

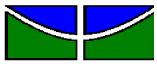


**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**USO DE ACETATO DE MELENGESTROL (MGA) ORAL COMO PROTOCOLO DE  
SINCRONIZAÇÃO DE CIO EM VEADO CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)**

Ana Carolina Lourenço Faillace  
Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato  
Co-orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

BRASÍLIA - DF  
JULHO/2016



**ANA CAROLINA LOURENÇO FAILLACE**

---

**USO DE ACETATO DE MELENGESTROL (MGA) ORAL COMO PROTOCOLO DE  
SINCRONIZAÇÃO DE CIO EM VEADO CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)**

Trabalho de conclusão de curso de  
graduação em Medicina Veterinária  
apresentado junto à Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília

**Orientador:** Prof. Dr. Ivo Pivato

**Co-orientador:** Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

BRASÍLIA - DF

JULHO/2016

Faillace, Ana Carolina Lourenço

Uso de acetato de melengestrol (MGA) oral como protocolo de sincronização de cio em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*). / Ana Carolina Lourenço Faillace; orientação de Ivo Pivato; co-orientação de José Maurício Barbanti Duarte.

– Brasília, 2016.

53 p.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2016.

### **Cessão de direitos**

Nome do Autor: Ana Carolina Lourenço Faillace

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Uso de acetato de melengestrol (MGA) oral como protocolo de sincronização de cio em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*).

Ano: 2016

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

(Assinatura)

---

Nome do Autor

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: FAILLACE, Ana Carolina Lourenço

Título: Uso de acetato de melengestrol (MGA) oral como protocolo de sincronização de cio em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*).

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em 21/06/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a *todos* meus professores e mentores, que sem cada um deles não teria atingindo meu sonho de ser médica veterinária. Em especial o Prof. Dr. Ivo Pivato, meu orientador e professor, sempre querido por todas as turmas da Vet.

Agradeço a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia por ter me acolhido durante três meses para aprender técnicas laboratoriais e aprimorar meus conhecimentos de reprodução animal. Aos mestrandos e doutorandos que me auxiliaram durante todo o estágio. Em especial minha supervisora, Dr. Margot Alves Nunes Dode, pesquisadora que respeito imensamente.

Agradeço a UNESP Jaboticabal e ao NUPECCE, por terem me aceitado e oferecido todo o apoio e material para o experimento. Um grande abraço à família NUPECCE.

Agradeço a toda minha família, em especial meus pais e *bros*, oferecendo apoio quando se mais precisa.

Agradeço aos meus amigos e ao barbudo, com dicas de culinária e sugestões de atividades para gastar o tempo que eu não tinha.

Agradeço aos meus companheiros peludos, quer em casa ou nos locais de trabalho. E pelas horas gastas comendo banana.

*Todos são gênios. Mas,  
se você julgar um peixe por sua habilidade  
de escalar uma árvore  
ele vai viver sua vida inteira  
acreditando que é estúpido.*

-Albert Einstein

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
PARTE I - EXPERIMENTO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVO.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
5. RESULTADOS.....	9
6. DISCUSSÃO.....	10
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	13
PARTE II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO .....	14
8. INTRODUÇÃO.....	14
9. DISCUSSÃO.....	16
9.1 Laboratório de FIV.....	17
9.1.1 Maturação ovocitária.....	18
9.1.2 Preparo para maturação <i>in vitro</i> (MIV) .....	19
9.1.3 Preparo para a fecundação <i>in vitro</i> (FIV) .....	20
9.1.4 Preparo para o cultivo <i>in vitro</i> (CIV) .....	21
9.2 Laboratório de Fixação.....	21
9.2.1 Avaliação da cinética de maturação do ovócito.....	22
9.2.2 Coloração de HOECHST 33342.....	23

9.2.3 Colorações espermáticas.....	24
9.3 Laboratório de Clonagem.....	25
9.3.1 Preparo da célula doadora de núcleo.....	25
9.3.2 Clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS).....	26
9.4 Laboratório de Biologia molecular.....	28
9.4.1 Protocolo de extração de DNA pelo método <i>Salting Out</i> .....	29
9.5 Fazenda Sucupira.....	30
9.5.1 Coleta de embriões em ovelhas.....	30
9.5.2 Transferência de embriões (TE) em bovinos.....	31
9.5.3 Coleta de sêmen.....	33
9.5.4 Congelamento de sêmen.....	34
9.5.5 Exame de brucelose e tuberculose em bovinos.....	36
10.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
11.REFERÊNCIAS .....	39



## RESUMO

O veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*) é uma espécie de cervídeo neotropical que habita áreas ao sul da floresta Amazônica. Os grupos populacionais estão diminuindo devido, principalmente, a ações antrópicas, sendo necessário a conservação desta espécie através, por exemplo, de biotécnicas da reprodução. Neste trabalho, foi proposto um protocolo de sincronização de cio em catingueiros, usando o acetato de melengestrol (MGA). Seis fêmeas saudáveis e sexualmente maduras foram submetidas a uma dose diária oral de 0,25 mg de MGA por oito dias consecutivos, sendo que no último dia foi aplicada uma injeção intramuscular de 265 µg de cloprostenol. O cio foi testado com um macho duas vezes ao dia, por até cinco dias consecutivos após a dose de clorprostenol. Apenas metade das fêmeas apresentaram cio dentro do tempo estipulado de até cinco dias após fim do tratamento. Entretanto, é sugestivo que a ocorrência do cio tenha sido pela aplicação de prostaglandina, não do MGA. Mais estudos devem ser realizados sobre sua metabolização, frequência e dosagem de MGA oral em veados catingueiros para confirmar sua possível utilização como protocolo de sincronização de cio.

**Palavras-chave:** *veado catingueiro, Mazama gouazoubira, biotécnicas, sincronização, acetato de melengestrol, MGA.*

## ABSTRACT

The brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) is a species of neotropical deer, which inhabits areas south of the Amazon Rainforest. Due to a decrease in its population, mainly because of human activity, this species' conservation is a priority. One method to help increase population size would be the use of reproductive biotechnology techniques. A synchronization protocol for the brown brocket deer was proposed in this experiment, using melengestrol acetate (MGA). Six healthy females, all sexually matured, were submitted to an oral dose of 0,25 mg of MGA in a 24 hour interval for eight consecutive days. On the eighth day, a 265 µg injection of cloprostenol sodium was applied to those females. Twice a day, the females were individually introduced to a male of the same species, to test for estrous behavior. Estrous was tested for five consecutive days post treatment. Only half of the does showed signs of estrous. It is highly suggestive that such behavior occurred due to the cloprostenol injection, not the MGA itself. More studies are required to test the pharmacokinetics, metabolization, frequency and dose of oral MGA in brown brocket deer in order to confirm this molecule use in an estrus synchronization protocol.

**Key words:** *Brown brocket deer, Mazama gouazoubira, melengestrol acetate, MGA, synchronization.*

## PARTE I - EXPERIMENTO

### 1. INTRODUÇÃO

A fragmentação de habitat levando a isolamentos populacionais e homozigose por endocruzamento, poluição e ação do homem são as principais causas de perda de indivíduos e de parte de populações de diferentes espécies animais (DUARTE, 2005; BUENO & PEREIRA, 2008; COSTA & MARTINS, 2008). Em decorrência da menor variabilidade genética ocorrem diminuições de resistência a enfermidades, da capacidade de reprodução e adaptabilidade, resultando em um vórtex de extinção.

A extinção é um processo natural da evolução, mas devido às ações antrópicas, esse processo está ocorrendo de maneira acelerada. A conservação é necessária para manter a biodiversidade. Uma das formas de se tentar diminuir as perdas genéticas é através de técnicas da reprodução. Mas, para poder aplicar essas técnicas corretamente, é imperativo conhecer aspectos biológicos da espécie alvo, tais como comportamento, alimentação, distribuição geográfica, ecologia, endocrinologia e fisiologia. Para tal, a existência de espécimes em cativeiro é de suma importância para estudos complementares.

A chamada conservação *in situ*, ou seja, quando o indivíduo se encontra em seu habitat natural, é o método ideal. Infelizmente ele é praticamente inviável, pois necessita de vários fatores como estudo da espécie, educação ambiental e preservação da área de vida da espécie para que tenha bons resultados.

Já, a *ex situ*, utilizando animais em cativeiro, é a mais viável a curto prazo e com resultados mais imediatos. No entanto, apesar de os dois métodos de conservação se complementarem, estudos biológicos, manejo de áreas verdes e projetos de reintrodução são condições necessárias para o sucesso.

Existem diversas técnicas para reprodução de animais de produção. Estas podem ser extrapoladas para as espécies selvagens até certo ponto. As mais comumente utilizadas para conservação de espécies são a inseminação artificial,

aspiração folicular, coleta de sêmen e criopreservação de gametas e células somáticas em botijões de nitrogênio líquido (COSTA & MARTINS, 2008). O primeiro clone de cervídeo foi anunciado pela Texas A&M University em 2003, onde o indivíduo foi gerado através de células de fibroblasto de um veado da cauda branca que veio à óbito. Contudo, o maior desafio da técnica de clonagem é a escolha da espécie que irá prover a célula receptora e que espécie irá gestar o novo indivíduo. Os animais mais beneficiados com projetos de conservação são os considerados ameaçados, em extinção e extintos na natureza.

A espécie escolhida para o experimento, o veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), é um cervídeo (Ordem Artiodactyla, Subordem Ruminantia) de pequeno à médio porte (18 a 20 kg), distribuído nas áreas ao sul da floresta Amazônica, até o sul do Uruguai e na Província de Entre Rios, na Argentina. Pertence a habitat variados, desde cerrado até áreas abertas usadas para agricultura (BLACK-DECIMA et al., 2010).

Na lista vermelha da INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN) (2016), uma organização civil dedicada à conservação da natureza e internacionalmente reconhecida, está classificada como pouco preocupante, mas seu status varia dentro do Brasil, descrito como ameaçado no estado do Rio de Janeiro e vulnerável o Rio grande do Sul (TIEPOLO & TOMAS, 2006). O status da população é descrito pela IUCN (2016) como decrescente.

O ciclo estral das fêmeas é considerado similar dentre as diferentes espécies de mamíferos. É composto de 4 fases: proestro, estro, metaestro e diestro. Animais em anestro não estão em fase reprodutiva. O GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina), liberado pelo hipotálamo, atinge a hipófise através do sistema porta hipofisário e estimula a secreção de FSH e LH (hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante, respectivamente). Estas moléculas atingem os ovários. O FSH induz o surgimento de uma onda folicular e desenvolvimento folicular. Um dos folículos recrutados torna-se dominante e os outros entram em atresia. Enquanto isso, o LH permanece em um limiar basal, com poucos picos sutis. Quando o folículo se torna dominante, ele produz estrógeno (E2) e inibina, que levam a resposta de feedback negativo diminuindo a produção de FSH e

levando a atresia dos outros folículos recrutados na onda. Caso não haja progesterona (P4), o estrógeno produzido pelo folículo induz a um pico significativo de LH, levando a ovulação. Há a luteinização das células foliculares, que produzem P4, responsável pela manutenção da prenhez. Durante a produção de P4, ainda há surgimento de ondas foliculares, mas não há o estímulo para a ovulação devido a alta concentração de P4, levando a atresia dos folículos. Após alguns dias, caso não haja gestação, o corpo lúteo (CL) começa a produzir ocitocina, que estimula o endométrio a secretar prostaglandina (PG). Esta lisa o CL, dando um fim ao ciclo estral.

O acetato de melengestrol (MGA) foi criado em 1962. É uma molécula oralmente ativa, inclusive em ruminantes, sendo sua ação relacionada com espessamento do endométrio, manutenção de gravidez e inibição do cio (PATTERSON et al., 1989). É considerado um análogo á progesterona, podendo ser usado em protocolo de inseminação (OLIVEIRA et al., 2013) e como método anticoncepcional (PLOTKA & SEAL, 1989; ROUGHTON, 1979), dependendo da dose oferecida. Por ser de uso oral, é considerada uma boa alternativa para impedir estresse nos animais durante a manipulação, uma vez que elevados níveis de estresse alteram a fisiologia do animal.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Cervídeos são considerados poliéstricos sazonais, mas, devido a adaptação de algumas dessas espécies as regiões tropicais, onde o foto período não é tão variado, são férteis o ano todo. A presença de cio pós-parto nas fêmeas e a falta de alterações morfofisiológicas do sêmen de machos após a queda de chifre, ou seja, boa qualidade espermática (GARCIA & DUARTE, 1994) suportam a falta de sazonalidade em *Mazama gouazoubira*. Entretanto, foi observada certa sazonalidade em animais de áreas mais temperadas (DUARTE & GARCIA, 1997). A gestação do catingueiro é de 208 a 215 dias, a duração do ciclo estral é em média 21 a 30 dias e o tempo de cio varia de 1 a 4 dias (PEREIRA et al., 2006).

A molécula de MGA é um progestágeno com efeito antigonadotrófico. É um análogo ao MAP (acetato de medroxiprogesterona). Ele age diminuindo a pulsatilidade do GnRH liberado pelo hipotálamo, contudo, não impede o crescimento folicular, levando os folículos a permanecerem no folículo por um tempo maior (OLIVEIRA et al., 2013). Ele também diminui a pulsatilidade do LH, impedindo a ovulação (IMWALLE, 1998; INWALLE, 2002). Ao aplicar o cloprostenol e cessar a administração do MGA, há uma queda abrupta de progesterona, levando a um aumento na frequência de picos de LH e consequente ovulação, iniciando uma nova fase folicular.

Os efeitos do MGA oral são completamente dependentes da dose e tempo de duração do protocolo. Em vacas, a dose mínima diária necessária para impedir a ovulação é de 0,42 mg (a recomendada pelo produtor é de 0,5 mg por animal por dia). Em ovinos e caprinos, a dose é de 0,25mg. Quanto mais tempo dura o protocolo (mais que 14 dias) piores são as taxas de fertilidade no primeiro estro pós-tratamento (PATTERSON et al., 1989). Essa baixa fertilidade em protocolos de longa duração se dá pelo fato de os ovócitos presentes nos folículos ficarem muito velhos, perdendo sua qualidade, e pela possível persistência de folículos, devido à falta de pico de LH (OLIVEIRA et al., 2013).

Em um estudo *in vitro* com células bovinas, PERRY (2005) demonstrou que a molécula de MGA, quando comparado com progesterona e norgestomet, tem uma maior afinidade pelo receptor de progesterona do que a própria progesterona e menos que o norgestomet. Contudo, quando comparado com a capacidade de reprogramar o ciclo reprodutivo, o MGA é o menos eficaz. Ainda não se sabe por que apesar de ter uma boa afinidade, o MGA não é tão eficaz em induzir o cio. Ainda neste estudo, Perry demonstrou que o MGA não possui ação celular antiestrogênica (diminuição da proliferação celular).

Em ovelhas, DANIEL (2000) fez dois experimentos com MGA. Após o fim de cada tratamento as fêmeas eram expostas ao macho duas vezes ao dia por 21 dias. No primeiro experimento ele comparou quatro grupos, um controle (somente ração), um grupo que recebeu duas doses de 0,125mg de MGA diárias por 8 dias, um que recebeu uma dose única de 0,5mg em um único dia e o último

onde foi dado uma dose única de progesterona via intramuscular. Ele relatou que os animais que foram tratados com MGA por oito dias tiveram uma maior taxa de prenhez quando comparado com os outros. No segundo experimento, ele comparou três grupos, sendo um controle, um com a mesma dose de MGA que o experimento um e o último com CIDR por 8 dias seguidos. Os grupos tratados com MGA e o implante apresentaram estro, sendo que os do grupo CIDR demonstraram comportamento de cio mais cedo. O grupo do implante teve maior taxa de prenhez que o do MGA.

QUISPE (1995) testou em quatro grupos de ovinos duas doses diferentes (0,11mg e 0,22mg) de MGA oral por nove dias consecutivos, associadas ou não a uma aplicação de cipionato de estradiol (ECP) no primeiro dia do tratamento. Ele concluiu que o uso de MGA oral foi satisfatório para sincronização, mas a aplicação de ECP pareceu ter efeito negativo sobre as taxas de concepção.

PLOTKA & SEAL (1989) fizeram uso dessa substância em implantes subdérmicos, na região do pescoço, em uma dose alta de 800mg por animal, a fim de fazer o controle populacional em veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus borealis*). O projeto durou dois anos e foi considerado um método simples e eficaz como anticoncepcional. O implante também foi posto em animais gestantes, e, apesar de não ter afetado diretamente a prenhez (o que era de se esperar), afetou o tempo de indução de parto, sendo necessário a remoção do implante e aplicação de 5mg de cipionato de estradiol intramuscular. Dos cinco animais paridos, apenas um sobreviveu e uma fêmea veio à óbito no trabalho de parto.

ROUGHTON (1979) também fez uso do MGA como método contraceptivo em veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) mantidos em cativeiro. Neste estudo o suplemento foi oferecido oralmente, em doses diárias variando de 0,6 a 1,0 mg por animal durante 12 meses consecutivos. Tanto machos como fêmeas eram suplementados com a substância. Não foi observado nenhuma alteração em crescimento e maturidade sexual nos filhotes. Não houve alteração durante a prenhez, como a duração da gestação ou problemas durante a indução e o parto.

Em uma revisão de métodos para sincronizar o cio em cabras, WHITLEY & JACKSON (2004) citam a eficácia do MGA em ovelhas, resultados bem diferentes quando comparado em cabras. Os autores comentam a escassa quantidade de estudos feitos em cabras e, dos poucos revisados, demonstram que o MGA oral tem uma capacidade menor de induzir estro nessa espécie quando fora do período reprodutivo. Os autores argumentam que o ambiente (clima) e a genética são fatores que podem ter influenciado os resultados. Recomendam mais estudos relacionados ao uso do MGA oral em cabras.

ZANETTI (2009) testou um protocolo de sincronização de cio em veados catingueiros. Em um grupo ela usou um implante progestágeno vaginal (CIDR®) por oito dias e no dia da remoção do implante, aplicou de uma dose de 265µg de cloprostenol. Este foi então comparado com um segundo grupo de animais que foi sincronizado com duas doses de cloprostenol, com 11 dias de intervalo entre elas. A presença do cio foi confirmada através do comportamento estral com o macho. Em suma, todos os animais (n=6) entraram em cio. A diferença entre os grupos foi em tempo de indução do cio, que foi de  $70.5 \pm 5.0$  h no primeiro grupo e de  $52.3 \pm 5.6$  h no segundo grupo.

Em *Mazama gouazoubira*, ROLA (2013) testou a viabilidade de protocolos de superovulação, realizou aspiração folicular (através de laparoscopia) e maturação *in vitro* (MIV). Durante o experimento foram recuperados um total de 94 ovócitos. Estes foram então maturados *in vitro* onde 64,52% alcançaram a fase MII. Os resultados demonstram a viabilidade da técnica de MIV em veados catingueiros, bem como abre portas para a possibilidade de fecundação, cultivo e consequente produção *in vitro* de embriões (PIVE). Há relatos de sucesso na MIV em outras espécies de cervídeos, entretanto, há alguns obstáculos com a PIVE, como o desenvolvimento de um fluido de oviduto sintético de cervídeos para aumentar a taxa de blastocistos.



### 3. OBJETIVO

- Testar a capacidade que uma dose única diária de 0,25 mg de acetato de melengestrol oral administrada por oito dias consecutivos tem de sincronizar o cio em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*).

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, NUPECCE, na Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' Campus de Jaboticabal (UNESP Jaboticabal).

Um total de seis fêmeas adultas de veado catingueiro, com idades variando de três a dez anos, foram submetidas ao protocolo de sincronização de cio por MGA oral. Os dois machos usados para a detecção de estro tinham idade variando de quatro a seis anos. A dieta era a base de ração concentrada para equinos (Omolene®) duas vezes ao dia e volumoso - soja (*Glycinemax* spp.) ou rami (*Bohemia livia*) ou ramos de amoreira (*Morus alba*) à tarde. Água à vontade.

Os animais eram mantidos em baias individuais de 3x4 metros e paredes de cimento para evitar contato direto com a outra baia ou o galpão. O chão da baia era forrado com feno para conforto dos animais. Todas as baias estavam dentro de um galpão fechado e coberto.

Antes de dar início ao protocolo, as fêmeas foram introduzidas com um dos machos para identificação de cio. A presença ou ausência de cio não influenciou a data de início do protocolo, que foi iniciado em estágios aleatórios do ciclo estral.

Os sinais apresentados pela fêmea em cio eram o comportamento geral mais relaxado e reflexo de tolerância (apoiar a mão na traseira do animal e este permanecer estático). É incomum apresentar corrimento mucoide visível nesta espécie. O edemaciamento vulvar é visível, e até palpável em animais mais calmos. Os machos testavam o cio se aproximando das fêmeas, lambendo e

cheirando especialmente a região posterior e o dorso, realizando o reflexo de flehmen e tentativa de monta.

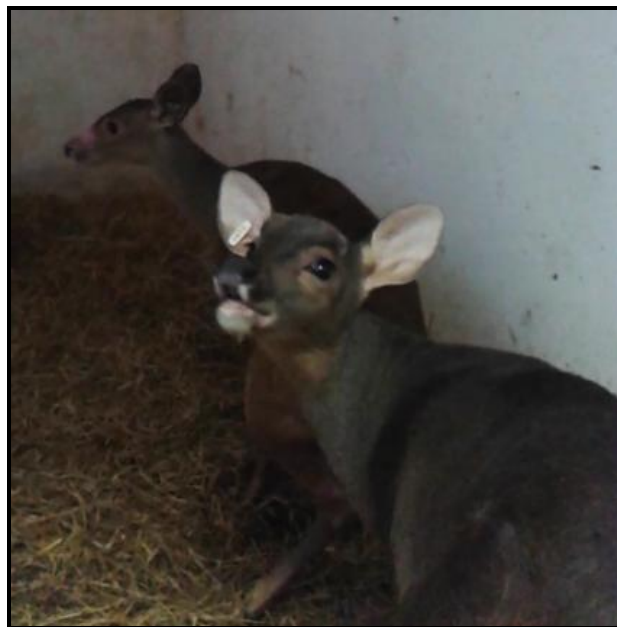


FIGURA 1 – Macho de veado catingueiro demonstrando o reflexo de flehmen.

Fonte: arquivo pessoal.

Para realizar a sincronização, as fêmeas recebiam uma dose única diária de 1,14g de Premix, contendo 0,25mg de MGA (misturada com banana para facilitar o consumo e dado pessoalmente para cada animal para garantir a ingestão total) por 8 dias seguidos, oferecido na parte da manhã. No dia da última dose de MGA, foi aplicado 265 $\mu$ g (1 mL) de cloprostenol (análogo a prostaglandina – PG) ao final do dia.

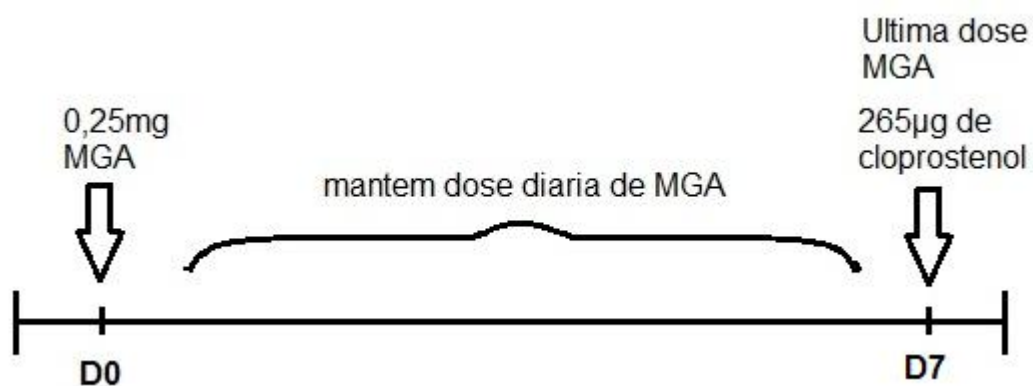


FIGURA 2 – Esquematização do protocolo usado nas fêmeas de veado catingueiro.

Para a identificação do cio, foi permitido contato com um dos dois machos adultos e observado o comportamento dos indivíduos. Foi permitido o contato com o macho diariamente, durante todo período do tratamento, até a identificação do cio ou no máximo cinco dias após o fim do protocolo. Os encontros do macho com as fêmeas eram feitos um por um, onde a fêmea era conduzida até a baía do macho e permitido contato duas vezes ao dia (manhã e tarde), por até dez minutos (ZANETTI, 2009). O cio foi confirmado se a fêmea permitiu a cópula (PEREIRA et al., 2006). O cio era esperado dentro de 24 - 72 horas após o fim do tratamento (ZANETTI, 2009; GARCIA & DUARTE, 1995). Foi estipulado um tempo máximo de observação de cio, sendo este de cinco dias após a aplicação de cloprostenol.

## 5. RESULTADOS

Devido ao reduzido número de animais, somente a porcentagem e a média foram usadas na interpretação dos dados. O tempo de aparecimento do cio, bem como seu tempo de duração foram coletados. O nível de fertilidade não foi testado neste protocolo.

TABELA 1 – Tempo de demonstração e de duração do cio pós tratamento em fêmeas de veado catigueiro.

	Demonstração do cio (horas)	Duração cio (horas)	Idade aproximada (anos)
Fêmea 1	108	24	10
Fêmea 2	-	-	6
Fêmea 3	-	-	7
Fêmea 4	48	36	8
Fêmea 5	-	-	3
Fêmea 6	36	48	3

## 6. DISCUSSÃO

O uso de MGA oral não foi satisfatório para induzir e sincronizar o cio em todas as fêmeas. A eficiência média do protocolo foi de 50%, ou seja, somente metade das fêmeas apresentaram cio dentro do limite de cinco dias pós fim do tratamento.

Em animais tratados com uma dose única de PG, é possível atingir 50% de sincronização. Isso porque animais em anestro ou com CL não responsivo não respondem a esse tratamento. A fase luteínica do ciclo estral de *Mazama gouazoubira* é, em média, 24 dias e a interluteal, dois dias (LOCATELLI & MERMILLOD, 2005). O CL torna-se responsivo a partir do sexto dia pós-ovulação, ou seja, em um ciclo normal de 26 dias, 18 dias o animal estaria responsivo ao efeito da prostaglandina. Neste estudo, é provável que os animais que apresentaram cio tenham sofrido efeito do cloprostenol, não do MGA, pois animais sob o efeito da PG apresentam cio, em média, de 48 a 72 horas pós aplicação. Para confirmar que o MGA estaria fazendo efeito, seria necessário fazer dosagens duas vezes ao dia de progesterona fecal começando um dia antes

e terminando até cinco dias após o fim do protocolo. Apesar das fezes terem sido devidamente coletadas e armazenadas, devido ao curto período de tempo disponível, não foi possível processar o material antes da conclusão do experimento.

A fêmea 1, que demonstrou cio 108 horas após o fim do protocolo, provavelmente não sofreu efeito de nenhum dos hormônios administrados, entrando no cio espontaneamente.

Apesar de não ter sido possível neste trabalho medir a concentração de progesterona fecal para confirmar a ação do MGA sobre o ciclo estral das fêmeas, nenhum dos animais apresentou comportamento de cio durante o tratamento, sugerindo que houve uma supressão de demonstração de cio pelo MGA. Há também a possibilidade de ter ocorrido cio silencioso, devido a uma subdose de acetato de melengestrol.

A meia vida do MGA em bovinos é de 24 horas, pela recomendação do fabricante de oferecer a dose uma vez ao dia. Não há estudos que mostrem que esse mesmo tempo se aplica a cervídeos. A dose de 0,25 mg por animal por dia foi extrapolada da dose de ação em caprinos e ovinos, não havendo certeza de seu efeito real sobre a espécie alvo.

Há vários estudos em ruminantes domésticos demonstrando os efeitos negativos que protocolos de longa duração baseados no MGA oral tem sobre a fertilidade do animal. Contudo, é provável que este efeito também ocorra em cervídeos. O tempo de duração do protocolo provavelmente não teve influência sobre a eficiência da sincronização.

No presente estudo, a causa mais provável de falha da sincronização foi ou dosagem muito baixa ou intervalo entre doses insuficiente (metabolização rápida, meia vida curta). Não há publicações sobre o uso dessa substância como protocolo de sincronização de cio em veado catigueiro, logo não há informações suficientes para afirmar a ação real deste progestágeno nesta espécie.

Com relação aos próprios animais, diversos fatores podem ter influenciado o tempo de aparecimento do cio, como a idade (não parece ter tido relação com o aparecimento do cio), se são nulíparas ou pluríparas, metabolismo e tempo de passagem rumenal. Um fator importante do experimento foi o pequeno número de animais disponíveis para testar o protocolo (n=6) e a falta de repetições.

O MGA é comumente associado com outras substâncias como estradiol ou cipionato de estradiol, LH, hCG, eCG e ocitocina, que visam sincronizar as ondas foliculares e melhorar a qualidade do folículo (MORAES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013), impedindo a baixa taxa de fertilidade no primeiro cio pós-tratamento.

A sincronização do cio é um instrumento importante para outras técnicas de reprodução como inseminação artificial, transferência embrionária e aspiração folicular. Ela já foi descrita em cervídeos com uso de progestágenos provenientes de implantes intravaginais (Esponjas caseiras, CIDR) (DUARTE & GARCIA, 1997; ZANETTI, 2009) ou subcutâneos auriculares (CRESTAR®). Até o momento da execução desse experimento, nenhum estudo com o uso de MGA oral como protocolo de sincronização foi relatado em *M. gouazoubira*.

O uso de biotécnicas da reprodução como ferramenta de conservação é muito discutida, mas relativamente pouco usada. Cada espécie é completamente diferente da outra, sendo difícil extrapolar protocolos e técnicas usadas em animais domésticos para os selvagens. Deve-se ter a biologia da espécie muito bem descrita e estudada para que haja sucesso nas técnicas de multiplicação de indivíduos.

Há relatos bem sucedidos do uso de biotécnicas para ajudar o declínio populacional de uma espécie (inseminação artificial, produção *in vitro* de embriões), sendo o furão do pé preto um grande exemplo (HOWARD et al., 2003). Contudo, a maioria de relatos de artigos científicos são de uso de biotécnicas em animais domésticos. Wildt (2010) diz que dentre 12000 publicações de artigos em revistas de reprodução, somente 6% eram sobre mamíferos selvagens, 3% em peixes e menos de 1% para aves, répteis e anfíbios.

Outra arma poderosa é a formação de bancos de germoplasma. Essa técnica possibilita armazenar a genética de uma espécie, sem que o indivíduo ainda esteja vivo. Através do armazenamento de gametas, embriões e células somáticas, o material genético pode ser trocado com outras instituições para aumentar a variabilidade genética de uma população. Entretanto, são poucos os lugares que armazenam e fazem uso real do material contido nos bancos.

Juntamente com a conservação da espécie, deve-se conservar o habitat natural, pois sem um ambiente próprio para viver, não há uma boa expectativa de vida. De certa forma, pode-se dizer que a conservação *in situ* (preservar o habitat) e *ex situ* (preservar e multiplicar genética) são complementares.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nas condições do presente experimento, o resultado sugere que o protocolo não foi eficaz, sincronizando apenas metade das fêmeas dentro do tempo estipulado de cinco dias, sendo difícil afirmar se esse efeito foi pelo próprio MGA ou por ação do cloprostenol. Mais estudos sobre a farmacocinética, diferentes doses e maior ou menor intervalo entre doses em cervídeos devem ser realizados para confirmar ou não a real eficácia desse progestágeno em um protocolo de sincronização de cio em *Mazama gouazoubira*.

## PARTE II - RELATÓRIO DE ESTÁGIO

### 8. INTRODUÇÃO

O estágio curricular obrigatório foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, localizada em Brasília, DF. Ele teve início dia 1 de fevereiro de 2016, até o dia 29 de abril, totalizando três meses, sendo que durante esse tempo, ele foi dividido em duas partes: a laboratorial, na EMBRAPA, e a parte mais prática, por assim dizer, realizada no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, mais conhecido como Fazenda Sucupira.

O prédio da EMBRAPA, mais especificamente o prédio de biotecnologia (PBI) possuía mais laboratórios, infraestrutura e pessoal para realizar experimentos e rotinas. O Laboratório de Reprodução Animal (LRA) englobava diversos outros:

- Laboratório de Biologia Molecular: Onde eram realizados experimentos moleculares de extração e quantificação de DNA e RNA, através de PCR e PCR Real time e extrações de DNA e RNA.
- Laboratório de FIV: Onde os ovários provenientes de abatedouros eram recebidos para que seus folículos sejam aspirados, coletando os ovócitos e realizando os processos de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro*.
- Laboratório de Lavagem e Esterilização: Nele era realizada a lavagem de material e utensílios usados durante a rotina de todos os laboratórios, ou seja, vidrarias e materiais de plástico (placas, seringas, tubos) e alguns instrumentais como pinças. Grande parte do material era reciclada para diminuir os gastos totais.
- Laboratório de Clonagem: Uma vez os ovários aspirados no laboratório de FIV, alguns eram usados para a rotina da clonagem, onde o material sofria processos de maturação um pouco diferenciados, e outros processos que



serão descritos mais adiante para que a célula se torne viável para se tornar um clone.

- Laboratório de Preparo de Meios: Os meios eram, em sua maioria, armazenados em geladeiras e freezers presentes nessa sala. Alguns meios eram preparados. O Citômetro de Fluxo, um dos três únicos exemplares no Brasil, ficava nessa sala.
- Laboratório de Fixação: Era considerada a área suja. Nessa sala eram manipulados corantes e sêmen. Ela possuía um microscópio de fluorescência, um microscópio de contraste de fase e uma lupa.

Inicialmente, a cada semana deveria ter sido um dos laboratórios, mas por causa da época do ano em que o estágio foi realizado, poucos projetos estavam na fase experimental, reduzindo bastante a rotina dos laboratórios. Os locais que sempre tinham material para manipular eram os laboratórios de FIV e de clonagem, pois os ovários, fonte das células usadas nos estudos, chegavam de terça-feira à sexta-feira. Os ovários eram divididos entre os laboratórios, e, como a quantidade de material não é fixa, alguns dias não foi possível treinar os métodos de aspiração e maturação por falta de matéria prima.

O quadro a seguir mostra a quantidade de atividades realizadas durante todo o período de estágio.

QUADRO 1 – Atividades desenvolvidas no estágio curricular realizado na EMBRAPA Recursos genéticos e biotecnologia, Brasília/DF, de 01 de Fevereiro a 29 de Abril de 2016.

Atividades/Procedimentos	Quantidade aproximada (dias)
Aspiração folicular	44
Palpação retal	18
Cura de animais	25
MIV	3
FIV	3
CIV	3
Clonagem	2
Exame andrológico	15
Preparo de pipetas	3
Manejo de animais da fazenda	37
Journal Club	6

## 9. DISCUSSÃO

Cada laboratório possuía seu respectivo protocolo. Existia uma pessoa responsável que, na maioria dos casos, era um dos alunos de mestrado ou doutorado, que ficava com a tarefa de separar o material para ser usado na rotina, dentre outras funções. Como as células usadas na maioria dos laboratórios eram as mesmas, o início do protocolo era o mesmo para todos, ou seja, a etapa de aspiração folicular e rastreamento dos ovócitos.

Os ovários eram todos provenientes de abatedouros comerciais situados nas redondezas de Brasília. Eram coletados na parte da manhã, na linha de abate, e armazenados em potes de vidros previamente esterilizados, completados com solução salina 0,9% acrescida de antibióticos (penicilina, estreptomicina ou amicacina) e mantidos entre 32°C e 36°C. Desde a hora da coleta até a hora de manipulação, um período de 4 a 6 horas deve ser respeitado para que não comprometa a viabilidade celular. Ao chegar no LRA, os potes eram postos em banho-maria entre 34°C e 35°C. Os ovários eram, então, puncionados com agulha 14G acoplada em seringa de 10 mL. Somente os folículos entre três e oito milímetros de diâmetro eram puncionados. O líquido folicular aspirado era transferido para tubos falcon. O sobrenadante era centrifugado por cinco minutos a 700g. O pellet era transferido para uma placa junto com não mais de 10 mL de líquido folicular centrifugado, para que os complexos cumulus-ovócitos (CCOs) fossem rastreados. Os ovócitos foram classificados em graus de 1 a 5, onde 1 é o melhor. A classificação foi baseada na qualidade do citoplasma (homogêneo, grânulos pequenos e escuros) e na quantidade de camadas de células do cumulus. A partir dessa etapa, há pequenas diferenças que serão descritas mais a frente em seus respectivos tópicos.

### **9.1 Laboratório de FIV**

Devido à rotina, o laboratório de FIV foi o mais acompanhado. Os ovários eram de uso exclusivo de duas a três vezes por semana. O protocolo estava sempre à disposição do aluno para retirada de dúvidas.

São necessários vários passos para que todos os processos de maturação ovocitária, fecundação e cultivo embrionário tenham uma boa taxa de sucesso. Para isso, é de suma importância entender a fisiologia do ovócito durante cada fase *in vitro*.

### 9.1.1 Maturação ovocitária

Considerada uma das fases mais importantes de todo o processo. É através de mudanças morfológicas e bioquímicas que o ovócito se torna apto para ser fecundado, formar um embrião e se desenvolver em um indivíduo. *In vivo*, a foliculogênese ocorre dentro do folículo por ação hormonal. A ovulação acontece após o pico de LH. *In vitro*, no momento que o ovócito é retirado do folículo ele inicia o processo de maturação e por isso é necessário agir rápido (GOTTARDI & MINGOTI, 2009).

A maturação do ovócito se dá pela maturação nuclear e a citoplasmática. Antes de se iniciar um ciclo reprodutivo, os ovócitos ficam em um estágio de quiescência, na prófase I.

A maturação nuclear ocorre desde o início da prófase I, na primeira divisão meiótica, até a metáfase II, na segunda divisão meiótica. Ela é necessária para que haja a divisão do material genético e consequente extrusão de metade dele, o corpúsculo polar, para que a célula se torne haploide (n) e apta a ser fecundada, tornando-se novamente uma célula diploide (2n) (CAIXETA & DODE, 2010).

A maturação citoplasmática é marcada pela redistribuição de organelas, aumento na quantidade de lipídeos, aumento na síntese proteica e armazenamento de RNAm materno. Uma vez maturado, o ovócito diminui a síntese do RNAm até que ele seja fecundado e o genoma embrionário ativado, que em bovinos ocorre no estágio embrionário de 8/16 células (GONÇALVES, 2008). Logo, é necessário que tenha um estoque suficiente de RNAm para todo o processo de transcrição e biossíntese proteica durante seu desenvolvimento até a ativação do genoma embrionário (CAIXETA & DODE, 2010) (GOTTARDI & MINGOTI, 2009) (FERREIRA et al., 2008).

As células do cumulus são importantes na maturação citoplasmática, além de formar os CCOs. Elas se comunicam com o ovócito através de *gap junctions*, auxiliando na nutrição, regulação metabólica, crescimento e diferenciação (HURK & ZAO, 2005).

Alguns parâmetros podem ser realizados para tentar selecionar ovócitos com maior competência, como análise morfológica, tamanho da célula, idade da doadora (inviável nesse caso) e a coloração HOECHST, que será descrita posteriormente (CAIXETA & DODE, 2010).

### 9.1.2 Preparo para maturação *in vitro* (MIV)

Após os ovócitos serem rastreados e selecionados, eles são lavados em gotas de tamanho variado, conforme a quantidade de células, no meio de maturação, meio MIV.



FIGURA 3 - Rastreamento e seleção de ovócitos através de lupa.

Fonte: arquivo pessoal.

O meio MIV mais usado comercialmente é o TCM-199®, que pode ser enriquecido com soro fetal bovino, alguns hormônios (LH, FSH, estradiol), fatores de crescimento e um tampão (bicarbonato de sódio ou HEPES) (GONÇALVES,

2008). No local de estágio, o meio MIV não possuía adição de hormônios e o tampão usado era o bicarbonato de sódio.

As células foram incubadas em gotas do meio MIV em uma placa coberta com óleo, posto em uma estufa a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 22/24 horas. Após o tempo de maturação, os ovócitos estarão aptos a serem fecundados.

### 9.1.3 Preparo para a fecundação *in vitro* (FIV)

As diferenças morfológicas mais marcantes, vistas sob a **lupa**, entre o ovócito maturo e o imaturo são a expansão das células do cumulus e a presença do CP. Essa expansão se dá pela produção de ácido hialurônico, que se acumula na matriz extracelular, auxiliando na hora da sua liberação do folículo e captura deste pelas fímbrias (ADONA, 2012).

O meio usado para a FIV é o FEC, que é adicionado heparina para a capacitação espermática, e PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina) para aumentar a atividade espermática (GONÇALVES, 2008). A quantidade de gotas depende da quantidade de ovócitos, e a placa também é coberta com óleo.

Para que haja fecundação é necessário fazer o preparo do sêmen. O sêmen usado nos protocolos vinha de palhetas congeladas em nitrogênio líquido. A palheta era descongelada em banho-maria a 36°C por 30 segundos. Uma gota do sêmen era posta em uma lâmina e lamínula e examinada ao microscópio ótico para observar a motilidade e vigor das células. Se a motilidade fosse menor que 30%, a palheta era descartada.

O sêmen viável era então posto em mini gradiente de Percoll® (45 e 90%), centrifugado por cinco minutos a 9000rpm, resuspendendo o pellet em meio CAP e centrifugado novamente na mesma rotação. O sobrenadante era descartado e um volume pequeno de meio FEC era adicionado, para que pudesse ser feito a motilidade e vigor, junto com a concentração espermática.

Após o preparo do sêmen, este foi adicionado na gota de FEC contendo os ovócitos na concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL e incubados em estufa a 38,5°C com 5% CO<sub>2</sub> por 18/20 horas. O dia da FIV é considerado D0.

#### **9.1.4 Preparo para o cultivo *in vitro* (CIV)**

Passado o tempo necessário, os ovócitos foram lavados em duas gotas de meio SOF e transferidos para uma placa preparada com uma gota de SOF (fluido sintético de oviduto) coberta com óleo. A placa foi incubada em estufa a 38,5°C com 5% CO<sub>2</sub>.

Após a fecundação, o cultivo é realizado por 6 a 8 dias, onde os embriões que se desenvolverem vão estar em estágios adequados para transferência ou criopreservação.

Em D1 não é possível ver nenhuma clivagem. Somente em D2 que é possível ver clivagem de duas, quatro e de até oito células, sendo que os embriões de quatro ou mais células em D2 são considerados os mais viáveis (GONÇALVES, 2008).

Dos 23 ovócitos maturados que foram fecundados, 18 clivaram em D2, sendo que seis tinham quatro células e 12 apresentaram oito ou mais células. A taxa de clivagem foi de 78%.

Em D6 se observou um blastocisto inicial (blastocelo ocupado menos que 50% do citoplasma), duas mórulas compactas e três mórulas, totalizando seis estruturas de 18 clivados (33%). Em D7 foi visto um blastocisto em eclosão, três blastocistos expandidos, dois blastocistos e um blastocisto inicial. Em D8 havia cinco blastocistos expandidos, dois iniciais, um eclodido e um em eclosão. A identificação das células foi baseada nas estruturas descritas no Manual do IETS (*International Embryo Transfer Society*), 1998.

## **9.2 Laboratório de Fixação**

### 9.2.1 Avaliação da cinética de maturação do ovócito

Essa avaliação visa observar em que fase do ciclo de divisão celular o ovócito se encontra. Quando este é retirado do folículo, chamado 0h, a célula deve estar na prófase I da primeira divisão meiótica, com o núcleo intacto e a cromatina não condensada. Após a MIV, as células devem estar na metáfase II, apresentando o primeiro CP. (GONÇALVES, 2008)

O material foi coletado da mesma maneira descrita anteriormente. Os ovócitos foram tratados com hialuronidase, uma enzima responsável pela quebra do ácido hialurônico presente nos COC. Após cinco minutos, eles foram desnudos, ou seja, foi removida a camada de células do cumulus através de pipetagens leves.

Após essa fase, os ovócitos foram transferidos para Eppendorfs® e foi adicionado solução de fixação. Para permitir melhor fixação, o material foi deixado em repouso por 24/48 horas.

Os ovócitos já fixados foram transferidos para uma placa de quatro poços. Em dois lados opostos de uma lamínula foi depositado um pouco de vaselina com o auxílio de uma seringa e agulha. Algumas células com um pouco da solução de fixação (para evitar ressecção) foram colocadas no centro de uma lâmina. Foi colocada, então, a lamínula sobre a lâmina e se aplicou uma leve pressão a fim de impedir a movimentação do ovócito, mas com cuidado para não romper a célula.

Com uma pipeta de Pasteur, foi sugado um pouco do corante Lacmoide® 45% que entrou por capilaridade entre a lâmina e a lamínula. Uma vez cobrindo os ovócitos, foi deixado agir por pelo menos três minutos. Após o tempo, lavou-se com solução de fixação na pipeta de Pasteur, da mesma forma que o corante. O excesso de solução foi absorvido com papel toalha.

Com um esmalte, os lados da lamínula que não estavam com vaselina foram vedados para impedir que a solução evapore. Observou-se o resultado final em microscópio de contraste de fase, sob óleo de imersão, no filtro Ph-3.



O 0h possuía uma vesícula germinativa intacta e citoplasma regular. Alguns apresentavam uma irregularidade na membrana nuclear, com condensação do material genético, sugerindo a fase pré-metáfase I.

O 24h apresentava a formação da placa metafásica, com o material genético condensado e a presença do CP, também com material genético em seu interior, próximo à placa. Essa fase foi definida como a metáfase II. Por ter sido uma célula submetida à MIV, era de se esperar encontrar essas estruturas, indicando que o ovócito realmente sofreu maturação.

### **9.2.2 Coloração de HOECHST 33342**

É usada como marcador nuclear de células vivas. Na rotina, foi usada em espermatozoides associada a outros corantes para ver viabilidade, e em embriões, para fazer a contagem das células embrionárias. É um corante fluorescente de cor azul que possui afinidade pelo DNA e é capaz de atravessar a membrana celular intacta (HANDYSIDE & HUNTER, 1984).

Os embriões preconizados para este teste são os D7-D8, que é o tempo usado também para a transferência embrionária. Embriões muito velhos estão em degeneração, atresia e com a membrana muito frágil, rompendo com frequência e impedindo a interpretação dos resultados.

Os embriões foram transferidos para uma placa de quatro poços, juntamente com o meio. Foi adicionado pequeno volume do corante. A placa foi posta em uma placa maior coberta por papel laminado, que agia como uma câmara escura, pois o corante é degradado se exposto à luz. As células foram incubadas na solução por 15 minutos.

Em uma lâmina foi introduzida uma gota contendo o embrião, colocando um pouco de óleo ao redor, com auxílio de uma pipeta, para tentar estabilizá-la. Após, foi colocado uma lamínula e levado ao microscópio de fluorescência no filtro 24.

Foram observadas múltiplas células no interior do embrião (os blastômeros e células do trofoblasto, que são indiferenciadas sob essa coloração).



FIGURA 4 - Embrião bovino em D8 corado com HOECHST 33342 sob microscópio de fluorescência. Fonte: arquivo pessoal.

### 9.2.3 Colorações espermáticas

Somente o exame andrológico (motilidade, vigor, concentração, movimento e morfologia) não é suficiente para afirmar o nível de fertilidade do sêmen. Para isso, faz-se uso de algumas colorações para visualização de partes mais específicas do espermatozoide (sptz), como a membrana plasmática, acrossomo e DNA (VARNER, 2008).

A visualização e interpretação dos corantes podem ser feitas pelo microscópio de fluorescência ou pelo citômetro de fluxo.

O citômetro de fluxo, resumidamente, possui cinco elementos: uma fonte de radiação (liberação do Laser), uma câmera de fluxo (por onde passam as células enfileiradas), unidade de filtros ópticos (selecionam um intervalo de comprimento de onda específico), detecção do sinal de ondas e o local de processamento de dados. O feixe de laser atinge as células em um ângulo frontal e lateral, que é dispersado e captado pelo equipamento, o que permite fornecer

informações como tamanho da célula e morfologia. Igualmente mostra a intensidade de fluorescência refletida pela célula corada. (DA SILVA, 2004)

Para ver integridade de membrana usa-se o iodeto de propídeo, que é um corante com fluorescência vermelha e afinidade ao DNA. E impermeável a membrana celular íntegra, logo se a célula ficar corada significa que a membrana estava lesada (CSERMAK JUNIOR, 2011).

Os corantes de acrossomo mais usados na rotina são as lecitinas (afinidade por glicoproteínas acrossomais) de amendoim ou de ervilha, sendo que a primeira se liga a membrana acrossomal externa, enquanto a segunda marca o acrossoma reagido ou lesado. Ambas têm que ser conjugadas com moléculas de fluorescência, sendo a mais comum a FITC (*fluorescein isothiocyanate conjugated*). (CROSS et al., 1986; MORTIMER et al., 1987).

O CTC (clortetraciclina) liga-se ao cálcio e é usado para ver o estado de capacitação do sptz. Os sptz são classificados em capacitados, não capacitados e reagidos. (GILLAN et al., 2005).

Para avaliar o grau de fragmentação do DNA, um dos métodos mais usados é o TUNEL. Por ser uma molécula similar a nucleotídeos, se liga nas porções terminais das fitas livres de DNA e marca células mortas, degeneradas ou apoptóticas (FREDERICO, 2007).

### **9.3 Laboratório de Clonagem**

#### **9.3.1 Preparo da célula doadora de núcleo**

São várias as origens de células doadoras, como células sanguíneas, de pele e células embrionárias. As mais usadas são as de pele, ou seja, fibroblastos (CHESNÉ, 2006).

Foi coletado de um bovino, um fragmento de pele 1x1 cm em local protegido de raios solares (face interna da coxa, abaixo da orelha) e foi fixado em placas pequenas com meio de cultivo celular por sete dias. Após esse tempo, o

fragmento inicial foi removido e a placa foi incubada por mais sete dias, até que houve a formação de um tapete de células ao fundo da placa.

Ao fim do cultivo inicial, foi adicionado tripsina para soltar as células do fundo, centrifugou-se o meio rico em células e se distribuiu o meio em outras placas para o cultivo e criopreservação. Quando era para novo cultivo denominava-se Primeira Passagem (PEREIRA & FREITAS, 2009).

Geralmente, as células usadas para a manipulação são de Quarta Passagem. Elas foram selecionadas pela sua morfologia (citoplasma com coloração homogênea, forma arredondada, tamanho médio) para o processo de transferência.

Nesse caso, as células doadoras eram provenientes de uma cultura de linhagem de células transgênicas, ou seja, o clone teria a mesma alteração gênica.

### **9.3.2 Clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS)**

O protocolo segue o mesmo citado na FIV, mas a maior diferença é o tempo de maturação reduzido de 18 horas. Isso é feito para evitar que a célula fique muito envelhecida, fator muito importante na clonagem. Os ovócitos estão em metáfase II, fase ótima para realizar a manipulação (LEE et al., 2007).

Uma vez maturados, os ovócitos foram tratados com hialuronidase (como descrito no processo de MIV) por cinco minutos, incubados na estufa a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>. Eles foram desnudos com a pipeta.

Os ovócitos foram selecionados conforme a presença do CP. Nestes, foi adicionado citocalasina, uma substância que age na membrana celular (inibe a polimerização da actina) e oferece fluidez para que o ovócito não rompa na hora de ser manipulado. O tempo de duração foi de 30 minutos, na estufa a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Duas micropipetas especiais são necessárias para a enucleação dos ovócitos pelo micromanipulador. A pipeta de aspiração, feita a partir de um microcapilar de 1,5 mm de diâmetro que precisa de um bisel no ângulo de 45° e um Spike (prolongamento da ponta mais extrema), cortados na microforja; e a pipeta de fixação, que precisa ter a borda arredondada para não danificar a célula durante a manipulação.

Após o tratamento com a citocalasina (desestabilizador de filamentos de actina), eles foram levados ao micromanipulador, onde houve a penetração da membrana plasmática e a remoção do CP e de uma pequena porção do citoplasma adjacente ao CP, onde deveria estar a placa metafásica. Para confirmar a remoção de todo o material genômico da célula, fez-se uso da luz UV (por pouco tempo para não afetar a célula), já presente no equipamento, para visualização do material genético e de sua consequente remoção.

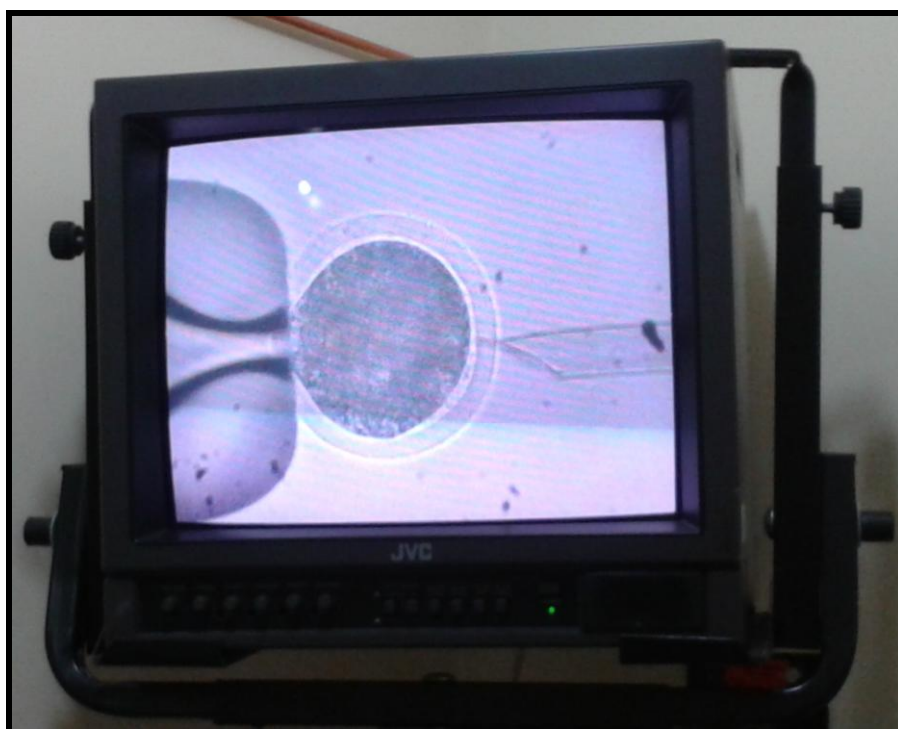


FIGURA 5 - Processo de enucleação do ovócito. Fonte: arquivo pessoal.

A célula doadora foi, então, inserida entre a zona pelúcida e a membrana plasmática da célula receptora, o ovócito. O fibroblasto ficava em contato íntimo com a membrana plasmática da célula receptora. Foi preconizado introduzir a pipeta no mesmo orifício feito durante o processo de enucleação, para não lesar muito a célula.

Depois da transferência, as células foram levadas para a placa de eletro fusão, com dois polos – um positivo e um negativo. No centro, foi adicionado Manitol (para que não houvesse choque térmico na hora de passagem de corrente), onde as células eram colocadas uma por vez, em contato com o polo negativo e com a célula doadora voltada para o lado positivo. Foram dados dois pulsos correntes por 50 microssegundos cada e então a célula era incubada novamente em meio LAV na estufa a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> por 30 minutos, para saber se houve fusão (HEYMAN, 1996).

A fusão das membranas ocorre por que o campo elétrico atrai cada célula para um lado, levando ao aparecimento de poros nas membranas de cada uma delas. Uma vez o pulso cessando, os poros se unem e há a fusão celular (HEYMAN, 2005).

Ao fim dos 30 minutos, era necessário que houvesse o estímulo para reiniciar a divisão celular, que *in vivo* é produzido pela penetração do spz. *In vitro*, esse processo foi mimetizado usando Ionomicina por cinco minutos, e 6-DMAP por quatro horas, que causaram um influxo de cálcio e ativação celular.

Os embriões, no final da manipulação, foram cultivados por sete dias, tempo bastante adequado para se realizar a transferência embrionária, onde os embriões reconstruídos se encontram na fase de blastocisto e blastocisto expandido.

#### **9.4 Laboratório de Biologia molecular**

#### 9.4.1 Protocolo de extração de DNA pelo método *Salting Out*

Esse protocolo foi preconizado, pois os kits existentes no mercado com a finalidade de extração de DNA têm um preço muito elevado, e também aliados à quantidade de material que precisa ser processado, torna-se inviável.

O método de *Salting Out* tem uma boa eficiência (CARDOSO et al., 2009) quando comparado aos kits comerciais mais usados. Pode ser usado em células provenientes de sangue, espermatozoides e de tecido. Foi descrito por Jonh et al. em 1991. O método usado é um modificado.

Em um tampão já previamente preparado (mistura de TRIS, EDTA, NaCl, SDS – detergente) foi adicionado Proteinase K e RNase, antes de iniciar o protocolo, para que as enzimas não sejam degradadas.

O tecido de cotilédones proveniente de um clone bovino, que era o material usado no experimento, encontrava-se congelado e preservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foi retirado do freezer, descongelado levemente e então, removido um pedaço de aproximadamente 150 gramas; daí foi macerado no nitrogênio líquido até formar um farelo, transferido para um Eppendorf® e se adicionou o tampão. A mistura foi posta em geladeira *over night* (ON). O objetivo dessa parte foi a de realizar a precipitação de proteína, na tentativa de purificar o DNA.

Após o tempo necessário, o pellet formado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado isopropanol, a fim de precipitar o DNA. Essa etapa também foi deixada na geladeira ON.

O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado etanol 70%, com o intuito de remover os sais. A mistura foi centrifugada na rotação máxima por 10 minutos. O excesso de líquido foi descartado e foi dado um Spin® para facilitar ao máximo a remoção de líquido em excesso. O pellet foi então reidratado com solução de TE (TRIS HCl com EDTA) e foi levado para o Nanodrop®, onde foi feita a quantificação do DNA para mostrar o grau de pureza da amostra.

Ao final, foi feita uma corrida em gel de Agarose para visualização das bandas de DNA e confirmar que o gene alvo estava presente na amostra extraída.

O protocolo é mais demorado que os kits por ter três etapas ON, mas a eficiência foi satisfatória e o custo foi baixo.

A necessidade de o protocolo ter várias etapas sob refrigeração é porque o frio auxilia na precipitação de proteínas.

## **9.5 Fazenda Sucupira**

### **9.5.1 Coleta de embriões em ovelhas**

O procedimento da coleta em ovinos é completamente diferente da realizada em bovinos, devido principalmente a diferença no tamanho e anatomia do sistema reprodutor dos animais. É considerado um fator limitante para a disseminação dessa técnica na produção (GUSMÃO, 2005). Apesar disso, o protocolo hormonal é parecido. A coleta em ovinos é realizada em D5,5 pós inseminação.

Os animais estavam fazendo parte de um experimento de uso de substância diferente no protocolo normal de superovulação.

Antes de ter sido realizada a laparotomia, os animais passaram por ultrassom, a fim de confirmar a resposta ovariana frente aos estímulos hormonais do protocolo de superovulação. Os ovinos que não apresentavam resposta visual no ultrassom sofreram a laparoscopia para confirmar a presença de CL. Os animais que apresentaram resposta foram submetidos a laparotomia.

Para realizar o lavado uterino, o útero é exposto da cavidade abdominal e um orifício realizado na base de um dos cornos, onde foi introduzido a sonda de folley. Ao final da tuba uterina, foi posto um cateter com uma seringa acoplada. O lavado foi feito individualmente em cada corno injetando por volta de 50 mL de PBS, massageando este e então coletado o líquido em uma placa de Petri previamente identificada.



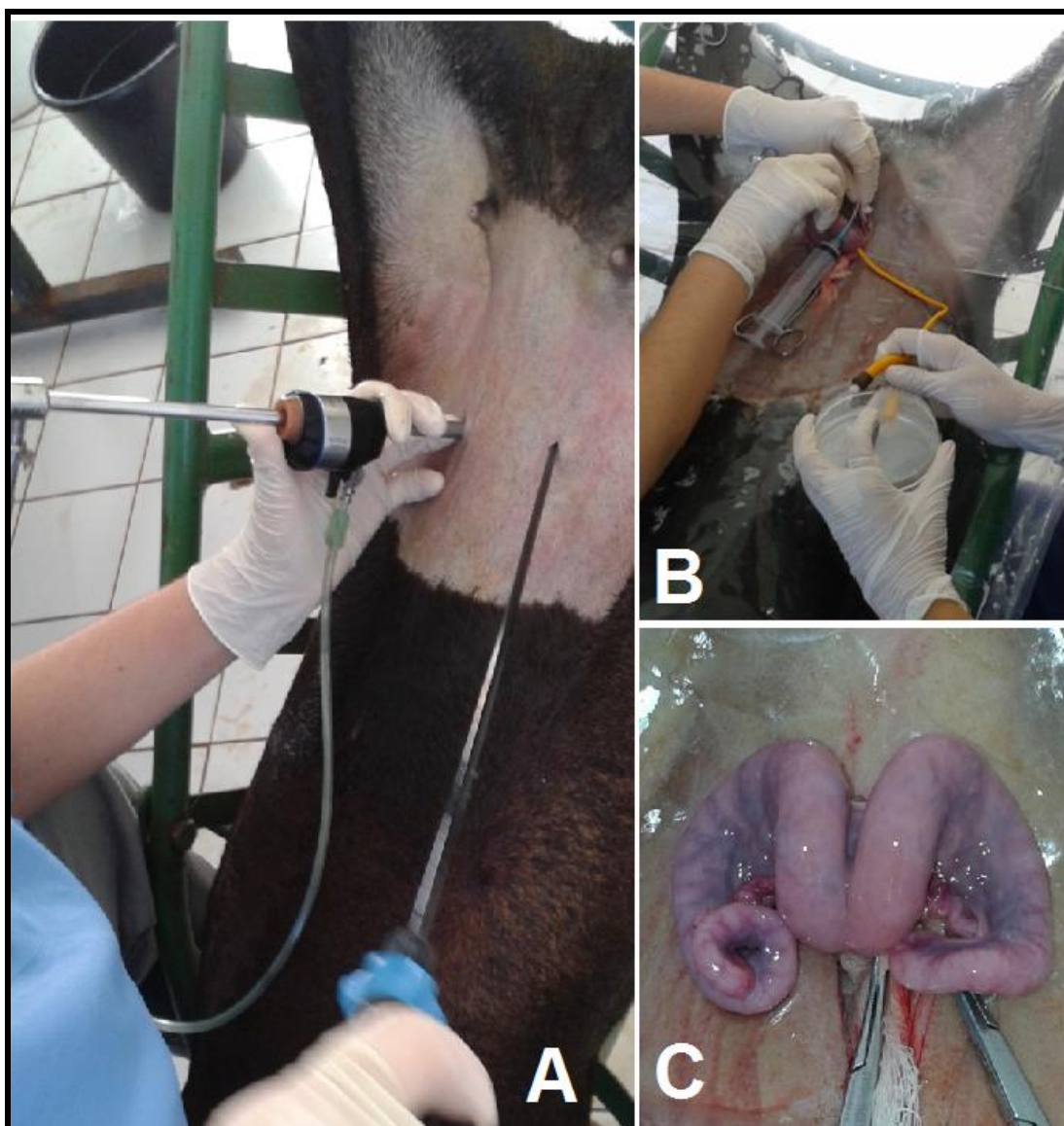


FIGURA 6 - Laparoscopia (A); lavado de um corno uterino (B); exposição do útero para realizar o procedimento de coleta (C). Fonte: arquivo pessoal.

### 9.5.2 Transferência de embriões (TE) em bovinos

Em bovinos, a TE é mais aplicável, pois não precisa submeter os animais à cirurgia. A coleta é feita em sete dias após a inseminação artificial.

Em cada animal foi avaliada a resposta ao protocolo de superovulação através da visualização de CL com ultrassom e então foi realizado a coleta de

embriões. O experimento em questão tinha como objetivo coletar embriões em D7 e transferi-los para receptoras, junto com embriões PIV. Em D14, todas as receptoras foram lavadas e os embriões coletados para comparar a expressão de genes específicos durante a fase embrionária de embriões PIV e *in vivo*. O estudo de embriões em fase mais avançada de desenvolvimento é importante para confirmar se este manteve sua qualidade e viabilidade inicial, bem como para tentar correlacionar expressão gênica com viabilidade.

Os animais usados eram da raça Nelore, de idades diferentes. A cérvix foi aberta com o uso do expansor, e a sonda com o mandril foi introduzida até o corpo do útero. O balão da sonda foi inflado (para impedir refluxo de líquido e que este não saia do lugar) e o mandril foi removido. A quantidade de lavagens é relativa ao tamanho do útero do animal, sendo que geralmente as primeiras foram feitas com 10 mL em média. O líquido usado na lavagem é o PBS, aquecido a 34°C. Após o útero ter sido preenchido com o PBS, os cornos são levantados (através da palpação retal) para que o líquido chegue até o final no corno. O líquido foi liberado pelo manipulador e voltou pela sonda, onde caiu no filtro coletor. O volume de líquido que permanecia nele era controlado manualmente para que não transbordasse nem ficasse vazio. Para a primeira fase de lavagem, usou-se um litro de PBS. Ao final do litro, uma presilha foi acoplada ao final da sonda e se liberou a vaca com o útero cheio de PBS para que ajudasse na remoção de qualquer embrião que pudesse ter ficado. Na chamada relavagem, usou-se no máximo 300 mL total de PBS para cada vaca. Após a remoção total da sonda, foi aplicada prostaglandina a fim de impedir prenhez de qualquer embrião que possa ter ficado para trás.

Para a coleta em D14, o procedimento foi o mesmo; a diferença foi que ao invés de usar um filtro coletor usou-se um Erlenmeyer de dois litros para cada animal, pois não houve a relavagem.

### **9.5.3 Coleta de sêmen**

Antes de realizar a coleta, foi necessário fazer um exame andrológico inicial nos animais, com palpação de todo o testículo para se avaliar as estruturas

nele presentes (cauda, corpo e cabeça do epidídimo, plexo pampiniforme), forma, consistência e tamanho. Esse exame é espécie específico, pois todas têm suas particularidades. Se a coleta for para congelamento, é essencial que se higienize o prepúcio com água e sabão, secar e depois fazer o aparado dos pelos prepuciais. Caso haja contaminação do sêmen, ele irá perder sua qualidade durante o processo de congelamento e o resultado final será insatisfatório.

A coleta em caprinos foi realizada com o uso de uma manequim viva e a vagina artificial. Os animais já haviam sido condicionados a montar na fêmea mesmo não estando no cio.

A coleta em tourinhos foi feita através do eletroejaculador, pois os animais não estavam condicionados à coleta com a vagina artificial.

Durante uma aula ministrada nas dependências da fazenda, foi realizada coleta de sêmen equino, com o uso de manequim vivo e vagina artificial.

Após cada coleta, foi feito a análise do sêmen, ou seja, volume e coloração do ejaculado, turbilhonamento, motilidade, vigor, morfologia e concentração ( [ ] ).



FIGURA 7 - Modelo de vagina artificial usada em ovinos, já montada.

Fonte: arquivo pessoal.

A motilidade espermática é dada em porcentagem (0 a 100%) e representa quantos espermatozoides estão móveis, sob um microscópio ótico. É uma medida

relativa. O vigor é dado de 1 a 5, e representa a força do movimento espermático, também observado sob microscópio ótico. O turbilhonamento pode ser visto a olho nu em caprinos e ovinos, no tubo de coleta, ou através de uma gota sob o microscópio ótico. Ele é dado em valor de 1 a 5 e é associado á concentração, motilidade e vigor da amostra.

A morfologia é feita no microscópio ótico, sob óleo de imersão. Normalmente 5µl do sêmen é diluído em uma proporção de 1:200 (bovinos) ou 1:400 (ovinos). São contadas 200 células que são classificadas em relação à morfologia. A concentração usa a mesma diluição, mas as células são contadas na câmara de Neubauer, sob microscópio ótico. Somam-se os dois lados da câmara e o valor (n) é dividido por dois para então ser utilizado na fórmula para o cálculo.

#### **9.5.4 Congelamento de sêmen**

Após a coleta do sêmen, se for de interesse, pode-se congelar a amostra para preservar a genética ou para uso futuro em pesquisa. O sêmen próprio para ser congelado deve ter no mínimo 70% de motilidade e 3 de vigor.

Antes de ter sido realizada a coleta, o meio criopreservante foi preparado, através de uma solução de 1:3:1 de Triladyl®, água destilada e gema de ovo, respectivamente. Uma solução de 100 mL consegue completar 200 doses em palhetas de 0,5 mL.

Dois cálculos foram realizados, um para a quantidade de palhetas (as doses) e outro para a quantidade de meio que deve ser adicionado ao sêmen. Na EMBRAPA, a quantidade de células usadas nas palhetas é de 40 milhões. O volume do ejaculado (VE) bovino é em média 4 a 6 mL se coletado em vagina artificial. O valor de 'n' é o número de células contadas na câmara de Newbauer. O sêmen é pré-diluído após retirar as amostras para a concentração e morfologia.

$$n = 100$$

VE = 4 mL (pré dilui 1:1 ficando 8 mL no final)

A fórmula para calcular a concentração total de espermatozoides no VE:

$$\frac{n}{\frac{5}{25} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{200}} \times VE$$

Onde 5/25 representa a quantidade de quadrados contatos na câmara, 1/10 é o tamanho da câmara e 1/200 é a única variável, representando a diluição usada. O resultado desse cálculo foi:

$$[ ] \text{ total} = 4 \times 10^9 \text{ espermatozoides}$$

Esse valor é então dividido pelo número de espermatozoides por palheta, para achar o número de doses:

$$4 \times 10^9 / 40 \times 10^6 = 100 \text{ doses}$$

Como as palhetas usadas eram de 0,5 mL multiplica esse valor pelo número de doses para achar o volume de diluente:

$$100 \times 0,5 = 50 \text{ mL}$$

O volume total de diluente deve levar em conta o VE já prédiluído:

$$50 - 8 = 42 \text{ mL}$$

Ou seja, para este animal basta adicionar 42 mL de diluente ao volume do ejaculado, resultando em 100 doses em palhetas de 0,5 mL.

Após os cálculos, as palhetas foram preenchidas com a solução e envazadas. As palhetas foram transferidas para a câmara fria, mantida a 5° C para começar o resfriamento e o congelamento do sêmen. As palhetas ficaram nessa câmara por 4 a 5 horas. Ao final do tempo, elas são transferidas para um isopor contendo nitrogênio líquido no fundo, onde ficam 4 cm acima da linha do nitrogênio, sob uma mesinha de madeira parcialmente imersa. Elas permaneceram lá por 20 minutos, onde foram então submersas diretamente no

nitrogênio líquido, a uma temperatura de  $-196^{\circ}$  C. Uma vez submersas, elas foram colocadas em racks, que também estavam em contato com o nitrogênio líquido, para poderem ser transferidas para o botijão, onde são mantidas por tempo indeterminado.

#### **9.5.5 Exame de brucelose e tuberculose em bovinos**

Os testes de brucelose e tuberculose são obrigatórios para todos os animais que entrarem em trânsito, que forem reprodutores comerciais ou que forem participar de exposições, feiras, leilões ou outra aglomeração de animais. Eles são requisitados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), criado em 2001. Ambas são zoonoses de interesse econômico e de notificação obrigatória. Caso haja animais positivos estes devem ser descartados do rebanho num prazo de 30 dias.

O Programa Nacional, no caso do controle da brucelose, prescreve que todas as fêmeas com idade entre 3 e 8 meses devem ser vacinadas com a B19; que animais positivos devem ser marcados e então abatidos; e que a regulação do teste sorológico, feito em animais acima de 24 meses, deve ser realizada por um médico veterinário credenciados. A vacinação, por ser de agente vivo atenuado, também deve ser feita sob a supervisão de um médico veterinário.

O agente etiológico é uma bactéria Gram negativa, e a mais comumente encontrada em bovinos é o *Brucella abortus*, responsável principalmente por problemas reprodutivos no rebanho, como baixa taxa de prenhez, abortos, reabsorção fetal, queda de produção e esterilização. Ela é de caráter crônico e afeta células do sistema fagocítico mononuclear.

O exame usado nos rebanhos é o sorológico, chamado de teste de soroaglutinação com antígeno ácido tamponando (AAT). É um teste de triagem e é uma prova qualitativa. Caso haja animais positivos neste teste, deve-se fazer a contraprova, um exame mais específico, geralmente o teste do 2-mercaptoetanol (2-ME).

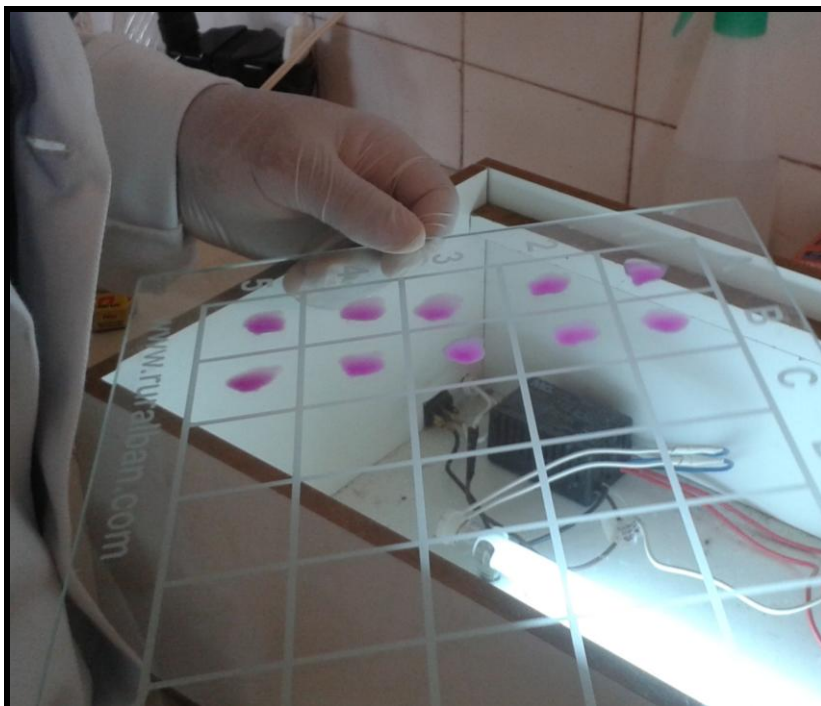


FIGURA 8 – Leitura do teste do AAT, após a combinação do soro com o reagente.

Fonte: arquivo pessoal.

No caso da tuberculose, o teste que é feito nos rebanhos é o da tuberculinização, um diagnóstico alérgico-cutâneo, feito em animais com idade igual ou superior a seis semanas. Existe o teste cervical simples, feito em gado leiteiro, e o teste na prega caudal, realizado em gado de corte ou animais agressivos. Ele consiste em dois antígenos que são introduzidos, através de uma agulha intradérmica, na região de pescoço do animal: *Mycobacterium bovis* e *M. avium*. Após a inoculação, a espessura da pele na região é medida e, três dias depois, é medida novamente no mesmo local. Através de um cálculo padronizado e uma tabela de valores referência estipulada pelo Plano Nacional, o animal é considerado positivo, inconclusivo ou negativo. Esse teste é capaz de revelar infecções a partir de três a oito semanas de exposição ao agente. Essa reação de hipersensibilidade tardia é considerada uma técnica de referência pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e é a estipulada pelo Plano Nacional.

## **10. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi possível aprimorar os meus conhecimentos em diversas áreas mesmo sendo curto o tempo disponível para realizar todo o trabalho. Inúmeras oportunidades de crescimento profissional foram descobertas que, unidas às atividades, acrescentaram vários aspectos positivos na minha vida acadêmica e pessoal.

Ambos os locais de estágio foram muito proveitosos.



## 11. REFERÊNCIAS

- ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; MIANDA, M. S.; OHASHIK, M. Ovogênese e folículogênese em mamíferos. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v.15, n. 3, p.245-50, 2013.
- BLACK-DECIMA, P.; ROSSI, R.V.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J.L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J.M. B.; GONZÁLES, S.; JULIÁ, J. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In. DUARTE e GONZÁLEZ. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal:FUNEP, p.255-270, 2010.
- BUENO, A. P.; PEREIRA, R. E. P. Biotecnologia aplicada aos animais silvestres e seus aspectos éticos e conservacionistas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VI, n. 11, 2008.
- CAIXETA, E. S ; DODE, M. A. N. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Vet e Zootec**, v. 17, n. 1, p. 8-18, 2010.
- CARDOZO, D. M.; GUELSIN, G. A.; CLEMENTINO, S. L.; DE MELO, F. C.;BRAGA, M. A.; DE SOUZA, C.; MOLITERNO, R. A.; VISENTAINER, J. E. L. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 651-656, nov-dez, 2009.
- CHESNÉ, P. Métodos de clonagem em caprinos e ovinos. In: Freitas VJF (Ed). **Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. Fortaleza: Multicor, p.21-29, 2006.
- CROSS, N. L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; HANSON, F. W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v.15, p. 213-226, 1986.
- CSERMAK JUNIOR, A. C. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação espermatozoides do cão (*Canis lupus familiaris*) à membrana périvitelina do ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen**. 2011. Tese de Doctor Scientiae. Universidade Federal de Viçosa. 71f.
- COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas da reprodução. **Univ. Ci. Saúde**, Brasília, v. 6, n. 1, p. 39-55, jan./jun. 2008.
- CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Anatomia dos Animais Selvagens**. Editora Roca, São Paulo. 641p, 2007.
- DA SILVA, T. L. et al. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocesso. **Boletim de Biotecnologia**. Métodos em biotecnologia - Citômetro de fluxo II. 2004

- DUARTE, J. M. B. Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em animais silvestres: o exemplo dos cervídeos. **Agrociencia, Montecilo**, v.9, n. 1-2, p. 541-544, 2005.
- DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Tecnologia da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997, p. 228-238
- FEREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; ALBUQUERQUE, P. A.; NAVARRO, S. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.172-181, jul./set. 2008.
- FREDERICO, M. C. et al.. **Métodos de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozoides bovinos**. Embrapa Cerrado. 2007.
- GARCIA, J. E.; DUARTE, J. M. B. Variação anual do espermiograma de veado catiungueiro, *Mazama gouazoubira*, sob condições de cativeiro. In: XVIII Congresso Brasileiro da Sociedade de Zoológicos do Brasil. Rio de Janeiro, 1994.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.
- GONÇALVES et al. Biotécnicas aplicadas á reprodução animal. 2ª edição. 2008
- GOTTARDI, F. P; MINGOTI, C. Z. Maturação de ovócitos bovinos e influência na aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, 2009.
- GUSMÃO, A. L.; ANDRADE MOURA, J. C. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Supl 1), p.29-33, 2005.
- HANDYSIDE, A. H.; HUNTER, S. A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophctoderm nuclei of mouse blastocysts *in situ* using polynucleotide specific fluorochromes. **Journal of Experimental Biology**, v. 231, n. 3, p. 429-434, 1984.
- HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v.45, p.353-361, 2005.
- HEYMAN, Y.; RENARD, J. P. Cloning of domestic species. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.42, p.427-436, 1996.
- HOWARD, J. G.; MARINARI, P. E; WILDT, D. E. Black-footed ferret: model for assisted reproductive technologies contributing to in situ conservation. In: Holt

WV, Pickard AR, Rodger JC, Wildt DE (Ed.). **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge University Press, p.249-266, 2003.

Van den HURK, R.; ZAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriongenology**, v.63, p. 1717 – 1757, 2005.

IMWALLE, D. B.; PATTERSON, D. J.; SCHILLO, K. K. Effects of Melengestrol Acetate on Onset of Puberty, Follicular Growth, and Patterns of Luteinizing Hormone Secretion in Beef Heifers. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1432-1436, 1998.

IMWALLE, D. B.; FERNANDEZ, D. L.; SCHILLO, K. K. Melengestrol acetate blocks the preovulatory surge of luteinizing hormone, the expression of behavioral estrus, and ovulation in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 80, n. 5, p. 1280-1284, 2002.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2015-4. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/details/29620/0>>. Acesso em 11 de maio, 2016.

JONH, S. W.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, v. 192, p. 408-408, 1991.

LEE, S. H.; KUMAR, B. M.; KIM, J. G.; OCK, S. A.; JEON, B. G.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. H. Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene-transfected somatic cells. **Reprod Domest Anim**, v.42, p.44-52, 2007

LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. caractéristiquesetmaitrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. **INRA Productions Animales**, Paris, v.18, n.1, p.3-25, 2005.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P. B. D.; FREITAS, F. V. J.; JUNIOR, L. S. E. Controle do estro e da ovulação em ruminantes. In: GONÇALVES, P. D. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. [S.l.]: Roca, p. 83-104, 2008.

MORTIMER, D.; CURTIS, E. F.; DRAVLAND, J. E. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrossomal membrane of the human spermatozoon. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p. 127-135, 1987.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual técnico do programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, 2006. 181p.

OLIVEIRA, M.E.F.; BARTLEWSKI, M. P.; FELICIANO, R. A. M. Controle do ciclo estral. In: OLIVEIRA, M. E. F. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. São Paulo: Medvet Editora, p. 71-77, 2013.

- PATTERSON, D. J.; KIRACOFE, G. H.; STEVENSON, J. S.; CORAH, L. R. Control of the bovine estrous cycle with melengestrol acetate (MGA): A review. **Journal of Animal Science**, v. 67, 1989
- PEREIRA, J. R. G.; POLEGATO, B. F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J. A.; DUARTE, J. M. B. Monitoring ovarian cycle and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, v. 2, p.387–399, 2006.
- PERRY, G. A.; WELSHONS, W. V.; BOTT, R. C.; SMITH, M. F. Basis of melengestrol acetate action as a progestin. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.147–161, 2005.
- PLOTKA, E. D.; SEAL, U. S. Fertility control in female white-tailed deer. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 25, n. 4, p. 643-646, 1989.
- QUISPE, Q. T.; QUINTERO, Z. L.; HERNANDEZ, O. A.; MENDEZ, V. J. sincronizacion de estros en ovejas mediante un tratamiento corto con acetate de melengestrol (MGA) combinado con cipionato de estradiol (ECP). **Veterinaria Mexico, Mexico**, v. 26, n.1, p. 23-29, 1995.
- ROLA, L. D. **Estimulação ovariana, recuperação e maturação de oócitos de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)**. Dissertação de mestrado. 2013. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 57f.
- ROUGHTON, R. D. Effects of oral melengestrol acetate on reproduction in captive white-tailed deer. **The Journal of Wildlife Management**, v. 43, n. 2, p. 428-436, 1979.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures**, 3rd ed. Savoy, IL: International Embryo Transfer Society; 1998.
- TIEPOLO, L. M.; TOMAS, W. M. Ordem Artiodactyla. In: DOS REIS, N.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; DE LIMA, I.P. (Org.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: SEMA, p.287-287, 2006.
- VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p. 448-462, 2008.
- WHITLEY, N. C.; JACKSON, D. J. An update on estrus synchronization in goats: a minor species. **Journal of Animal Science**, v. 82 (Suppl), p.270-276, 2004.
- WILDT, D. E.; COMIZZOLI, P; PUKAZHENTHI, B. S.; SONGSASEN, N. Lessons from biodiversity-the value of nontraditional species to advance reproductive

sciences, conservation, and human health. **Mol Reprod Dev**, v.77, p. 397-409, 2010.

ZANETTI, E. S. **Protocolos de superovulação em veado-catingueiro (Mazama gouazoubira)**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 87f.