



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NO *CENTER FOR CONSERVATION AND RESEARCH OF  
ENDANGERED WILDLIFE - CREW* NO ZOOLOGICO DE CINCINNATI (OHIO,  
US) E NA ASSOCIAÇÃO MATA CILIAR - AMC EM JUNDIAÍ (SP)**

MARINA LIBONATI DE AZEVEDO

RECIFE-PE, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NO *CENTER FOR CONSERVATION AND RESEARCH OF  
ENDANGERED WILDLIFE - CREW* NO ZOOLOGICO DE CINCINNATI (OHIO,  
US) E NA ASSOCIAÇÃO MATA CILIAR - AMC EM JUNDIAÍ (SP)**

Trabalho realizado como exigência parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária Sob orientação do Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva do curso de medicina veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MARINA LIBONATI DE AZEVEDO

RECIFE-PE, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A994r Azevedo, Marina Libonati de  
Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO),  
realizado no Center for Conservation and Research of Endangered  
Wildlife - CREW no zoológico de Cincinnati (Ohio,US) e na  
Associação Mata Ciliar - AMC em Jundiá (SP) / Marina Libonati de  
Azevedo. – 2019.  
50 f. : il.

Orientador: Jean Carlos Ramos da Silva.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina  
Veterinária, Recife, BR-PE, 2019.  
Inclui referências.

1. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc 2. Sêmen 3. Felídios  
I. Jean Carlos Ramos da Silva, orient. II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NO *CENTER FOR CONSERVATION AND RESEARCH OF  
ENDANGERED WILDLIFE-CREW* NO ZOOLOGICO DE CINCINNATI (OHIO,  
US) E NA ASSOCIAÇÃO MATA CILIAR - AMC EM JUNDIAÍ (SP)**

Relatório elaborado por  
MARINA LIBONATI DE AZEVEDO

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Professor Dr. Jean Carlos Ramos da Silva  
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

---

Professor Dr. André Mariano Batista  
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

---

Biólogo Ms. Yuri Marinho Valença  
Centro de Triagem de Animais Silvestres - CETAS Tangará

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha Mãe, e a todos os profissionais da área de conservação, que possibilitaram e possibilitam que os animais silvestres persistam apesar de tantas adversidades em seus caminhos e também a todos os animais, em especial aos felinos silvestres.

## AGRADECIMENTOS

Por todas as oportunidades que tive em minha vida, sou grata a Deus, pois ele como meu guia possibilitou e possibilita realização de muitos sonhos. A toda minha família, a meus Irmãos, Renata, Luiz Felipe, pela amizade e força durante todos esses anos. A meus pais, Márcio, Adeilson, e em especial a minha Mãe, Maria de Fátima, pela formação que tive, por acreditarem em mim e por me incentivarem nessa jornada.

A meus avós, Marina Lúcia e Antônio Luiz, os quais foram alicerce do meu caráter, acreditaram em mim desde criança e apoiaram minha decisão sendo essenciais durante toda minha jornada para que esse sonho se concretizasse.

À Yuri Hiarita, que compartilhou comigo do mesmo sonho e me apoiou com todo seu amor.

À meus amigos da UFRPE, que me apoiaram e compartilharam comigo momentos memoráveis, sendo um ombro amigo sempre que necessário.

Aos amigos do Androlab por todos os ensinamentos passados.

Ao Prof. André Mariano por me dar a oportunidade na área da reprodução e pelas orientações.

As equipes do Cetas - Tangará e do Parque estadual de Dois Irmãos, que me acolheram e incentivaram e transmitiram a mim seus conhecimentos.

Ao Prof. Jean Carlos pela confiança depositada em mim, possibilitando que eu realizasse o meu estágio nos dois melhores lugares que eu poderia imaginar.

As equipes do *Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife* e da Associação Mata Ciliar, pelos conhecimentos transmitidos e por permitirem que eu pudesse contribuir com seus trabalhos de conservação, aumentando a admiração pelos trabalhos que realizam e pelos profissionais que são.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa da área do Zoológico de Cincinnati, mostrando no círculo vermelho as facilidades do *Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife*.

Figura 2. Mapa da área da Associação Mata ciliar em Jundiaí.

Figura 3. Exemplos de alterações encontradas durante avaliação morfológica; a. cauda fortemente enrolada; b. gota citoplasmática proximal; c. macrocefalia.

Figura 4. Vagina artificial para colheita de sêmen em gato doméstico.

Figura 5. Oócitos de gatas domésticas maturados para realização de fertilização *in vitro*.

Figura 6. Teste rápido utilizado para gravidez em gato-de-pallas (*Otocolobus manul*).

Figura 7. Realização de laparoscopia para inseminação próxima ao oviduto em gata doméstica.

Figura 8. Castração de uma fêmea de gato doméstico.

Figura 9. Colheita de sêmen em lince-canadense (*Lynx canadensis*). Na foto a pós doutoranda, Raquel Gonzales, que realizava a pesquisa e a técnica Amy Miller.

Figura 10. Realização de exame radiográfico em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) Tambaú.

Figura 11. Médicas-veterinárias fazendo a limpeza do abscesso em jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

Figura 12. Exemplar de tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*) que foi vermifugado no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres da Associação Mata Ciliar.

Figura 13. Site do Sistema Integrado de Gestão de Fauna Silvestre - SIGAM, Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do estado de São Paulo.

Figura 14. Monitoramento de visita de uma turma de terceiro ano de escola municipal de Jundiaí-SP.

Figura 15. Alimentação de filhote de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*).

Figura 16. Onça-pintada (*Panthera onca*) "Tabatinga" residente da Associação Mata Ciliar.

Figura 17 e 18. Gato-palheiro (*Leopardus colocolo*) à esquerda e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) à direita residentes da Associação Mata Ciliar.

Figura 19. Gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*) residente da Associação Mata Ciliar.

Figura 20. Recinto maior destinado aos grandes felinos.

Figura 21. Enriquecimento alimentar realizado com exemplar de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) residente da Associação Mata Ciliar.

Figura 22. Jaula de prensa utilizada para condicionamento dos grandes felinos

Figura 23. Aplicação de medicamento analgésico cloridrato de tramadol em lebre (*Lepus europaeus*).

Figura 24. Apresentação de casco de jabuti (*Chelonoidis carbonaria*) às crianças do terceiro ano de escola municipal em Bragança-SP.

Figura 25. Colheita por cateterização uretral em exemplar de onça-parda (*Puma concolor*) Juazeiro.

Figura 26. Presença de espículas no exemplar de onça-parda (*Puma concolor*) Maritingo.

Figura 27. Resultados do condicionamento realizado com exemplar de onça-parda (*Puma concolor*) apelidada Maritingo.

Figura 28. Protocolo de aproximação ao nitrogênio líquido utilizado pelo *Center for conservation and research of endangered wildlife*.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Avaliação morfológica realizada de várias amostras de felídeos silvestres previamente coletadas pela equipe do CREW descritas em porcentagem e com um n=100.

Tabela 2. Resultado da avaliação do acrossoma do ejaculado do gato doméstico colhido.

Tabela 3. Resultado após descongelamento de palhetas de sêmen que foram criopreservadas utilizando Triladyl® com processo de centrifugação e sem o processo de centrifugação.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINE - Antiinflamatório não esteroidal.

AMC- Associação Mata Ciliar.

CRAS - Centro de Reabilitação de Animais Silvestres.

CREW- *Center for conservation and Research of Endangered Wildlife.*

EE- Eletroejaculação.

FOCM - *Feline Optimized Culture Medium.*

IA - Inseminação Artificial.

NL- Nitrogênio líquido.

UTI - Unidade de tratamento intensivo.

## RESUMO

Devido aos impactos ambientais, muitas espécies vêm sofrendo perda de habitat, de populações e diversidade genética. Uma maneira de conseguir minimizar a perda das populações e da diversidade genética é utilizando de Biotécnicas Reprodutivas. Estas permitem que novos indivíduos sejam gerados e que várias amostras de diferentes materiais genéticos sejam armazenados para o uso no futuro. O estágio realizado no *Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife* e na Associação Mata Ciliar buscou aprimorar as habilidades na área da reprodução assistida de felinos, com o foco nos felídeos neotropicais. Com o uso do gato doméstico (*Felis catus*) como modelo foi possível realizar várias avaliações e metodologias associadas às Biotécnicas Reprodutivas como avaliação morfológica, criopreservação lenta, criopreservação ultrarrápida, maturação de oócitos, fertilização *in vitro* e produção de embrião. Após o aprendizado dessas metodologias, foi possível desenvolver um seminário relacionado, intitulado "Criopreservação de sêmen de onça-parda (*Puma concolor*) utilizando o diluente comercial Triladyl®" sendo possível coletar dois exemplares de onça-parda pelas técnicas de Cateterização Uretral e Eletroejaculação e criopreservar o ejaculado de um exemplar. Outras atividades também puderam ser desenvolvidas, como cirurgia e laparoscopia, atendimento clínico de animais silvestres resgatados, condicionamento, manutenção de recintos e atividades educacionais. As experiências vividas durante o período de realização do estágio permitiram aquisição de novas habilidades e aprimoramento de outras, sendo de fundamental importância para a carreira profissional da discente.

**Palavras-chaves:** conservação; criopreservação de sêmen; felinos.

## **ABSTRACT**

Due to environmental impacts, a lot of species are suffering from loss habitat, loss of populations and genetic diversity. One alternative to minimize loss of population and genetic diversity it is by using Reproductive Biotechniques. These techniques allow new individuals to be generated and also several samples of different genetic sources be stored for future use. The internship accomplished at The Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife and at Mata Ciliar Association looked for improve skills in the area of assisted reproduction in felines, with focus on neotropical felines. Using the domestic cat (*Felis catus*) as a model, it was possible to perform several evaluations and methodologies linked to Reproductive Biotechnics such as morphological evaluation, conventional slow freeze, ultra rapid freeze, oocyte maturation, *in vitro* fertilization and embryo production. After learning those methodologies, it was possible to develop a seminary related, being possible to collect two individuals of cougar using the techniques of urethral catheterization and Electroejaculation and freeze the ejaculate of one specimen. Other activities could also be done, such as surgery and laparoscopy, clinical attendance of rescued wildlife, conditioning, maintenance of enclosures and educational activities. The experiences during the internship period allowed the acquisition of new skills and also the improvement of others, being really important for the professional career of the intern.

**Keywords:** conservation; semen cryopreservation; felines.

## SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I .....	11
1.1 INTRODUÇÃO .....	11
1.2 DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE ESTÁGIO .....	12
1.3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES .....	15
1.3.1 <i>Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife - CREW</i> .....	15
1.3.1.1 Laboratório de Biologia de Gametas .....	15
1.3.1.2 Laboratório de Endocrinologia .....	21
1.3.1.3 <i>Cat Colony</i> (Gatil) .....	22
1.3.1.4 Outras Atividades .....	22
1.3.2 Associação Mata Ciliar - Setores .....	24
1.3.2.1 Centro Jaguaretê .....	24
1.3.2.2 Clínica e solário .....	27
1.3.2.3 Centro de Reabilitação de Animais Silvestres-CRAS .....	28
1.3.2.4 Administração e Educação Ambiental .....	29
1.3.2.5 Centro de Felinos Neotropicais .....	32
1.3.2.6 Plantão e outras atividades .....	36
2. CAPÍTULO II .....	38
2.1 SEMINÁRIO: CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE ONÇA-PARDA ( <i>PUMA CONCOLOR</i> ) UTILIZANDO DILUIDOR COMERCIAL TRILADYL® .....	38
2.2 INTRODUÇÃO .....	38
2.3 METODOLOGIA .....	39
2.3.1 Indivíduos submetidos ao estudo .....	39
2.3.2 Condicionamento .....	39
2.3.3 Preparação Anestésica .....	40
2.3.4 Método de coleta por cateterização uretral .....	40
2.3.5 Método de coleta por eletroejaculação .....	42
2.5.6 Método de criopreservação .....	42
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	45
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	46

## 1. CAPÍTULO I

### 1.1 INTRODUÇÃO

A medicina veterinária tem um papel fundamental na sociedade atual, contribuindo em diversas áreas para a saúde animal e indiretamente a humana. A área de animais silvestres, ao longo dos anos vem demonstrando sua importância e sua colaboração na vida dos seres vivos, visto que promove melhorias a animais silvestres *in situ* e *ex situ*, melhor conscientização da sociedade sobre o meio ambiente e preservação dos animais. Permite também a realização de estudos sobre as diferentes espécies, evitando maiores danos mesmo com as desenfreadas modificações nos ecossistemas. De acordo com dados obtidos ao longo dos últimos 50 anos, os seres humanos mudaram o ecossistema mais rapidamente que em qualquer outro período da história humana, levando a uma melhoria na qualidade de vida dos homens às custas do meio ambiente gerando sérias consequências (FELIPPE e ADANIA, 2014; MILLENIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT, 2005).

A Medicina da Conservação surgiu em prol dos ecossistemas prejudicados pela ação antrópica na tentativa de resgatar e ou manter as diversas espécies da fauna e flora e dos recursos hídricos, recuperando também aspectos de qualidade de vida dos seres humanos que também foram afetados, considerando toda biodiversidade do planeta igualmente importante (FELIPPE e ADANIA, 2014).

Os avanços na Biotecnologia da reprodução acabaram por agregar mais uma ferramenta à Medicina da conservação, permitindo aos profissionais da área desenvolver bancos de material genético e manter a diversidade de populações quase dizimadas, misturando a genética de animais cativos com animais de vida livre, auxiliando na manutenção de espécies e também na introdução de outros indivíduos (DURRANT, 2014).

As duas instituições em que o estágio foi realizado buscam a promoção da conservação de animais silvestres, utilizando-se de diversas ferramentas para concretizar seus objetivos, porém ambas têm forte papel nos avanços científicos na área da reprodução assistida de felinos silvestres.

## 1.2 DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE ESTÁGIO

A primeira instituição da realização do estágio foi o *Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife* – CREW no período de 01 a 28 de abril de 2019 perfazendo um total de 160 horas das 420 horas previstas na carga horária pré-estabelecida pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

O Centro foi criado em 1981 sendo um local com cientistas de renome mundial que conta com parcerias internacionais de conservacionistas, organizações governamentais e não governamentais para por em prática a missão de salvar espécies com ciência. Pertencente ao Zoológico de Cincinnati, o CREW lidera pesquisas nas áreas de reprodução e conservação de animais e plantas em risco de extinção, atuando em diversas áreas como proteção *in situ*, educação e engajamento das pessoas com a conservação. Para que o trabalho que realizam seja o mais efetivo, assinaram projetos de conservação específicos, os quais focam em determinadas espécies e tornam os avanços com as pesquisas mais proficientes. São eles, plantas excepcionais, rinocerontes, pequenos felinos e urso-polar. Os requisitos para esses projetos são educação, pesquisa, propagação, proteção *in situ* e a espécie estar presente no Zoológico de Cincinnati. No Centro também há a manutenção de um banco de germoplasma, constituído de embriões, sêmen e oócitos preservados, utilizado para manter a variabilidade genética das populações trabalhadas.

Por manterem um banco de germoplasma, o CREW também tem parcerias com universidades americanas para manutenção de material genético para estudos de doenças que se desenvolvem tanto em felinos quanto em seres humanos, mantendo um pool grande de gametas contendo os genes específicos das doenças à disposição dos pesquisadores para quando for necessário. Conta com uma Equipe de três diretores, sendo uma Diretora Geral, um Diretor de Pesquisa Animal e uma Diretora de Pesquisa de Plantas além de diversos pesquisadores associados. Na Equipe de felinos, participam o Diretor de Pesquisa Animal, uma pesquisadora médica veterinária, uma pós doutoranda e duas pesquisadoras associadas.

A segunda instituição foi a Associação Mata Ciliar- AMC, no período de 02 de maio a 19 de junho de 2019 totalizando 260 horas das 420 horas previstas na carga horária pré-estabelecida pela UFRPE. A AMC é uma entidade sem fins lucrativos, que nasceu em 1987, preocupada com a conservação dos cursos hídricos no interior de São Paulo, que naquela época já sofria os impactos da falta de conscientização da população e de planejamento do poder público. No ano de 1997, a AMC instituiu o Centro de Reabilitação de Animais

Silvestres (CRAS) e o Centro para Conservação de Felinos Neotropicais (Centro de Felinos) começando trabalhos com a fauna.

A entidade possui Sede Administrativa e Coordenadoria de Flora localizada na cidade de Pedreira-SP onde também se localiza o Zoo Bosque de Pedreira. Em Jundiaí-SP, encontram-se a Coordenadoria de Fauna e Educação Ambiental, CRAS e o Centro de Felinos.

Afim de atingir seus objetivos de conservação da Flora, Fauna e Recursos hídricos, a Associação Mata Ciliar se empenha em projetos de Educação Ambiental para todas as idades, cumprindo cronogramas que atinjam o máximo de pessoas. Aos sábados, também acontece visitas abertas ao público em geral guiada por voluntários treinados para falar sobre o trabalho desenvolvido pela AMC.

A AMC possui convênio com as Prefeituras de Valinhos, Bragança Paulista, Vinhedo, Itatiba, Indaiatuba, Louveira e Pedreira, que apoiam a instituição com recursos para a manutenção dos animais, que atualmente tem em torno de 850 animais, e o programa de educação ambiental. A AMC divide em setores suas atividades facilitando a atuação dos profissionais e estagiários permitindo que todos acompanhem as diversas atividades. A equipe sempre muda bastante em quantidade, mas no momento é composta por um diretor, uma coordenadora de fauna, cinco técnicas, doze tratadores, quatro estagiários remunerados, dois administradores, dois educadores ambientais, uma cozinheira, três de serviços gerais e uma auxiliar.

Ambos os locais de estágio possuem parceria de longa data na área de pesquisa com técnicas reprodutivas de felinos neotropicais, obtendo grandes feitos como a "Lua", primeira jaguatirica (*Leopardus pardalis*) de proveta nascida de uma barriga de aluguel utilizando embrião congelado no Brasil. Outro feito foi o aperfeiçoamento de técnicas de reprodução assistida em onças-pintadas (*Panthera onca*) como a utilização de cateter uretral para coleta de sêmen, protocolo de vitrificação e novo meio para criopreservação de sêmen. Além disso realizaram procedimento de laparoscopia para inseminação no oviduto em fêmeas de onça-pintada que gerou o primeiro filhote de onça pintada do mundo produzido por inseminação artificial (IA) nascido, em fevereiro de 2019 (ASSOCIAÇÃO MATA CILIAR, 2019; TUDO COM VOCÊ, 2019).

Em suma, com o objetivo de aprimorar habilidades na área de medicina de animais silvestres e também nas biotécnicas reprodutivas utilizadas em felinos, foi realizado o estágio nas duas instituições.

### 1.2.1 Localização

*Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife* (Figura 1) recebe profissionais e estudantes de todos os países para divulgação de conhecimento e realização de pesquisas. Encontra-se localizado na rua 3.400 Vine, na cidade de Cincinnati, Estado de Ohio, CEP: 45220 Dentro das facilidades do Zoológico de Cincinnati.

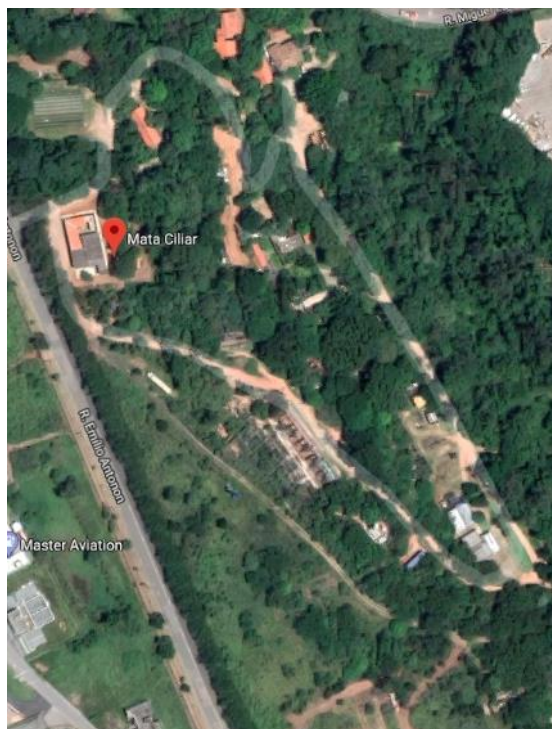
Figura 1. Mapa da área do Zoológico de Cincinnati, mostrando no círculo vermelho as facilidades do *Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife*.



Fonte: Google Maps (2019).

Associação Mata Ciliar recebe estudantes de diversas áreas e localidades, principalmente os que estão realizando o estágio curricular. Está localizada na Av. Emílio Antonon, número 1000, Chácara Aeroporto em Jundiaí -SP, CEP 13212-010 (Figura 2).

Figura 2. Mapa da área da Associação Mata ciliar em Jundiá.



Fonte: Google Maps (2019).

## 1.3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

### 1.3.1 *Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife - CREW*

#### 1.3.1.1 Laboratório de Biologia de Gametas

Neste laboratório as atividades desenvolvidas são sempre relacionadas ao processamento e avaliação de amostras de sêmen, ovócitos, citologia vaginal e outras avaliações reprodutivas. Também era onde se produzia os meios utilizados nos diversos protocolos de pesquisas e se mantinha o banco de germoplasma, ficando este em um espaço anexo dividido por uma parede que também tinham outros equipamentos diferenciados.

Foi demonstrado inicialmente os protocolos utilizados para avaliação de sêmen, congelamento método tradicional e o método ultrarrápido ou vitrificação realizado pelos pesquisadores do CREW para felinos. Foram acompanhados os procedimentos com auxílio da equipe. Inicialmente foi treinado a avaliação morfológica de amostras de sêmen fixadas em uma substância chamada glutaraldeído, de jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-pescador

(*Prionailurus viverrinus*), onça-pintada (*Panthera onca*), leopardo-de-amur (*Panthera pardus orientalis*), lince-canadense (*Lynx canadensis*) e gato-bravo-de-patas-negras (*Felis nigripes*).

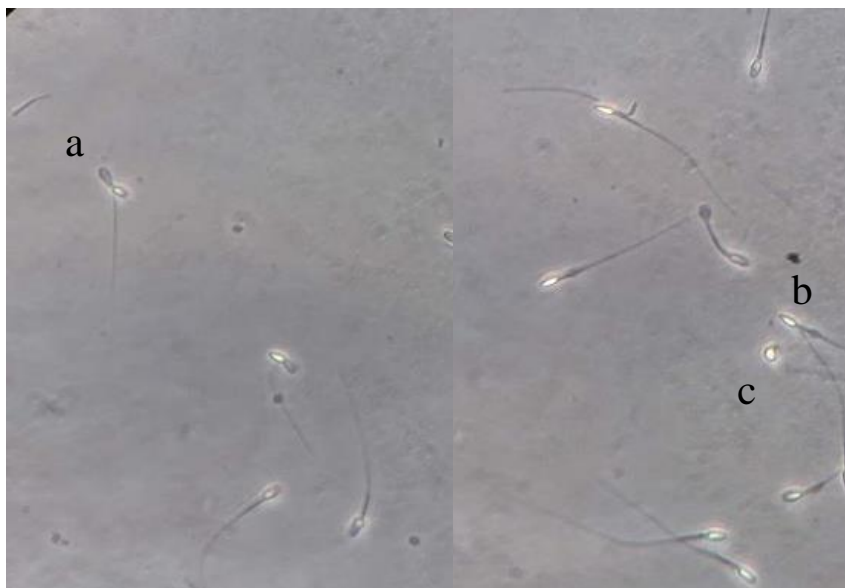
De forma ilustrativa, a avaliação obtida encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação morfológica realizada de várias amostras de felídeos silvestres previamente coletadas pela equipe do CREW descritas em porcentagem e com um n=100.

Amostra	Espermatozoide	Espermatozoide	Anormalidades	Anormalidades	Variados
	Normal	Anormal	Primárias	Secundárias	
<b>Jaguatirica</b>	65	35	10	25	1
<b>Leopardo-de-Amur</b>	10	90	66	29	1
<b>Gato-pescador</b>	18	82	63	28	-
<b>Onça-pintada</b>	19	81	44	37	-
<b>Gato-bravo-de-patas-negras</b>	38	62	47	15	-

A avaliação consistia em computar anormalidades primárias, secundárias e variados. As anormalidades primárias correspondem à anormalidades de cabeça (macrocefálico, microcefálico, bicefálico), a crossoma anormal, peça intermediária anormal, sem peça intermediária, biflagelado e cauda fortemente enrolada ou dobrada (Figura 3). As secundárias são peça intermediária dobrada, peça intermediária dobrada com gota citoplasmática, cauda dobrada, gota citoplasmática proximal e distal, sendo de menor impacto pois prejudicam menos na função do espermatozoide na sua capacidade de fecundar um oócito. Variados engloba a presença de outras células, espermátides e outras estruturas que possam vir a ser importante na avaliação como cabeças isoladas. As anomalias primárias têm maior impacto na qualidade do sêmen e, conseqüentemente em seu julgamento, pois estão relacionadas ao desenvolvimento no epitélio seminífero enquanto as anomalias secundárias estão relacionadas a processos não fisiológicos (como processos inflamatórios do epidídimo e dor), que podem ocorrer desde o epidídimo até o momento da ejaculação (ARRUDA et al., 2015; JOHNSTON, KUSTRITZ e OLSON, 2001).

Figura 3. Exemplos de alterações encontradas durante avaliação morfológica; a. cauda fortemente enrolada; b. gota citoplasmática proximal; c. macrocefalia.



Fonte: Arquivo pessoal.

É notório a diferença de uma avaliação morfológica de uma espécie felina para outras espécies de produção, cuja qualidade estimada do ejaculado é muito maior. Na família Felidae é comum observar uma grande ocorrência de teratospermia, isto é alta incidência de animais apresentando mais de 60% de anormalidades espermáticas (HOWARD, 1993; VILLAVERDE et al. 2008).

Em seguida foi treinado o método de criopreservação tradicional ou lenta e o método de congelamento ultrarrápido ou vitrificação. Esse processo foi feito após a colheita manual com vagina artificial (Figura 4) de um gato doméstico habituado ao procedimento.

Figura 4. Vagina artificial para colheita de sêmen em gato doméstico.



Fonte: Arquivo pessoal.

Em seguida o sêmen foi mantido aquecido enquanto era inicialmente processado, sendo os primeiros passos marcar a hora em que foi colhido, volume do ejaculado, motilidade (%) e vigor (1-5). Retirou-se uma alíquota para fixar em glutaraldeído para avaliação morfológica posteriormente. Glutaraldeído é uma substância utilizada para manter a viabilidade morfológica de uma amostra de sêmen podendo ser utilizada posteriormente se mantida refrigerada. Em seguida calculou-se a diluição a ser feita dependendo da qualidade do sêmen (motilidade e vigor) e também o volume. Após esta etapa, adicionou-se o meio elaborado pelos próprios pesquisadores do CREW, chamado *Feline Optimized Culture Media* (FOCM), o qual foi criado após laboriosa investigação sobre as substâncias que afetam positivamente e negativamente o ejaculado felino (HERRICK et al.,2007). Retirou-se uma alíquota para avaliar motilidade (0-100%) e vigor (1-5), e uma alíquota para fazer a contagem utilizando um hemocitômetro. Em seguida calculou-se a concentração de espermatozoides móveis por mililitro e o total de espermatozoides móveis na alíquota colhida. Sendo assim, foi possível calcular quantas palhetas e também a quantidade de diluidora ser adicionado. O volume final foi dividido para que se pudesse realizar os dois métodos já mencionados.

Para o cálculo do diluidor considerou-se o volume final (após retirada de todas as alíquotas para avaliação) multiplicado pela quantidade de espermatozoides móveis por mililitro obtendo-se o volume de diluente a ser adicionado. Para calcular a quantidade de palhetas foi só dividir pela quantidade a ser preenchida da amostra, no caso do protocolo utilizado, 30 $\mu$ L. Neste estudo foi possível congelar três palhetas.

Já pelo método de congelamento ultrarrápido foi possível produzir 3 pellets. Este método é mais rápido e simples, sendo feito gotas de 30 $\mu$ L despejadas diretamente no nitrogênio líquido.

Realizou-se também a avaliação de acrossoma, durante o processamento, removeu-se 4  $\mu$ L e fez-se um esfregão em lâmina e deixando-a para secar. Após ter secado, foi feito o protocolo a base de iodeto de propídio (IP) e aglutinina de *Arachis hypogaea* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA). A lâmina foi levada sob microscópio de fluorescência para análise, constatando o seguinte resultado para o animal estudado (Tabela 2):

Tabela 2. Resultado da avaliação do acrossoma do ejaculado do gato doméstico colhido.

<b>Criopreservação</b>	<b>Antes</b>	<b>Depois</b>
<b>Integro</b>	52	05
<b>Danificado</b>	130	130
<b>Solto</b>	18	65

Com o ejaculado congelado ainda foi possível produzir embriões. Para isso foi necessário colher oócitos de ovários provenientes de clínicas particulares. Em seguida foram selecionados quanto sua qualidade e maturados por 24 horas (Figura 5).

Figura 5. Oócitos de gatas domésticas maturados para realização de fertilização *in vitro*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Depois as células do *Cumulus oophorus* foram retiradas utilizando pipeta de Pasteur. Os oócitos maturados (20 em uma gota e 21 em outra) foram transferidos para duas gotas de um meio específico do FOCM para fertilização *in vitro* e os espermatozoides previamente descongelados acrescentados às gotas. A avaliação feita em relação aos espermatozoides foi na hora que foram colocados nas gotas contendo os oócitos, 2 horas depois, 4 horas depois, 6 horas e 24 horas, sendo que após 24 horas espera-se que todos estejam mortos como normalmente seria no útero. Os possíveis embriões ficaram na incubadora por mais quatro horas e então foram avaliados primeiramente sob microscópio estereoscópio binocular quanto às divisões celulares. Depois eles foram corados e lâminas foram montadas e analisadas sob o microscópio de fluorescência. Como resultado, foram produzidos quatro embriões; cinco degeneraram e o restante (29 oócitos) não viraram embrião.

Além dessas atividades foi possível acompanhar a colheita *pós mortem* de sêmen de um rinoceronte proveniente de um zoológico que acabou falecendo durante o período do estágio. Foi visto como se processou a colheita de sêmen dos testículos refrigerados, utilizando uma seringa e uma sonda. Utilizou-se um diluidor a base de gema de ovo, e em seguida foi feito o protocolo de criopreservação que consistia em diluir 1:1 da amostra obtida com o diluidor, avaliar quanto motilidade e vigor, retirar uma alíquota para contagem e

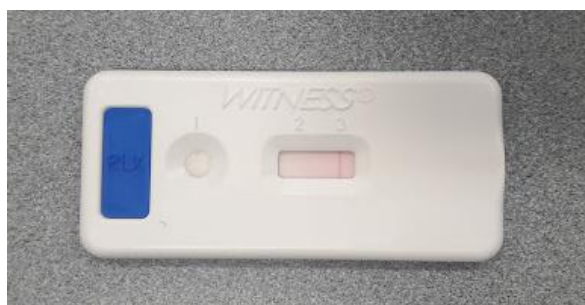
posterior avaliação de acrossoma. Em seguida a amostra foi centrifugada e removido o sobrenadante. Adicionou-se o crioprotetor glicerol, e fez-se o envase do sêmen nas palhetas, ficando uma hora à temperatura de 4<sup>o</sup> C e após este passo, foram colocados em botijão de nitrogênio de transporte carregado.

### 1.3.1.2 Laboratório de Endocrinologia

No laboratório de endocrinologia eram realizadas as avaliações hormonais por meio principalmente de amostras fecais obtidas diariamente por pelo menos um ciclo (tempo depender da espécie) nas fêmeas e, nos machos, o período dependia do intuito do monitoramento. Para tal, eram utilizados kits de Elisa para os hormônios progesterona, estradiol e testosterona. Raramente eram utilizadas outras amostras biológicas para este tipo de avaliação como por exemplo saliva ou sangue. Contudo, o laboratório também era equipado para a análise de outras amostras biológicas. O processo era realizado após a colheita de amostras fecais, sendo estas postas em um liofilizador e depois batidas para virar pó. Este pó era pesado para estar entre 0.245g e 0.255g que era a variação cabível as soluções que iam ser utilizadas posteriormente. Depois de extrair as substâncias das fezes, o líquido era processado e colocado nos kits de Elisa a depender do hormônio que se tinha interesse de avaliar. E depois de ocorrer a reação era posto num equipamento de leitura que apontava os resultados. Para poder avaliar a resposta hormonal de um ciclo ou mais, se juntavam várias leituras e utilizando o programa *Excel* criavam-se gráficos podendo ser visualizados o comportamento do ciclo hormonal.

Ainda foi possível acompanhar um teste rápido para gravidez de um gato-de-pallas (*Otocolobus manul*) utilizando a urina do animal em um kit próprio para esta finalidade (Figura 6).

Figura 6. Teste rápido utilizado para gravidez em gato-de-pallas (*Otocolobus manul*).



Fonte: Arquivo pessoal.

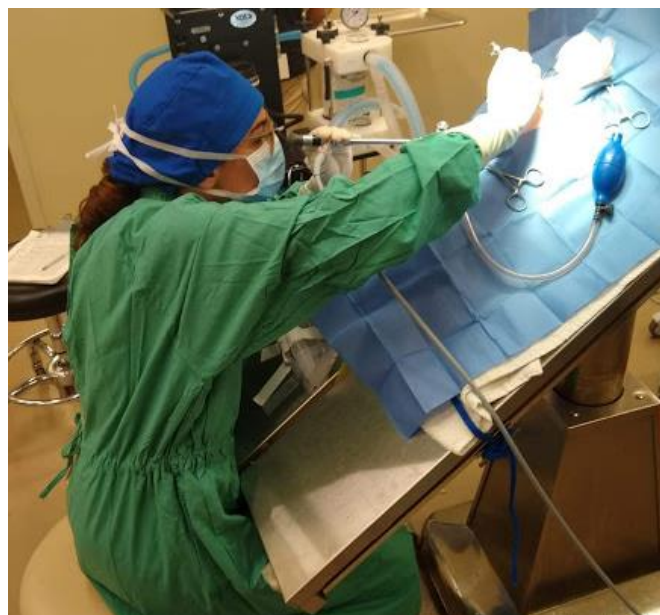
### 1.3.1.3 *CatColony* (Gatil)

O gatil do CREW era composto por variados grupos de gatos, em salas separadas, e também separados por sexo. Os gatos mantidos eram para uso exclusivo nas pesquisas relacionadas a reprodução (modelo para as outras espécies de felinos), métodos alternativos de castração e quando necessário para pesquisas genéticas ligadas a outros grupos em distintas universidades. Foi possível conhecer alguns gatos decorrentes de inseminações artificiais bem-sucedidas e acompanhar o início do treinamento de alguns gatos por intermédio de condicionamento operante.

### 1.3.1.4 Outras Atividades

Com a finalidade de aprendizado, foi realizada a laparoscopia para inseminação artificial e aspiração folicular em duas gatas domésticas (Figura 7). A técnica consistia em depositar a amostra de sêmen o mais próximo do oviduto, minimizando o volume e a concentração de espermatozoides necessários para a inseminação, sendo uma técnica menos invasiva. A aspiração foi realizada com cateter intravenoso, puncionando a região mais próxima do local do ovário e então acoplou-se uma seringa de 1 mililitro e aspirou-se os folículos.

Figura 7. Realização de laparoscopia para inseminação próxima ao oviduto em gata doméstica.



Fonte: Arquivo pessoal.

Entretanto durante o procedimento foi avaliada alterações na anatomia do útero (espessamento da mucosa e aumento de volume) de ambas as gatas e foi decidido que seriam submetidas a castração. Na semana seguinte, foram realizadas as castrações de ambas as gatas, sendo possível aprimorar mais a técnica de castração em felinos (Figura 8).

Figura 8. Castração de uma fêmea de gato doméstico.



Fonte: Arquivo pessoal.

Somado a todas estas experiências, ainda foi possível conhecer algumas pesquisas em desenvolvimento pelos cientistas do CREW. A primeira com colheita de sêmen de lince canadense para caracterização (classificado como menor preocupação pela *International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red list*, (2014) onde uma pós-doutoranda realizou as colheitas e buscou adequar os protocolos para os lincos (Figura 9). Outra pesquisa acompanhada foi o desenvolvimento de um método de castração utilizando radiação. A expectativa futura é que se este método funcionar gatos de rua possam ser esterilizados com maior facilidade sem necessidade de um procedimento mais invasivo como uma cirurgia de castração ou vasectomia.

Figura 9. Colheita de sêmen em lince-canadense (*Lynx canadensis*). Na foto a pós doutoranda, Raquel Gonzales, que realizava a pesquisa e a técnica Amy Miller.



Fonte: Arquivo pessoal.

### **1.3.2 Associação Mata Ciliar - Setores**

#### **1.3.2.1 Centro Jaguaretê**

Local onde localiza-se a Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), o centro cirúrgico, o aparelho de radiografia, laboratório de análises clínicas e a sala de monitoramento. Este setor contava com um técnico veterinário, um estagiário apenas para o laboratório de análises clínicas e revelação dos filmes radiográficos e um tratador.

No centro cirúrgico se realizavam cirurgias e procedimentos mais complexos como o próprio exame de radiografia, que em animais silvestres geralmente era necessário sedação ou anestesia geral.

Na sala de monitoramento ficavam os computadores ligados as câmeras de monitoramento que existem na AMC, permitindo o acompanhamento do comportamento dos animais e a realização de trabalhos relacionados ao comportamento animal.

No laboratório de análises clínicas ficavam os materiais necessários para processamento de amostras de sangue e de fezes. Também ficava a sala de revelação dos filmes radiográficos. E ainda, adjacente a ele ficava a sala de preparação cirúrgica onde no momento encontram-se os botijões de nitrogênio líquido com amostras de sêmen de animais silvestres.

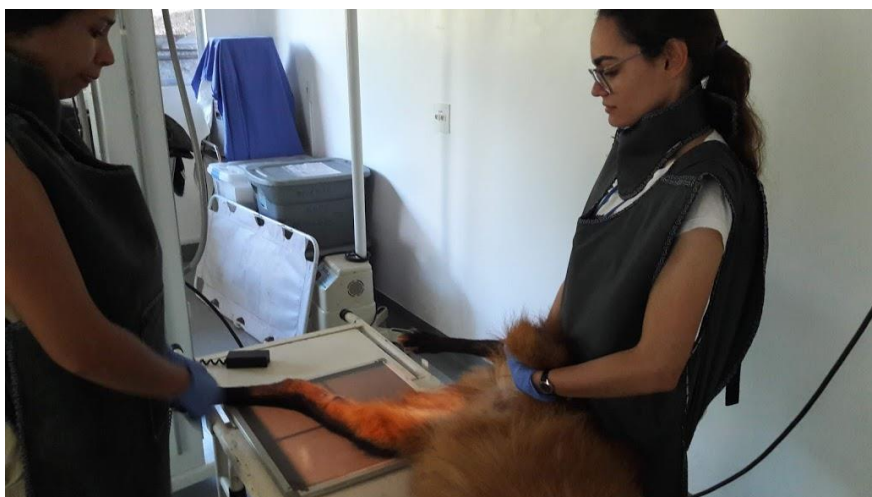
Ainda neste prédio tinha um local reservado para esterilização dos materiais cirúrgicos onde sempre eram esterilizados para as cirurgias a serem realizadas.

Durante as manhãs eram feitos os medicamentos e alimentações dos animais da UTI, que geralmente eram animais que tinham feito cirurgia, apresentavam algum problema mais grave ou filhotes que necessitavam de cuidados mais frequentes e a limpeza do local em que ficavam, troca a água e do substrato (jornal ou feno).

Foi possível acompanhar o manejo de alimentação de papa por meio de sonda de três rolinhas (*Columbina talpacoti*) internadas, filhotes, que acabaram morrendo durante a semana. Antes da última morrer, foi possível diagnosticar cáseos na cavidade oral suspeitando-se que tenham sido desenvolvidos pelo parasita tricomonas. Foi feita a transferência de uma gata-maracajá (*Leopardus wiedii*) que estava em observação para um dos recintos do centro de felinos. Foi recebida uma arara-piranga (*Ara macao*) do plantel do CRAS que estava apática, sendo relatado pela tratadora que ela estava sendo privada de comer pelas outras aves. Foi realizado exame físico constatando acaquexia e apenas no dia do recebimento foi feita terapia de suporte com solução fisiológica e Bionew (repositor de vitaminas, minerais e frutose) por via subcutânea.

Outro caso acompanhado foi o exame radiográfico de um lobo-guará apelidado Tambaú, com suspeita de fratura embasada pelo relato do tratador do setor que notou que o animal claudicava. O animal foi contido em caixa de transporte e levado até o Jaguaretê, lá foi feita anestesia e após efeito o animal foi pesado, e levado a mesa de radiografia (Figura 10). Foi possível realizar o monitoramento anestésico e a colheita de amostras de sangue do animal. O animal já apresentava um histórico de chegada a AMC de grave atropelamento tendo passado por diversas cirurgias ortopédicas para correção das fraturas e possui pinos em ambos os membros pélvicos. Na radiografia constatou uma linha de fissura, sendo feito protocolo com anti-inflamatório não esteroideal (AINE) e analgésico.

Figura 10. Realização de exame radiográfico em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) Tambaú.



Fonte: Arquivo pessoal.

Outro animal do plantel, dessa vez uma jaguatirica foi levada até o Jaguaretê, pois apresentou edema na região da face. Ela foi anestesiada sendo feita a avaliação da cavidade oral. Constatou-se duas perfurações na região da gengiva da mandíbula. Foi feita a drenagem do conteúdo purulento e lavagem (Figura 11) com solução fisiológica e clorexidine à 0,2%, foi instituído o tratamento medicamentoso com antibiótico e AINE e retornou o animal para o seu recinto sob tratamento e observação da melhora.

Figura 11. Médicas-veterinárias fazendo a limpeza do abscesso em jaguatirica (*Leopardus pardalis*).



Fonte: Arquivo pessoal.

Outro caso foi de uma maritaca (*Psittacara leucophthalmus*) que estava na clínica e começou a ficar apática, sendo trazida ao centro Jaguaretê, para receber oxigênio e terapia de suporte com solução fisiológica via subcutânea e glicose via oral. Depois de mais ou menos 40 minutos a ave estava melhor e foi feita papa via sonda e ficou em observação.

Coincidiu de um grupo de pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP), em parceria com a AMC vir realizar vasectomia de uma capivara macho, como parte do projeto de pesquisa relacionado a métodos de castração em capivaras com o intuito de controlar populações aos arredores da cidade que pode ser acompanhado pela estagiária.

### 1.3.2.2 Clínica e solário

Na clínica é onde ocorre a triagem dos animais recém-chegados. Primeiramente era feita a documentação do recebimento do animal e em seguida este animal era avaliado quanto a suas condições de saúde. Se estivesse com alguma enfermidade ficava na clínica em tratamento. Se estivesse saudável e apto para ser solto, era encaminhado imediatamente para a soltura. Se estivesse com suspeita de fratura ou doença mais grave ou até fosse um filhote precisando de maiores cuidados, este era encaminhado para o Centro Jaguaretê. Neste local o estagiário estava sempre acompanhado de um técnico veterinário para a realização dos exames médicos e demais procedimentos. Quando o tratamento de um animal acabava e ele se encontrava em bom estado era encaminhado para um recinto de reabilitação apropriado do CRAS ou se ainda fosse necessária uma observação, para o Solário.

A rotina consistia em realizar os tratamentos da manhã, limpeza das gaiolas, troca das águas, alimentação dos animais, por todos os passeriformes para fora para tomar sol, e o mesmo se repetia com o Solário, limpeza, troca das águas e alimentação.

Poucos animais estavam em tratamento no início do estágio na clínica. Um gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) tratando de um acidente e uma corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) terminando um tratamento no olho esquerdo. Uma macaca-sauá (*Calicebus personatus*) do plantel foi diagnosticada com miíase e iniciou-se o seu tratamento imediatamente, entretanto a resposta não foi positiva e ela acabou morrendo no dia seguinte. Houve a morte de oito maritacas que estavam em observação na clínica para irem ser soltas. Foi realizada a necropsia e relatado alteração no fígado e palidez. Também foram visualizados presença de piolho nas aves e foi feito o tratamento tópico de todas com Fipronil.

Um veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) que tinha chegado no plantão foi transferido para um recinto pois estava ficando em pé, entretanto apresentava sinais de miopatia de captura. Posteriormente foi informado que ele faleceu. A miopatia de captura ou também conhecida como "síndrome do estresse" é de comum ocorrência nos animais silvestres que são considerados presas sendo induzida pelo estresse da captura, contenção, transporte desses animais (LANNES et al. 2010).

Chegou uma rolinha com movimentos limitados nas patas e ficou em observação. Chegou um gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) com histórico de atropelamento, apresentando fratura em fêmur, língua cortada na horizontal quase que inteira e fraturas na cauda. Foi levado para o centro cirúrgico do Jaguaretê, onde foi removido a parte praticamente solta da língua que já estava necrosando, limpeza da boca e feita uma tala no fêmur. Chegou um ouriço-cacheiro (*Coendou prehensilis*) com histórico de ataque de cão, apresentando ferimentos leves, foi iniciado tratamento com dexametasona na dose de choque e depois AINE e antibiótico. Por último, chegou uma seriema acidentada e também foi feito tratamento com AINE e antibiótico.

### **1.3.2.3 Centro de Reabilitação de Animais Silvestres-CRAS**

A AMC conta com um CRAS onde possui uma variedade de espécies em reabilitação e também que dificilmente podem ser reabilitadas. Essa controvérsia existe devido a quantidade de animais que o CRAS possui e a variedade de histórico sendo que por exemplo, animais que foram criados por pessoas dificilmente conseguem se adaptar novamente ou animais mutilados (cego, sem um membro, sem uma asa, entre outros) e acabam por não conseguirem ser reabilitados permanecendo sob cuidados humanos. Este setor divide-se em CRAS aves e CRAS mamíferos.

A rotina neste centro consistia em manutenção dos recintos, como limpeza, troca da água, enriquecimento e também a alimentação que por ter uma variedade de espécies foi possível assimilar a dieta alimentar de cada animal e rendeu um aprendizado muito grande. Também foi visto a contenção física de um tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*) (Figura 12) e um jacu-açu (*Penelope obscura*) para fazer vermifugação.

Figura 12. Exemplar de tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*) que foi vermifugado no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres da Associação Mata Ciliar.



Fonte: Arquivo pessoal.

No decorrer também estava em tratamento a loba-guará "Serrana" que chegou na AMCa tempos tomada por sarna e, no período que foi acompanhado o setor, ainda estava sendo medicada com Pelo e Derme da Vetnil® um composto de ácidos graxos essenciais, biotina e zinco. O animal já estava saudável, apenas recuperando o peso e os pelos.

#### **1.3.2.4 Administração e Educação Ambiental**

Neste setor, na parte administrativa aprendemos a mexer nas diferentes documentações necessárias a Instituição. Também era o local onde selecionava os animais aptos para soltura e também quando necessário o resgate de animal, geralmente este é realizado quando a Guarda municipal ou o Corpo de Bombeiros está inapto para fazer o resgate seja pela demanda ou por envolver alta periculosidade. O atendimento ao munícipe também é realizado neste setor.

A ONG utiliza do sistema SIGAM (Sistema integrado de Gestão Ambiental), um sistema que facilita o registro, controle e fornecimento de informações sobre os processos e documentos relacionados às atividades da Secretaria do Meio Ambiente e os órgãos a esta vinculados.

Dentro desse sistema há a plataforma do GEFAU (Gestão Ambiental da Fauna de São Paulo), que viabiliza o gerenciamento das atividades relacionadas a fauna silvestre em SP mantendo juntamente um grande banco de dados sobre as instituições e animais registrados neste sistema (Figura 13).

Figura 13. Site do Sistema Integrado de Gestão de Fauna Silvestre - SIGAM, Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do estado de São Paulo.



Fonte: [www.sigam.gov.sp.br](http://www.sigam.gov.sp.br)

A Educação Ambiental funciona como um pilar para a AMC. Com esta metodologia eles buscam sensibilizar as próximas gerações a cuidar do meio ambiente, mostrando exemplos de como nossas ações interferem na natureza. Durante a semana ocorriam as visitas geralmente das escolas dos municípios conveniados e também ocorria de receberem escolas particulares. Aos sábados as visitas agendadas à tarde eram destinadas ao público interessado em conhecer mais sobre o trabalho da ONG, sendo agendada pelo site [www.mataciliar.org.br](http://www.mataciliar.org.br) onde se pedia apenas donativos em troca. Aos finais de semana também ocorriam eventos com empresas particulares, de forma menos frequente, que tinham interesse em aprender e contribuir com o trabalho feito pela AMC.

O roteiro básico das visitas era sempre iniciado na sala de Educação Ambiental onde tem banners informativos, Animais taxidermizados e mesas com bancos. A história da Associação Mata Ciliar era contada falando que surgiu para preservar as matas ciliares dos rios que naturalmente é uma mata que protege os cursos de água. Se esclarecia a diferença de um zoológico para um CRAS e também eram feitas orientações para a visita guiada pelos recintos, como fazer silêncio, tanto para escutar o educador quanto para não estressar e ou assustar os animais, não correr para não ocorrer acidentes, entre outras.

Ao sair da sala de Educação Ambiental, formavam-se dois grupos com no máximo 15 pessoas em cada e os grupos iniciavam em caminhos opostos, mas passavam pelos mesmos setores e locais. Dito isto, estes eram viveiro de mudas, onde se explicava a finalidade de produzir mudas de plantas nativas para reflorestar locais de matas ciliares ou até para projetos de extensão rural. Escultura de um pássaro feito de gaiolas, local onde se falava sobre a importância ecológica dos pássaros e outros animais e enfatizava aos visitantes que o local de animais silvestres não preso em gaiolas. Neste ponto também se falava da história da loboguará apelidada "Serrana" que chegou ao CRAS tomada por sarna, debilitada, uma doença comum a animais domésticos que a loba acabou adquirindo por se aproximar demais de uma área urbanizada.

Seguindo o trajeto, mostrava-se a entrada da clínica e sua função, a cozinha e a área de desinfecção, o bosque, local que pertence ao CRAS e abriga diferentes espécies, onde suas histórias eram contadas, bem como características da espécie e sua função ecológica. Mostravam-se os recintos de reabilitação dos passeriformes, dos tucanos e dos psitacídeos, o centro Jaguarê e explicava sua função. Por último ficavam os macacos pregos e os felinos, que também se falava suas histórias e importância na natureza, retornando a sala de educação ambiental para finalizar a visita mostrando 🐾 animais taxidermizados e enfatizando pontos importantes da visita (Figura 14).

Figura 14. Monitoramento de visita de uma turma de terceiro ano de escola municipal de Jundiaí-SP.



Fonte: Arquivo pessoal.

Também neste setor ficávamos de prontidão para cuidar de filhotes, ocorrendo de chegar um filhote de gato-do-mato-pequeno (Figura 15) que necessitou apenas que fosse feita a alimentação, água e estimulação para fazer as excreções.

Figura 15. Alimentação de filhote de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*).



Fonte: Arquivo pessoal.

### 1.3.2.5 Centro de Felinos Neotropicais

No centro de felinos localizado na AMC a prática se dividiu em pequenos felinos e grandes felinos sendo estes as nove espécies de felinos existentes no Brasil, gato-do-mato-pequeno, gato-macambira (*Leopardus tigrinus*), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroy*), gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*), gato-maracajá, jaguatirica, onça-parda (*Puma concolor*) e onça-pintada (*Panthera onca*), onde os dois últimos são os grandes felinos mais uma Leoa (*Panthera leo*) (Figuras 16, 17, 18 e 19). Este local tem por finalidade a conservação destas espécies e contribuir com pesquisas relacionadas a conservação, sendo um centro de referência no Brasil.

Figura 16. Onça-pintada (*Panthera onca*) "Tabatinga" residente da Associação Mata Ciliar.



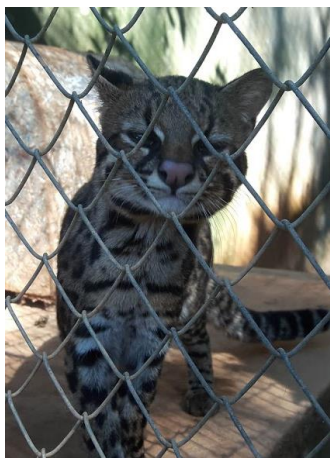
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 17 e 18. Gato-palheiro (*Leopardus colocolo*) à esquerda e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) à direita residentes da Associação Mata Ciliar.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 19. Gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*) residente da Associação Mata Ciliar.



Fonte: Arquivo pessoal.

Os recintos dos pequenos e grandes felinos eram divididos em mais recintos alocando a depender da espécie um único indivíduo, duplas ou trios. Todos os recintos apresentam cambejamento e corredor de segurança para facilitar e assegurar os tratadores, técnicos e estagiários para quando fosse necessário a realização de algum manejo ou limpeza do local.

Nos grandes felinos existem cinco recintos maiores (Figura 20) que são utilizados para enriquecimento dos animais, sendo permutado cada animal por um período de acordo com escala estabelecida pelo tratador e técnico. O centro de felinos ainda conta com um recinto de reabilitação com mais de 3.000m<sup>2</sup>.

Figura 20. Recinto maior destinado aos grandes felinos na Associação Mata Ciliar.



Fonte: Arquivo pessoal.

Todos os recintos são ambientados com poleiros, vegetação ou substrato, pedras, afim de proporcionar melhor bem-estar e diminuir condições de estresse. Como a AMC recebe visitas guiadas, os animais também têm em seus recintos pontos de fugas para que o animal se sinta mais confortável. Rotineiramente é realizado algum tipo de enriquecimento com todos os felinos. Comumente foi utilizado o enriquecimento alimentar, onde foram ofertados em "bolsas de capim" penduradas (Figura 21) ou o enriquecimento olfatório, onde espalhou-se canela em pó pelo recinto. Somado a isso a alimentação diária e manutenção dos recintos foi acompanhada em ambas subdivisões, pequenos e grandes felinos.

Figura 21. Enriquecimento alimentar realizado com exemplar de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) residente da Associação Mata Ciliar.



Fonte: Arquivo pessoal.

Outra atividade acompanhada foi o condicionamento de alguns grandes felinos realizados sempre que possível uma vez ao dia na hora da alimentação. Para tal, foi utilizada uma jaula de prensa, que facilita o manejo dos animais quando necessária troca de recinto, procedimentos veterinários e ou contenção química (Figura 22).

Figura 22. Jaula de prensa utilizada para condicionamento dos grandes felinos.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 1.3.2.6 Plantão e outras atividades

A cada quinze dias fazemos plantão na AMC, sendo feito apenas a alimentação e troca das águas dos demais setores, e a clínica e o jaguaretê também se faz a troca do substrato e as medicações. Durante os plantões realizados, houveram a chegada de um veado-catingueiro atropelado, porém com apenas ferimentos leves, um bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) que foi encontrado no acostamento, hígido, uma lebre (*Lepus europaeus*) atropelada (Figura 23) e um ouriço-cacheiro atropelado. Este último foi radiografado averiguando que sua coluna vertebral estava fraturada sendo feito a eutanásia. A lebre também foi eutanasiada pois tinha ferimentos graves e era um animal exótico. O veado posteriormente veio ao óbito devido ao estresse sofrido. Já o bicho-preguiça foi solto na área de Mata Atlântica preservada de Jundiáí, Serra do Japi.

Figura 23. Aplicação de medicamento analgésico cloridrato de tramadol em Lebre (*Lepus europaeus*).



Fonte: Arquivo pessoal.

Outra atividade presenciada foi realização de educação ambiental em 4 escolas municipais em Bragança-SP, cidade próxima de Jundiáí que é conveniada com a AMC. Nas escolas, para as turmas do trêsanos foram feitas atividades lúdicas e conscientização da importância do meio ambiente como todo, explicando a função ecológica de alguns animais taxidermizados que foram transportados até as escolas (Figura 24).

Figura 24. Apresentação de casco de jabuti (*Chelonoidis carbonaria*) às crianças do terceiro ano de escola municipal em Bragança-SP.



Fonte: Arquivo pessoal.

## 2. CAPTULO II

### 2.1 SEMINÁRIO: CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE ONÇA-PARDA (*PUMA CONCOLOR*) UTILIZANDO DILUIDOR COMERCIAL TRILADYL®

#### 2.2 INTRODUÇÃO

A onça-parda é o segundo maior felino do Brasil, perdendo apenas para a onça-pintada. Ocorre em uma ampla área, desde o Canadá até a região meridional da Cordilheira dos Andes, habitando todos os biomas do Brasil. Devido a isso este animal é considerado um dos mamíferos ocidentais mais bem distribuídos do mundo, sendo bem adaptado a diversos biomas. Há cada vez mais relatos de sua aproximação nas cidades, sendo comumente vítimas de atropelamento nas rodovias (ICMBIO, 2014). O International union for Conservation of Nature - IUCN (2015) enquadra a espécie no status de conservação de menor preocupação (Least concern).

No geral, as espécies que vem sofrendo diminuição acentuada tendem ao endocruzamento e conseqüentemente aumento da consanguinidade, prejudicando a variabilidade genética e sua viabilidade (BUENO e PEREIRA, 2008). A utilização da criopreservação de germoplasma de espécies em risco de extinção permite estocar materiais genéticos bases que possibilitam a manutenção da variabilidade genética que pode ser utilizada tanto nos animais *ex situ* quanto nos *in situ* (SILVA et al., 2012) viabilizando um maior número genético do que por exemplo um Zoológico que tem uma área limitada (COSTA e MARTINS, 2008). As biotecnias reprodutivas podem, portanto, serem utilizadas para auxiliar a conservação de espécies (MOREIRA, 2017) acrescentando mais uma ferramenta na atual luta para manutenção de espécies silvestres. Para tal, é necessário que se conheça a base da biologia e fisiologia reprodutiva da espécie, acrescentando um papel crucial aos mantenedouros de fauna em geral que possuem os animais cativos possibilitando estudos confiáveis e consistentes para que haja sucesso nessas práticas (BUENO e PEREIRA, 2008; SILVA e BONORINO, 2018).

Neste contexto, os estudos relacionados ao tema têm grande importância na conservação dos felinos neotropicais, evitando maiores perdas genéticas nas populações.

Em felinos a técnica mais utilizada é a eletroejaculação, permitindo a segurança do animal e do médico veterinário a coletar. Este método é eficaz na maioria das vezes, existindo diversos protocolos de como executá-lo em diferentes espécies (SWANSON, 2013).

Por outro lado, é um método que traz uma problemática ao processo, que é a contaminação do ejaculado pela urina (MOREIRA, 2017). Sendo assim as vezes é recomendado que se esvazie a bexiga do animal antes do procedimento para garantir que durante a coleta o sêmen não fique contaminado com urina (SWANSON, 2013).

Na Associação Mata Ciliar o estagiário deve realizar um projeto que a beneficie e também apresentar ao final do estágio um seminário sobre o projeto realizado. A instituição é engajada na Medicina da conservação e vêm buscando aprimorar seu banco de germoplasma.

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do protocolo de criopresevação de sêmen de onça parda, utilizando um diluidor comercial Triladyl®, como a finalidade de acrescentar ao banco de germoplasma da Associação Mata Ciliar.

## **2.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.3.1 Indivíduos submetidos ao estudo**

Foram selecionados dois espécimes de onça-parda (*Puma concolor*), apelidadas de Juazeiro e Maritingo, mantidas sob cuidados humanos no Centro brasileiro para Conservação de Felinos Neotropicais na Associação Mata Ciliar, com idades 8 anos, 2,5 anos respectivamente, machos não castrados, e apresentando bom estado geral de saúde.

Os dois animais ficam em recintos separados. Os animais foram provinientes de diferentes regiões sendo o Maritingo resgatado em Paranatinga-MT ainda filhote e encaminhado a AMC. O Juazeiro foi transferido do Centro de Conservação de Fauna da Caatinga (CEMAFAUNA CAATINGA) localizado em Petrolina-PE para a AMC já adulto.

### **2.3.2 Condicionamento**

Um dos indivíduos selecionados foi anestesiados em jaula de prensa, pois foi submetido ao condicionamento. O condicionamento consistiu em alimentar o animal dentro da jaula de prensa, e de acordo com a resposta ao treinamento, foram prensados na caixa e posteriormente, realizou-se uma simulação da aplicação anestésica com um objeto na musculatura do bíceps femoral. Desta forma causa menos estresse para o animal e dificilmente há necessidade de aplicação de mais doses anestésicas.

Iniciou-se o condicionamento no dia 16.05.2019 com a onça-parda Maritingo até dia 30.05.2019 sendo que no dia anterior a coleta, foi repetido o condicionamento. O horário

escolhido para realização do condicionamento foi o da alimentação, pois no dia da coleta de sêmen o animal estaria em jejum e era provável que responderia bem ao ser estimulado com uma isca de carne.

### **2.3.3 Preparação Anestésica**

Para o procedimento de coleta de sêmen foi utilizado de protocolo anestésico com detomidina na dose de 0,04mg/Kg e cetamina na dose de 7mg/Kg sendo os respectivos volumes administrados 0,14ml e 2,45ml estimando-se peso de 35kg, administrado utilizando pistola com dardo no Juazeiro. O peso real do animal foi de 42,5kg, sendo administrado mais 1,29ml cetamina e 0,14ml de detomidina. Para o Maritingo foi utilizado a dose de 0,05mg/Kg e cetamina na dose de 6mg/Kg estimando-se o peso de 40kg e o peso real foi de 40,5kg.

As colheitas foram feitas nos dias 11 de junho de 2019 e 14 de junho de 2019, com um animal adaptado ao condicionamento (Maritingo) e um utilizando o dardo anestésico (Juazeiro).

### **2.3.4 Método de colheita por cateterização uretral**

Para os dois animais submetidos a colheita de sêmen foram utilizados cateteres tipo TomCat medindo 12cm sem abertura lateral, passada 35 minutos após injeção anestésica, permanecendo por 30 segundos dentro da uretra (Figura 25). A glândula do animal foi exposta e devidamente higienizada com soro fisiológico em gaze estéril. Para passar a sonda no animal foi utilizado luva cirúrgica estéril e lubrificante estéril não espermicida.

Figura 25. Colheita por cateterização uretral em exemplar de onça-parda (*Puma concolor*) Juazeiro.



Fonte: Arquivo pessoal.

Averigou-se a presença ou ausência das espículas (Figura 26) sendo visualizadas apenas no Maritingo. Em relação ao cateter, no Juazeiro foi possível passá-lo até 9 cm. No Maritingo o cateter encontrou certa resistência, entrando os 10cm após o período de 40 minutos da primeira aplicação da Detomidina. Uma seringa de 1ml foi acoplada no cateter afim de criar pressão e facilitar a colheita do sêmen. Em nenhum dos dois exemplares houve sucesso por este método. Muito provavelmente devido a baixa dose administrada no primeiro animal e no segundo animal, pelo tempo excedido.

Figura 26. Presença de espículas no exemplar de onça-parda (*Puma concolor*) Maritingo.



Fonte: Arquivo pessoal.

### **2.3.5 Método de colheita por eletroejaculação**

Neste método utilizou-se um aparelho de eletroejaculação UK® ultracase 613 acoplado com transdutor retal de 2cm com três eletrodos longitudinais, lubrificada, disposta sobre o reto do animal. Foram feitos 10 estímulos por série com voltagem 10V, num total de 4 séries durando em média 2 minutos. A cada termino de uma série era feita a avaliação do tubo graduado tipo Eppendorf se continha ejaculado. Entre os estímulos massagem com o transdutor era feita para ajudar nos estímulos. Foi possível completar todos os 4 estímulos, sendo a voltagem ajustada conforme o animal respondia positivamente (ejaculado) ou não.

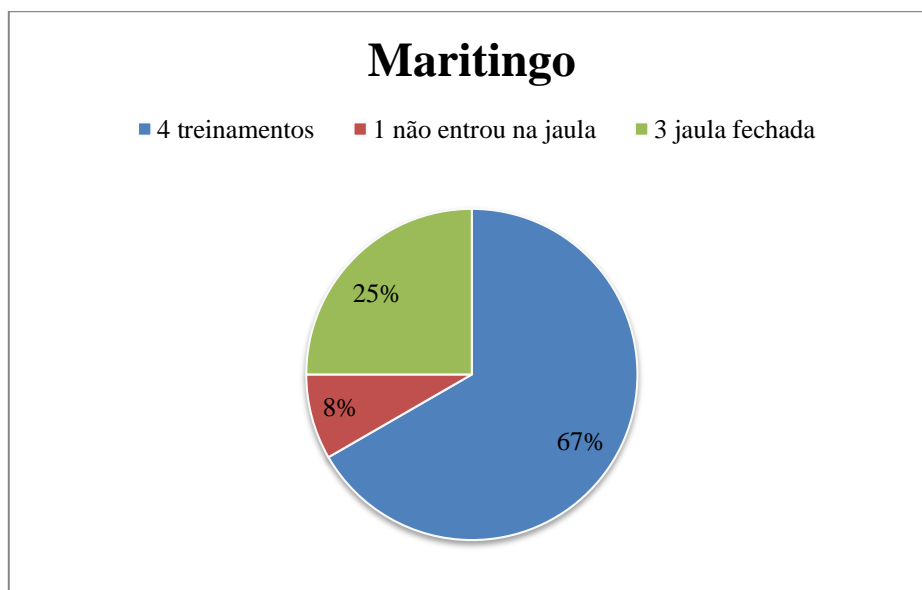
### **2.5.6 Método de criopreservação**

Para realizar o congelamento do sêmen obtido, foi utilizado um protocolo adaptado elaborado pela equipe do *Center for conservation and research of endangered wildlife*, onde se avaliou motilidade e vigor e concentração. Foi feita a diluição e criopreservação com o produto comercial Triladyl® da empresa Minitube. Dois grupos foram feitos, um grupo que foi centrifugado utilizando centrifuga Eppendorf mini spin seguindo protocolo do CREW e um grupo sem centrifugar. Após essas etapas foi feito o congelamento utilizando o mesmo protocolo, sendo duas horas à 4°C e o esquema padronizado por eles de aproximação gradual ao nitrogênio líquido. Para avaliar se a metodologia funcionou, foram descongelados uma palheta de cada grupo e avaliados sob microscópio eletrônico da LeicaGalen III utilizando as objetivas de 10x e 40x.

## **2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O estudo iniciou com a preparação do Maritingo através do condicionamento na jaula de prensa. O animal foi alimentado na jaula dias seguidos até se sentir à vontade num total de sete sessões. Em seguida, começou a ser fechado na jaula e posteriormente prensado. O Maritingo apenas foi fechado na jaula três vezes pois ficou agitado com esta ação retardando a evolução para o passo seguinte (Figura 27). A utilização do condicionamento comparado a utilização do dardo foi bem menos laborioso e menos estressante para o animal, ressaltando a importância do condicionamento nas práticas veterinárias com animais silvestres.

Figura 27. Resultados do condicionamento realizado com exemplar de onça-parda (*Puma concolor*) apelidada Maritingo.



Em relação a coleta de sêmen, ambos os métodos de coleta foram realizados nos dois animais, cateterização uretral e eletroejaculação. Entretanto apenas houve ejaculado pelo último método citado. Diferindo de ARAÚJO (2016) que relatou sucesso na técnica utilizando a sonda TomCat entre 20 e 40 minutos após administração do anestésico detomidina. Durante a sondagem realizada neste estudo houve dificuldade em colocar todo o cateter na uretra dos animais podendo ter influenciado no resultado assim como a diferença da dose de detomidina que foi feita com o peso estipulado em relação ao peso real. Como a uretra é uma estrutura delicada, não é recomendado forçar a sonda sendo colocada apenas até onde foi livre passar.

A detomidina foi selecionada para os procedimentos pois é um  $\alpha 2$ -agonista, droga que estimula a liberação do sêmen na uretra (MOREIRA, 2017) permitindo a colheita por cateterização uretral.

Durante a fase de eletroejaculação, o Juazeiro ejaculou apenas na primeira série de 10 estímulos, sendo um sêmen de coloração branca, fluida, de pH 8.5 correspondentes ao pH esperado sem contaminação de urina, volume de 35 $\mu$ L, avaliado subjetivamente com 60% de motilidade e 4 de vigor. PAZ (2013) e DECO-SOUZA et al. (2013) citam resultados similares sendo descritos a motilidade média da espécie 52% e 75% respectivamente, e vigor

médio 3.5 em ambos, correspondendo a qualidade esperada para uma onça-parda. O Maritingo urinou na primeira série de 10 estímulos realizada, e nas 3 posteriores houve liberação apenas de líquido seminal com baixíssima concentração de espermatozoides não servindo para congelar.

Do ejaculado obtido, foi processado utilizando o diluente com crioprotetor (glicerol) Triladyl® e dois grupos foram criados para avaliar a necessidade de centrifugar o sêmen ou não. Comumente no protocolo utilizado a centrifugação é realizada apenas na presença do diluente, neste estudo o grupo sem centrifugar apresentou melhor motilidade em relação ao grupo centrifugado (Tabela 3) quando foram descongeladas palhetas de cada grupo sendo ainda abaixo do ideal para uma possível fertilização.

Tabela 3. Resultado após descongelamento de palhetas de sêmen que foram criopreservadas utilizando Triladyl® com processo de centrifugação e sem o processo de centrifugação.

<b>Grupo</b>	<b>Sêmen com Triladyl® centrifugado</b>	<b>Sêmen com Triladyl® sem centrifugar</b>
<b>Motilidade (%)</b>	10	20
<b>Vigor (1-5)</b>	2	2.5

O Triladyl® é um diluente da empresa Minitube para bovinos que contém o glicerol na composição, substância também utilizada como crioprotetor. Para utilizar só é necessário adicionar gema de ovo e água destilada, ambas substâncias de fácil acesso. Por apresentar o glicerol na composição, só se fez necessário a utilização deste diluente acrescido ao sêmen para realizar as demais etapas do processo de criopreservação.

Durante o processo de criopreservação o nitrogênio líquido (NL) acabou vazando do botijão de transporte de nitrogênio líquido e o protocolo foi um pouco modificado para que pudesse ser efetuado. Para tal, a etapa final que consistia num protocolo de aproximação ao NL em suportes de tubos falcon adaptados para o processo (Figura 28), onde no fundo do isopor estaria totalmente preenchido com o NL, foi parcialmente preenchido sendo optado de por as palhetas diretamente no botijão de nitrogênio líquido de armazenamento. Porém mesmo após este evento, as palhetas descongeladas para avaliação apresentaram espermatozoides vivos, mostrando sua viabilidade na preservação de sêmen felino da espécie *Puma concolor*.

Figura 28. Protocolo de aproximação ao nitrogênio líquido utilizado pelo *Center for conservation and research of endangered wildlife*.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ficou claro que as duas instituições buscam pela conservação de animais silvestres. Para tal, ambas vêm se aperfeiçoando inclusive na área da reprodução assistida e alcançando objetivos que geram benefícios para as espécies ameaçadas trabalhadas. Inclusive alguns desses benefícios foi fruto da parceria entre os dois locais. A possibilidade de comparar duas realidades diferentes foi muito importante para a formação da estagiária; Sem dúvida, todas as experiências vividas contribuíram para o aperfeiçoamento da discente e levaram a um aprendizado enorme.

#### 4.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ASSOCIAÇÃO MATA CILIAR. Colaboração internacional produz o primeiro filhote de onça-pintada nascido de inseminação artificial, Jundiaí, 2019 Disponível em: <http://mataciliar.org.br/mata/colaboracao-internacional-produz-o-primeiro-filhote-de-onca-pintada-nascido-de-inseminacao-artificial/>. Acesso em: 12 Jun.2019.

ARAÚJO, G. R. **Coleta farmacológica e criopreservação de sêmen de grandes felinos mantidos em cativeiro e capturados em vida livre com o uso de armadilhas de laço**. 2016. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016. 81f. Disponível em:[www.locus.ufv.br/handle/123456789/8223?show=full](http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/8223?show=full). Acesso em: 12 jun. 2019.

ARRUDA, R. P. et al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade.**Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.47-60, 2015.

BUENO, Ataliba e PEREIRA, Rose. Biotecnologia aplicada a animais silvestres e seus aspectos éticos e conservacionistas, **Revista Científica eletrônica de medicina veterinária**, ISSN: 1679-7353, Ano VI, n.11, 2008.

COSTA e MARTINS. Conservação dos recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução, **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 6, n. 1, p. 39-55, 2008

DECO-SOUZA et al. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(4), 512-516, 2013.

DURRANT, B. S. Criobiologia da conservação- Reserva dos recursos genéticos. Em CUBAS Z. S.; SILVA J. C.; CATÃO-DIAS J. L. em: **Tratado de animais selvagens**: Medicina veterinária, São Paulo: Roca, 2014. p. 2208-2214.

FELIPPE, P. A. N.; ADANIA, C. H., Conservação e bem-estar animal. Em CUBAS Z. S.; SILVA J. C.; CATÃO-DIAS J. L. em: **Tratado de animais selvagens**: Medicina veterinária São Paulo: Roca, 2014. p. 2-8.

HERRICK, J. et al. Toward a feline-optimized culture medium: Impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of in vitro fertilization-derived feline embryos grown in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 76, 5, 2007, p. 858-870.

INSTITUTO CHICO MENDES - ICMBio. **Sumário executivo do plano de ação nacional para conservação da onça preta**. 2014. Disponível em:

[www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-onca-parda/sumario-on%C3%A7a-parda-icmbio-web.pdf](http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-onca-parda/sumario-on%C3%A7a-parda-icmbio-web.pdf). Acesso em 12 jun. 2019.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE - IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2014. Disponível em: [www.iucnredlist.org/species/18868/97216466](http://www.iucnredlist.org/species/18868/97216466). Acesso em: 12 Jun. 2019.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE - IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2015. Disponível em: [www.iucnredlist.org/species/18868/97216466](http://www.iucnredlist.org/species/18868/97216466). Acesso em: 12 jun. 2019.

JOHNSTON, S., KUSTRITZ, M., OLSON, P. **Canine and feline theriogenology**, 1st ed. Philadelphia: Saunders, 2001, 592 p.

LANNES S. T. et al. Miopatia de captura em espécies selvagens - Uma revisão. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária** 2010, 8 (24), 169-176.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. **Ecosystems and human well-being: synthesis**. Island Press, Washington-DC, 2005. Disponível em: [www.millenniumassessment.org/documents/document.356.aspx.pdf](http://www.millenniumassessment.org/documents/document.356.aspx.pdf). Acesso em: 12 Jun. 2019.

MOREIRA, N. Exame andrológico e criopreservação de sêmen em felídeos selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.312-315, 2017.

PAZ, R.C.R. **Reprodução de felinos domésticos e selvagens**. Editora EDufmt, Cuiabá, MT, 2013.

SILVA, A.C.P.; BONORINO, R.P. **Biotécnicas da reprodução aplicadas à conservação de felídeos selvagens**. SIMP.TCC/Sem.IC. (13); 2319-2331 FACULDADE ICESP, ISSN: 2595-4210, 2018.

SILVA et al. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, 22 (1), 219-234, Edição Especial, 2012.

SWANSON, W.F. Research in nondomestic species: experiences in reproductive physiology research for conservation of endangered felids. **ILAR Journal**, v. 44, n. 4, 2013.

TUDO COM VOCE. **Jaguaririca nascida de proveta da luz na mata ciliar**. Jundiá, 2019, Disponível em: <https://tudo.com.vc/jaguaririca-nascida-de-proveta-da-luz-na-mata-ciliar-em-jundiai/>. Acesso em: 12 Jun. 2019.

VILLAVERDE, A. I. S. B. et al. Comparação entre dois métodos de coloração para análise morfológica e acrossomalde espermatozóides de gato doméstico (*Feliscatus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 686-692, 2008.