas a 1.500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante armazenado em *freezer* a -20°C até a realização das análises (Graham et al. 2001; Palme et al. 2013).

3.2 DOSAGENS HORMONAIAS

3.2.1 Validação das dosagens hormonais

Para a validação das dosagens hormonais foi utilizado um teste de paralelismo que permite determinar se o ensaio está medindo corretamente as concentrações de metabólitos ao indicar se as ligações entre os metabólitos hormonais das amostras e o anticorpo apresentam a mesma similaridade imunogênica que a apresentada entre a ligação hormônio padrão e anticorpo. Além disso, o ensaio indica o melhor fator de diluição para a maioria das amostras, sendo indicado como diluição o valor mais próximo a 50% de ligação na curva (Huamám 2017).

No intuito de averiguar a eficácia das dosagens de metabólitos fecais nas fezes do veado-de-mão-curta foi realizado um teste de validação proposto por Brown et al. (2004). Após a elaboração de um *pool* com todos os extratos das amostras fecais, foi realizada uma diluição seriada deste em tampão de EIA, que foi desde o *pool* (1:1) até 1:33.554.432. Posteriormente, foi realizada uma comparação entre a curva-padrão e a curva formada pelo *pool* para a validação do teste através do paralelismo entre as mesmas.

Com isso foi possível observar que a diluição que apresentou ligação de, aproximadamente, 50% entre anticorpo e os metabólitos de progestágenos fecais (MPF) foi de 1:2.048, que foi a diluição utilizada nas amostras para a realização da dosagem hormonal indireta (Figura 3).

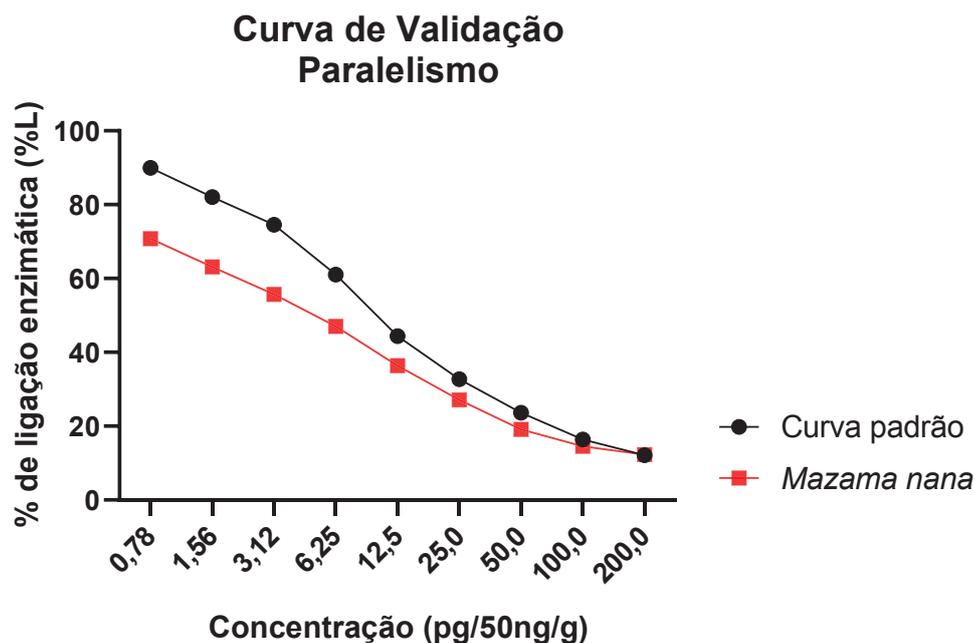


Figura 3 - Concentração hormonal em relação ao percentual de ligação enzimática (% L) para as curvas-padrão de validação para progestágenos fecais de *Mazama nana*, mostrando paralelismo entre elas. O percentual de ligação do hormônio conjugado (% L) refere-se ao percentual de hormônio conjugado (progesterona-HRP) ligado aos anticorpos e é inversamente proporcional à concentração do hormônio a ser quantificado.

- 3.2.2 Enzimoimunoensaio (EIA)

Após a extração dos progestágenos fecais, as dosagens foram realizadas por meio de EIA, no Laboratório de Endocrinologia do NUPECCE - FCAV/UNESP Jaboticabal, utilizando o anticorpo CL425 (*California University, Davis – CA - EUA*) para progestágenos, por apresentar alta reatividade com os metabólitos 5 α - e 5 β - pregnonas, que são excretados nas fezes de espécies do gênero *Mazama* (Polegato et al. 2004).

Os extratos fecais foram diluídos em tampão de diluição (1:2.048) e dosados em duplicata. Os coeficientes de variação foram utilizados como controles internos alto e baixo e se mantiveram <10% tanto intra-ensaio como inter-ensaio. As concentrações de progestágenos fecais foram expressas em nanogramas por grama de fezes secas (ng/g fezes secas).

3. Análise de dados

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão (EPM). A duração do ciclo estral e a duração do cio foram também estimados por observação comportamental direta. O período gestacional foi indicado considerando evidências de cópula até o nascimento do filhote. As concentrações basais de progestágenos fecais foram determinadas para cada animal, individualmente, após a identificação do menor valor de progestágenos fecais em cada ciclo de cada fêmea, por meio

da dosagem hormonal, foi realizado o cálculo de média e desvio padrão (DP) dos valores basais e em seguida calculado o valor (média + 2 DP). A partir de então os valores acima do valor de critério (média + 2 DP) foram considerados indicativos de fase luteal, enquanto os valores abaixo desse critério foram considerados indicativos de fase inter-luteal, o intervalo entre o primeiro e o último dia da fase luteal foi considerado como duração do diestro ou da fase lútea (Pereira et al. 2005; Polegato 2008).

No intuito de calcular as médias hormonais, o dia 1 de cada ciclo foi definido como o dia seguinte ao último dia do cio. Posteriormente, foi realizada uma análise de variância seguida de teste de Tukey. Todas as análises foram feitas com programa estatístico (SAS versão 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e o nível de significância para todos os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Foram analisados oito ciclos estrais completos, sendo dois por fêmea. Os resultados de duração das fases e concentrações médias de progestágenos podem ser vistos na Tabela 2. Os perfis individuais de progestágenos fecais dos dois ciclos estrais consecutivos observados em cada fêmea estão demonstrados na Figura 4.

Tabela 2. Duração do ciclo estral, fase luteal, fase inter-luteal, estro comportamental e concentrações médias de metabólitos de progestinas.

| Fêmeas | Ciclos | Duração da fase interluteal (dias) | Duração da fase luteal (dias) | Duração do ciclo estral (dias) | Duração do cio (dias) | [MPF] Fase interluteal (ng/g) | [MPF] Fase luteal (ng/g) |
|--------------------|--------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Preta | 1° | 5 | 21 | 26 | 1 | 495,9 | 3.476,0 |
| | 2° | 2 | 21 | 23 | 3 | 117,6 | 7.109,6 |
| Azul | 1° | 5 | 21 | 26 | 1 | 1.620,9 | 3.418,2 |
| | 2° | 4 | 19 | 23 | 3 | 1.225,1 | 2.546,4 |
| Vermelha | 1° | 4 | 22 | 26 | 1 | 1.036,6 | 1.7544,4 |
| | 2° | 2 | 21 | 23 | 1 | 1.294,6 | 1.4313,1 |
| Pitanga | 1° | 5 | 17 | 22 | 1 | 126,0 | 395,9 |
| | 2° | 4 | 18 | 22 | 2 | 119,6 | 660,2 |
| Dias *(média ± DP) | | | | | | **754,5 ± | **6183,0 ± |
| **(média ± EPM) | | *3,9 ± 0,4 | *20,0 ± 0,6 | *23,9 ± 1,8 | *1,5 ± 0,7 | 216,1 | 2268,4 |

[MPF] – Metabólitos de progestágenos fecais; DP – desvio padrão; D – dias; EPM – erro padrão da média; * Valores apresentados em (média ± DP); Valores apresentados em (média ± EPM).

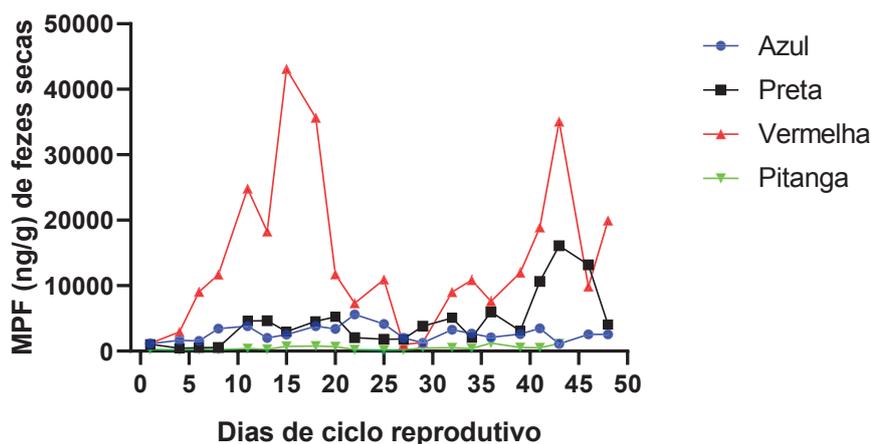


Figura 4 – Perfis individuais de metabólitos de progestágenos fecais (MPF), em ng/g de fezes secas, de quatro fêmeas de *Mazama nana*. Os dados mostram dois ciclos reprodutivos consecutivos para cada fêmea.

Com base nos dados provenientes da observação comportamental, a duração média (\pm DP) do ciclo estral foi de $23,9 \pm 1,7$ dias, de acordo com os oito ciclos observados. Também considerando a análise comportamental, a duração média (\pm EPM) do cio (estro comportamental, $n=11$ observações) foi de $1,5 \pm 0,2$ dias. Com base nos dados das dosagens hormonais, o diestro (fase luteal) apresentou duração média (\pm DP) de $20,0 \pm 0,6$ dias e a fase inter-luteal (abrangendo proestro, estro e metaestro) de $3,9 \pm 0,4$ dias (Tabela 2). Todos os cios indicados pelas setas foram detectados por análise comportamental (Figura 5). A concentração média (\pm EPM) de progestágenos fecais para a fase luteal foi de $6.183,0 \pm 2.268,7$ (ng/g) e para fase inter-luteal de $754,5 \pm 216,1$ (ng/g). Por meio da análise estatística percebeu-se que houve diferença significativa ($p=0,032$) na duração em dias entre as fases do ciclo reprodutivo, assim como na concentração de progestágenos fecais ($p=0.0001$) (Figura 6).

Durante o período de monitoramento, uma das fêmeas emprenhou (Vermelha), levando em consideração que o último estro comportamental observado para esta fêmea foi no final do mês de abril e que o filhote nasceu na segunda semana do mês de novembro de 2018, pode-se inferir que apresentou um período gestacional de 212 ± 4 (\pm DP) dias, aproximadamente, sete meses.

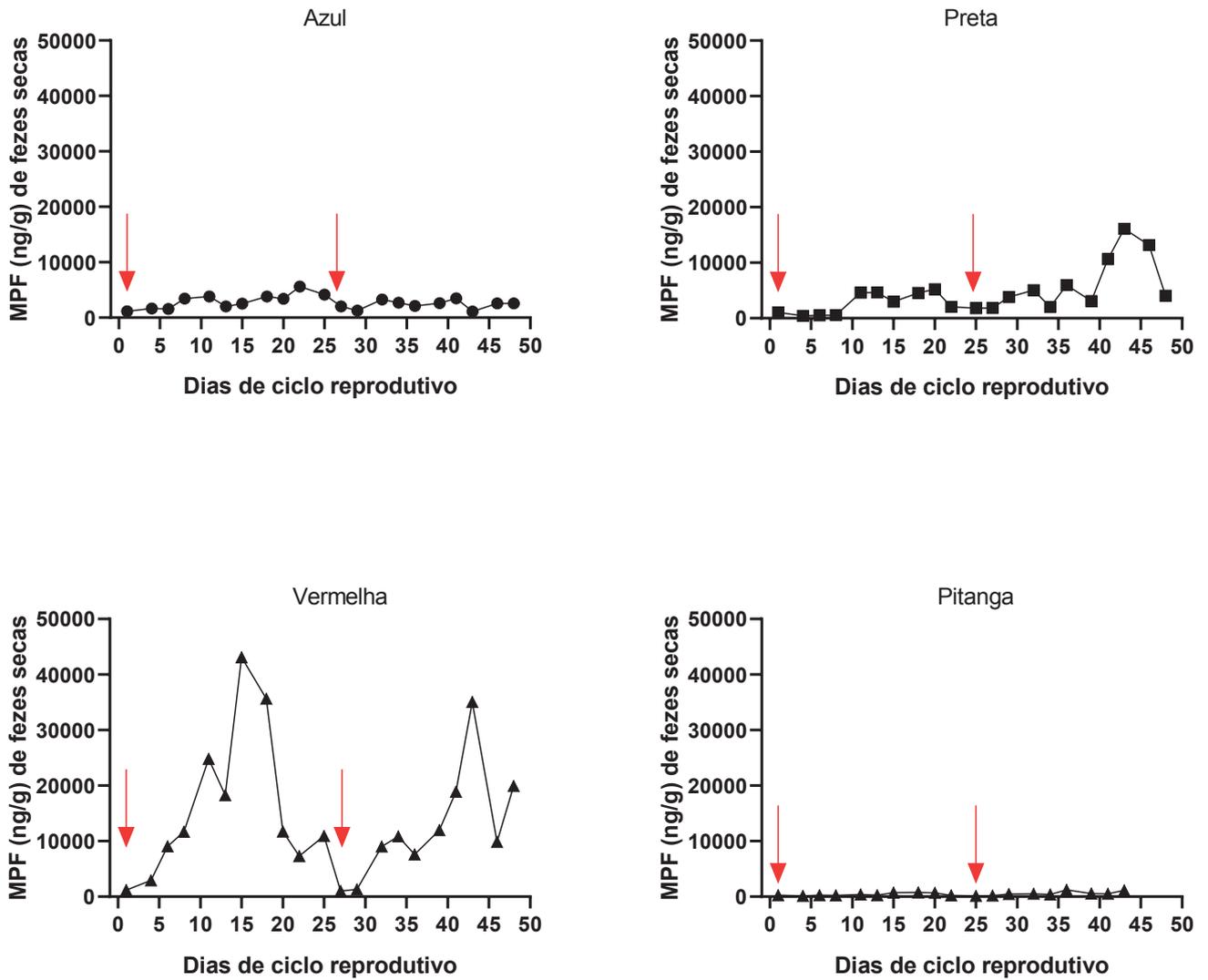


Figura 5 – Perfis individuais de metabólitos progestágenos fecais (MPF) em ng/g de fezes secas, de quatro fêmeas de *Mazama nana*. Os dados mostram dois ciclos reprodutivos consecutivos para cada fêmea. As setas em vermelho indicam a observação de cio (estro comportamental) para cada fêmea.

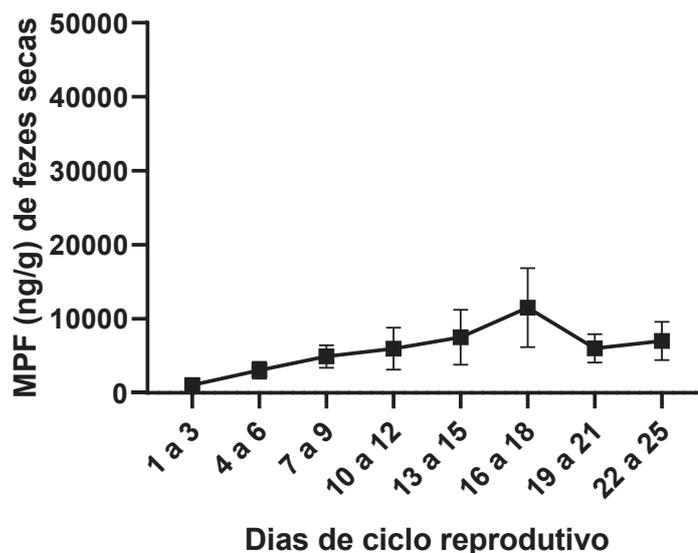


Figura 6 – Concentrações médias (\pm EPM) de progesterona fecal em ng/g de fezes secas, durante oito ciclos reprodutivos de *Mazama nana*, sendo dois ciclos por fêmea monitorada. Os dados foram alinhados considerando o dia da observação do estro comportamental (dia 1).

DISCUSSÃO

Segundo Micheletti et al. (2014), a progesterona e o estrógeno provenientes dos ovários são os principais esteroides envolvidos no ciclo reprodutivo e comportamento sexual das fêmeas. O projeto inicialmente almejava realizar também a dosagem de metabólitos de estrógenos fecais, foi realizada uma tentativa de validação, porém as curvas obtidas proporcionaram resultados bem diversos e não conclusivos, considerando uma série de desafios envolvidos na técnica de dosagens de metabólitos de estrogênios.

As análises de metabólitos de estrógenos fecais, por meio de ensaio imunoenzimático proposto por Brown et al. (2004), apresentam, de forma geral, altos coeficientes de variação (tanto inter quanto intra ensaio), acima do aceitável, o que dificulta a análise dos resultados. Atualmente, devido a essa dificuldade, em especial com estrógenos, tem-se alterado o método de quantificação e dosagem para métodos mais robustos e com menores coeficientes de variação, tais como a cromatografia líquida de alta performance, seguida de espectrometria de massa (HPLC-MS/MS). Este método foi validado com sucesso para a dosagem de metabólitos fecais de cortisol como o 11-cetoetioicolanona (11-k), em ruminantes de maneira mais simples, precisa e rápida, quando comparado aos métodos de dosagem convencionais (Molina-García et al. 2018).

Levando em consideração trabalhos como o de Pereira et al. (2005), que descreveram com sucesso o padrão de ciclo estral para uma espécie do gênero *Mazama* utilizando apenas a dosagem de progesterona fecal associada ao monitoramento comportamental, optou-se apenas pela dosagem de progesterona fecal.

Neste trabalho foi descrito o padrão endócrino associado ao ciclo estral do veado-de-mão-curta, com a utilização de dosagem de metabólitos fecais de progesterona, por enzimoimunoensaio. Conforme descrito por Brown (2008), os coeficientes de variação para progestágenos fecais mantiveram-se dentro da estimativa esperada (<10% tanto intra-ensaio como inter-ensaio).

A técnica de dosagem de progestágenos fecais por enzimoimunoensaio descreveu com sucesso os eventos reprodutivos da espécie, no entanto considerou-se que a associação da análise comportamental simultânea durante a fase de coleta foi de suma importância para corroborar os resultados hormonais. Associações semelhantes foram realizadas com sucesso para determinação dos perfis de esteroides fecais em *M. gouazoubira* (Pereira et al.; 2005) e *Blastocerus dichotomus* (Polegato et al., 2018).

A duração média do ciclo foi de 23,8 dias, semelhante ao observado para outra espécie do gênero como *Mazama gouazoubira* (Pereira et al., 2005), que apresentou um ciclo completo com duração média de 24,7 dias. Valores similares também foram relatados para outras espécies representantes da família Cervidae, tais como 21 dias para *Cervus elaphus* (Adam et al. 1985); 22,4 dias para *Dama* (Asher, 1985); 21,5 dias para *Cervus eldi thamin* (Monfort et al., 1990); 19,3 dias para *Axix axix* (Chapple et al., 1993); 19,3 dias para *Cervus nippon taiouanus* (Liu et al., 2002); e 21,3 dias para *Blastocerus dichotomus* (Polegato et al., 2018).

Quando comparadas as concentrações médias de metabólitos de progestágenos fecais excretados por cada uma das fêmeas, percebe-se que a fêmea Pitanga, alojada no NUPECCE, apresentou valores inferiores aos apresentados pelas outras fêmeas. Além dela estar em um ambiente totalmente diferente das fêmeas do Zoológico de Cascavel, diversos fatores podem ter influenciado esses valores tão baixos.

Uma hipótese é a ausência da convivência contínua com um macho. Tendo em vista que as fêmeas do Zoológico de Cascavel estavam em um recinto coletivo com um macho e apresentaram valores mais altos de excreção de metabólitos de progesterona e, no NUPECCE, a fêmea só era exposta à presença do macho por um curto período de tempo, após detecção do estro comportamental. Sabe-se para várias espécies de mamíferos, que a presença ou proximidade de um macho induz as fêmeas a ciclarem (efeito macho). Outra hipótese é que o recinto fechado e o fato dela estar sozinha, não tendo contato com outras fêmeas, tenha influenciado essas concentrações mais baixas de progestágenos fecais excretados, em relação às fêmeas que viviam em grupo.

Blanvillain et al. (1997) e Pereira et al. (2005) observaram que a duração do ciclo entre fêmeas de outras espécies de cervídeos era influenciada pela presença de macho durante o experimento. Com base nesses relatos, supõe-se que a presença contínua de um macho durante o experimento pode ter influenciado os níveis de metabólitos fecais de progestágenos excretados. No

entanto, levando-se em consideração o número baixo de fêmeas monitoradas, é necessária a realização de mais estudos para testar esta hipótese.

A fêmea que emprenhou (Vermelha) apresentou um período gestacional de sete meses, confirmando a hipótese proposta por Mikich e Bérnils (2004), quando comparamos o período gestacional observado com outras espécies do mesmo gênero como *Mazama americana* e *M. gouazoubira*, que também possuem período gestacional de 7 meses em média (Duarte et al., 2012b; Pereira et al., 2005). Podemos observar que não há muita discrepância nas estratégias reprodutivas adotadas pelas fêmeas do mesmo gênero. Mesmo sendo um caso isolado, deve ser levado em consideração, pois como até o momento não temos conhecimento de trabalhos que monitoraram o período gestacional desta espécie (Abreu et al. 2009), este relato poderá ser utilizado como base.

Segundo Mikich e Bérnils (2004), os nascimentos da espécie concentram-se no período de setembro a fevereiro. Porém, nos registros de nascimentos no Zoológico de Cascavel de 2002 até 2019, constavam nascimentos em todos os meses do ano, indicando que, pelo menos em cativeiro no oeste do Estado do Paraná, a espécie não apresenta sazonalidade reprodutiva. A inexistência de sazonalidade reprodutiva em vida livre para outra espécie do gênero como *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro), foi relatada por Pinder e Leeuenberg (1997), que consideraram o fato de que como os locais habitados pela espécie geralmente não sofrerem períodos críticos de escassez de recursos alimentares, ou dos itens que compõem estes recursos poderem ser substituídos por outros, esses poderiam reproduzir durante todo o ano.

CONCLUSÕES

Este estudo validou com sucesso o método de monitoramento de progestágenos fecais, associado à análise comportamental, para caracterização do ciclo estral em *Mazama nana*.

Foram determinados a duração média (\pm DP) do ciclo estral $23,9 \pm 1,7$ dias e do estro comportamental, bem como as concentrações médias (\pm EPM) de progestágenos fecais por ensaio imunoenzimático para a fase luteal $6.183,0 \pm 2.268,7$ (ng/g) e para fase inter-luteal de $754,5 \pm 216,1$ (ng/g) para *Mazama nana*.

Uma das fêmeas apresentou um período gestacional de aproximadamente sete meses, o que, mesmo se tratando do relato de um caso, trata-se de um registro importante para *Mazama nana*.

REFERÊNCIAS

Abreu, C. O.; Martinez, A. C.; Moraes, W.; Juvenal, J. C.; Moreira, N. **Características reprodutivas de veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*)**. Pesq. Vet. Bras. 29 (12):993-998. 2009.

Abril, V. V.; Duarte, J. M. B. **Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae)**. Genetics and Molecular Biology. vol.31 n.1 São Paulo. 2008.

Adam CL, Moir CE, Atkinson T. **Plasma concentrations of progesterone in female red deer (*Cervus elaphus*) during the breeding season, pregnancy, and anoestrus**. J Reprod Fertil. 75:631–6. 1985.

Asher GW. **Oestrous cycle and breeding season of farmed fallow deer, *Dama dama***. J Reprod Fertil. 75:521–9. 1985.

Blanvillain, C.; Berthier, J. L.; Bomsel-Demontoy, M. C.; Sempe´re´, A. J.; Olbricht, G.; Schwarzenberger, F. **Analysis of reproductive data and measurement of fecal progesterone metabolites to monitor the ovarian function in the pudu, *Pudu puda* (Artiodactyla, Cervidae)**. Mammalia. 61:589–602. 1997.

Bressan, P. M.; Kierulff, M. C. M.; Sugieda, A. M. **Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo. 2009.

Brown, J. L. **Wildlife Endocrinology Manual – “Manual de endocrinologia para avaliação hormonal de espécies selvagens”**. Smithsonian National Zoological Park, Conservation and Research Center (Publicação interna). p. 65. 2008.

Brown, J.; Walker, S.; Steinman, K. **Endocrine Manual for the Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species**. 2nd ed. Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Manual. p. 93. 2004.

Chapple, R. S.; English, A. W.; Mulley, R. C. **Characterization of the oestrous cycle and duration of gestation in chital hinds (*Axis axis*)**. Journal of Reproduction and Fertility. p. 23-26. 1993.

Conde, D. A.; Flesness, N.; Colchero, F.; Jones, O. R.; Scheuerlein, A. **An emerging role of zoos to conserve biodiversity**. Conservation. Science. 2011.

Duarte, J. M. B.; Braga, F. G.; Vogliotti A.; Abril, V. V.; Piovezan, U.; Reis, M. L.; Ramos, H. G. C.; Zanetti, E. S. **Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de extinção**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBIO, 2012, 128 p. c.

Duarte, J. M. B.; Vogliotti, A.; Zanetti, E. S.; Oliveira, M. L.; Tiepolo, L. M.; Rodrigues, L. F.; Almeida, L. B. **Avaliação do risco de extinção do veado-mateiro *Mazama americana* Erxleben, 1777, no Brasil**. Biodiversidade Brasileira, v. 2, n. 3, p. 33-41, 2012 b.

Duarte, J.M.B., Abril, V.V., Vogliotti, A., Zanetti, E.S., Oliveira, M.L., Tiepolo, L.M., Rodrigues, L.F. e Almeida, L.B. **Avaliação do risco de extinção do veado-bororó *Mazama nana* Hensel, 1872, no Brasil**. Biodiversidade Brasileira. Iperó-SP. 2012 a.

Duarte, J.M.B., Merino, M.L. **Taxonomia e Evolução**. In: Duarte, J.M.B. (Ed.), Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. FUNEP, Jaboticabal, p. 1–21. 1997.

Graham, L.; Schwarzenberg, F.; Mostl, E.; Galama, W.; Savage, A. **A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum**. Zoo Biology 20:227–236. 2001.

Hernandez-Jauregui, D. M. B. Maldonado, F. G. Perez, R. A. V. Pardo, M. R. Aluja, A. S. **Cortisol in saliva, urine, and feces: non-invasive assessment of wild mammals.** Veterinaria México. v. 36. n. 3. p. 325-337. 2005.

Huamám, D. J. G. **Avaliação de protocolos de superovulação em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*).** Dissertação – (Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal. 2008.

Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais das espécies ameaçadas (IUNC). *Mazama nana*. 2015. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/29621/0>>. Acesso: 20/01/2019.

Liu, B. T.; Cheng, S. P.; Huang, M. C.; Yu, J. Y. L. **Serum progesterone changes in luteal cyclicity and duration of estrous cycle in Formosan sika deer (*Cervus nippon taiouanus*).** Zoological Science. v. 19. p. 1033-1037. 2002.

Micheletti, T.; Brown, J. L.; Walker, S. L. **Monitoramento hormonal não invasivo.** In: Cubas, Z. S., Silva, J. C. R.; Catão-Dias, J. L. 2ª edição. Tratado de Animais Selvagens. São Paulo: Roca, 2014.

Mikich, S.B. & R.S. Bérnils. 2004. **Livro vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná.** Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná. CD-ROM.

Molina-García, L.; Pérez, J. M.; Sarasa, M.; Urenã-Gutiérrez, B.; Espinosa, J.; Azorit, C. **HPLC-QTOF method for quantifying 11-ketoetiocholanolone, a cortisol metabolite, in ruminants feces: optimization and validation.** Ecology and Evolution. 2018.

Monfort, S. L.; Wemmer, C.; Kepler, T. H.; Bush, M.; Brown, J. L.; Wildt, D. E. **Monitoring ovarian function and pregnancy in Eld’s deer (*Cervus eldi thamin*) by evaluating urinary steroid metabolite excretion.** Journal of Reproduction and Fertility. Cambridge. 1990.

Oliveira, M. L. **Distribuição e estimativa populacional do veado-mão-curta (*Mazama nana*) utilizando amostragem não invasiva.** 2015. 61p. Tese – (Ecologia Aplicada) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba. 2015.

Palme, R.; Touma, C.; Arias, N.; Dominchin, M. F.; Lepschy, M. **Steroid extraction: Get the best out of faecal samples.** Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicina Austria. 2013.

Pereira, R.J.G.; Polegato, S.S.; Negrão, J.A.; Duarte, J.M.B. **Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites.** Theriogenology 65 387–399. ELSEVIER. 2005.

Pinder L. & Leeuwenberg F. 1997. **Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fisher 1814).** p.60-68. In: Duarte J.M.B. (Ed.), Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. Funep, Jaboticabal, SP.

Polegato, B. F. **Determinação dos perfis de estrógenos e progestinas fecais durante o ciclo estral, gestação e período pós-parto em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em cativo.** 2008. 74p. Dissertação – (Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal. 2017.

Polegato, B. F.; Zanetti, E. S.; Duarte, J. M. B. **Monitoring ovarian cycles, pregnancy and post-partum in captive marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) by measuring fecal steroids.** Conservation Physiology. 2018.

Polegato, B. F.; Pereira, R. J. G.; Souza, S.; Burcius, L. C.; Santos, G. L.; Negrão, J. A.; Duarte, J. M. B. **Caracterização reprodutiva em fêmeas de veado catingueiro (*Mazama***

gouazoubira) sob condições de cativeiro. In: VIII Congresso e XIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. 2004. Jaboticabal. Anais VIII Congresso e XIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. P.81. Jaboticabal: Funep. 2004.

Schwarzemberger, F; Möstl, E.; Palme, R.; Bamberg, E. **Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild, and zoo animals.** Animal Reproduction Science. v. 46. n. 1-4. p. 515-526. 1996.

Thompson KV, Mashburn KL, Monfort SL. **Characterization of estrous cyclicity in the Sable Antelope (*Hippotragus niger*) through fecal progestagen monitoring.** Gen Comp Endocrinol.112:129 –37. 1998.

Tossulino, M. G. P.; Patrocínio, D. N. M.; Campos, J. B. **Fauna do Paraná em extinção.** 272p. Instituto Ambiental do Paraná. Curitiba. 2006.

Vogliotti, A. **Partição de habitats entre os cervídeos do Parque Nacional do Iguaçu.** 2008. 73p. Tese – (Ecologia aplicada) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba. 2008.