



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**



**Dosagem de esteroides sexuais e cortisol fecais e
observação de comportamento em fêmeas de felídeos
selvagens mantidas sob cuidados humanos**

Julia Santoucy Barros

Dissertação de Mestrado

Brasília -DF

2023



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**



**Dosagem de esteroides sexuais e cortisol fecais e
observação de comportamento em fêmeas de felídeos
selvagens mantidas sob cuidados humanos**

Julia Santoucy Barros

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Madeira Lucci

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Dissertação de Mestrado

Brasília -DF

2023

Agradecimentos

Agradeço principalmente a minha orientadora Prof.^a. Dr^a Carolina Madeira Lucci pela oportunidade de realizar esse mestrado. Pela confiança, atenção e tempo dedicados a elaboração deste trabalho, mesmo durante uma pandemia, em que quase não podíamos nos encontrar.

Ao professor Rodrigo de Souza Amaral, do Instituto Federal do Amazonas-IFAM, pela parceria no processamento de dosagem hormonal das amostras coletadas.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília.

À Fundação Jardim Zoológico de Brasília, ao diretor de pesquisa pelo acolhimento e orientação e aos responsáveis pela execução em si dentro dos recintos, por autorizar e disponibilizar os animais protagonistas dessa dissertação, Locki, Nala, Fênix e Potira.

Aos tratadores dos setores dos grandes felídeos (Diego, Robson, Marcelo e Leo), do setor Gatário (Deivisson, Seu Ézio, Naldery, Seu Geraldo, Seu Café, Alisson, Pedro, Antônio Carlos), do setor da Veterinária (Junio, João Paulo- Jonny, Tiago, William), sem vocês esse trabalho não seria possível!

Às minhas flores, estagiárias e Pibics que me deram uma ajuda super importante nesse processo todo, Alice, Adriana, Nina e Jéssica, muito obrigada!

Aos amigos do laboratório/ IB, Cecibel, pela paciência no laboratório, Ju pela ajuda com os gráficos e Bruna pelos esclarecimentos de dúvidas no dia a dia, além de todos os alunos da Prof. Carol, que torcemos uns pelos outros como uma família. As conquistas são comemoradas por todos! Obrigada pelo apoio!

Aos meus amigos de vida que me incentivaram, escutaram, ajudaram e não me deserdaram nem nos momentos mais estressantes, obrigada parceira Talita, Aline, André, Gi, Andréa, Caca e tantos outros que passaram nesse período de mestranda e me desejaram sorte!

E não menos importante à minha família, que acreditou em mim e me deu o suporte necessário para a execução e conclusão desse trabalho! Obrigada Mãe, Luluca, Gui, Pai Aguinaldo, Amanda e mano Lucas!! Amo vocês!

SUMÁRIO

Lista de figuraS.....	6
Introdução.....	11
Revisão de Literatura.....	12
Felídeos Brasileiros.....	12
<i>Puma concolor</i> (nome comum: sussuarana, puma, onça parda, leão da montanha).....	13
<i>Leopardus tigrinus</i> (nome comum: Gato do mato pequeno, maracajá, gato macambira).....	14
<i>Puma yagouaroundi</i> (nome comum: gato mourisco, jaguarundi, gato vermelho).....	14
Aspectos Reprodutivos de Felídeos.....	15
Corticosteroides e relação com a reprodução em felídeos	20
Avaliação de metabólitos fecais de hormônios esteroides	23
Justificativa	25
Objetivos.....	26
Metodologia	27
Animais	27
Recintos e manejo.....	28
Coleta das amostras	31
Diferenciação das amostras.....	31
Observação do comportamento	33
Resultados.....	39
Discussão	59
conclusão e considerações finais	66
Referências Bibliográficas	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura das Categorias da Lista Vermelha da UICN (UICN, (2022).....	12
Figura 2 Puma concolor – A: sussuarana Locki e B: seu recinto no Zoológico de Brasília.....	27
Figura 3 Puma concolor – A: sussuarana Nala (sentada) e B: seu recinto no Zoológico de Brasília.....	28
Figura 4: Leopardus tigrinus – A: casal de gatos do mato pequeno, mais à direita na foto está a fêmea Potira, mais à esquerda na foto, o macho Tupã, marcando território. B: Fêmea de gato do mato pequeno Potira. C: Recinto dos gatos do mato pequenos no Zoológico de Brasília.....	29
Figura 5: Puma yagouaroundi – A: Fênix e B: seu recinto no Zoológico de Brasília.	29
Figura 6 Sementes de alpiste na alimentação da Sussuarana Nala (inseridas em um pedaço de frango) e B: sementes de painço na alimentação da gata do mato pequena Potira (misturadas em um bolinho de carne moída).	32
Figura 7: Duração total de comportamentos reprodutivos da sussuarana Locki.....	39
Figura 8: Comportamento de estimulação da vulva da sussuarana Locki.	40
Figura 9: Níveis de metabólitos de E2 e P4 da sussuarana Locki, mostrando as variações destes hormônios, bem como suas linhas de base, ao longo do período de observação dos animais. Retângulos rosa demonstram períodos de comportamento de estro.....	42
Figura 10: Datas que a sussuarana Locki apresentou mais comportamento de pacing de acordo com a observação de comportamento. .	43
Figura 11: Níveis de cortisol da sussuarana Locki, mostrando os picos do hormônio e a linha de nível basal da sussuarana Locki. Retângulo amarelo indica não visível; Retângulo rosa indica comportamento de pacing e o cinza indica enriquecimento ambiental.	44

Figura 12: Frequência de observação de comportamentos reprodutivos da sussuarana Nala.	45
Figura 13: Nala e Fred no momento da cópula.....	46
Figura 14: Níveis de metabólitos de E2 e P4 da sussuarana Nala, mostrando as variações destes hormônios, bem como suas linhas de base, ao longo do período de observação do comportamento. Retângulos rosa demonstram períodos de comportamento de estro.	47
Figura 15: Níveis de metabólitos de cortisol da sussuarana Nala.	49
Figura 16: Interação positiva e cópula entre Potira e o macho Tupã.....	50
Figura 17: Frequência de comportamento reprodutivo da gata do mato pequena Potira em minutos observados.	50
Figura 18: Níveis de metabólitos de E2 e P4 da fêmea de gato do mato pequeno Potira, mostrando as variações destes hormônios, bem como suas linhas de base, ao longo do período de observação do comportamento. Retângulos rosa demonstram períodos de comportamento de estro.	52
Figura 19: Duração de comportamentos aleatórios observados durante a pesquisa da gata do mato pequena Potira.	53
Figura 20: Níveis de metabólitos de cortisol, mostrando os picos do hormônio e a linha de nível basal, da gata do mato pequena Potira.	54
Figura 21: Frequência de comportamentos aleatórios da jaguarundi Fênix.....	55
Figura 22: Níveis de metabólitos de E2 e P4 da jaguarundi Fênix, mostrando as variações destes hormônios, bem como suas linhas de base, ao longo do período de observação dos animais.	56
Figura 23: Gráfico dos metabólitos do hormônio cortisol, mostrando os picos do hormônio e a linha de nível basal da jaguarundi Fênix.	58

Lista de quadros

Quadro 1: Sementes utilizadas para diferenciação das fezes, inseridas na alimentação dos animais que se encontram no mesmo recinto.	32
Quadro 2: folha de anotação do etograma, na observação direta.	34
Quadro 3: Comportamentos observados e as siglas utilizadas.	35
Quadro 4: Tempo de coleta, quantidade de amostras de fezes, níveis basais e quantidade de picos dos metabólitos de E2, P4 e cortisol, e duração dos ciclos estrais das sussuaranas Locki e Nala, da gata do mato pequena Potira e da jaguarundi Fênix.....	59

Resumo

O presente estudo avaliou 4 fêmeas de felídeos selvagens residentes do Jardim Zoológico de Brasília, sendo duas sussuaranas (*Puma concolor*), uma gata do mato pequena (*Leopardus tigrinus*) e uma jaguarundi (*Puma yagouaroundi*). Estas fêmeas tiveram o comportamento observado diariamente por um período de aproximadamente 4 meses, durante o qual foram também coletadas amostras de fezes para dosagem de metabólitos de hormônios esteroides (E2, P4 e cortisol). Os comportamentos foram compilados em tabelas e contabilizados para evidenciar quais os mais frequentes. As fezes foram processadas para a extração e avaliação quantitativa dos metabólitos dos esteroides sexuais e cortisol. Os dados obtidos descrevem eventos relacionados à fisiologia reprodutiva destas fêmeas, correlacionando o comportamento com as dosagens hormonais, bem como aspectos relacionados ao estresse. Os dados da análise das amostras de fezes dos 4 animais, que demonstraram picos de metabólitos de E2, muitas vezes coincidentes com comportamentos reprodutivos. Também foram observados picos de metabólitos de P4, inclusive coincidentes com os dos metabólitos de E2 em alguns momentos, mas nenhum que sugerisse a formação de corpo(s) lúteo(s). O intervalo entre picos de E2 variou entre 7 e 16 dias para sussuarana, 4 e 21 dias para gata do mato pequena, e 5 e 21 dias para jaguarundi, dando indícios da variação de duração do ciclo estral desses animais. Já os metabólitos de cortisol não apresentaram picos concomitantes aos comportamentos estereotipados observados, que foram poucos. Os dados coletados sugerem especificidades entre as espécies, com diferenças entre sussuaranas e os espécimes de pequenos felinos, apontando para a necessidade de mais estudos sobre a reprodução dessas espécies. Este trabalho fornece informações a respeito destas três espécies de felídeos nativas da fauna brasileira, contribuindo para o pouco conhecimento disponível a respeito de espécies de felídeos selvagens mantidos sob cuidados humanos.

Palavras-chave: fêmeas felinas, reprodução, estresse, cativo

Abstract

The present study evaluated 4 female wild felids residing at the Jardim Zoológico de Brasília, two mountain lions (*Puma concolor*), a small wild cat (*Leopardus tigrinus*) and a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*). These females had their behavior observed daily for a period of approximately 4 months, during which feces samples were also collected for steroid hormone metabolites dosage (E2, P4 and cortisol). The behaviors were compiled in tables and counted to show which were the most frequent. Feces were processed for extraction and quantitative assessment of sex steroid and cortisol metabolites. The data obtained describe events related to the reproductive physiology of these females, correlating behavior with hormone dosages, as well as aspects related to stress. Data from the analysis of feces samples from the 4 animals showed peaks in E2 metabolites, often coinciding with reproductive behavior. Peaks of P4 metabolites were also observed, coinciding with those of E2 metabolites at some moments, but none that suggested the formation of corpus luteum(s). The interval between E2 peaks varied from 7 to 16 days for mountain lions, from 4 to 21 days for small wild cat, and from 5 to 21 days for jaguarundi, indicating the variation in the duration of the estrous cycle of these animals. Cortisol metabolites, on the other hand, did not show concomitant peaks with the observed stereotyped behaviors, which were few. The data collected suggest specificities between species, with differences between mountain lions and small cat specimens, pointing to the need for further studies on the reproduction of these species. This work provides information about these three species of felids native to the Brazilian fauna, contributing to the little knowledge available about species of wild felids kept under human care.

Keywords: feline females, reproduction, stress, captivity

INTRODUÇÃO

A variabilidade genética das espécies tem decrescido em uma taxa alarmante. Vários fatores podem contribuir para este quadro, como por exemplo: o desenvolvimento agrícola e pecuário, fragmentação de habitat, expansão urbana e construção de represas e hidroelétricas, além da caça e abate desses animais, deixando vulneráveis as populações de animais silvestres (CUBAS *et al*, 2014). Recentemente, os incêndios que acometem o Pantanal também tem sido um desses fatores (LEMOS, 2020).

Além de medidas diretas para prevenir a destruição de habitats naturais, invasão de territórios e caça, técnicas de reprodução assistida aplicadas a espécies selvagens são recursos valiosos para os esforços de conservação. No entanto, para poder desenvolver e aplicar técnicas de reprodução assistida, é preciso conhecer a fisiologia reprodutiva destes animais. Apesar disso, existem muito poucos estudos descrevendo características do ciclo reprodutivo (duração total e das diferentes fases do ciclo, níveis de hormônio sexuais e atividade ovariana, entre outras) de felídeos selvagens, e menos ainda das espécies felinas nativas da América do Sul.

O presente trabalho teve por objetivo estudar aspectos reprodutivos e de estresse de 3 felinos selvagens da fauna brasileira (sussuarana, gato do mato pequeno e jaguarundi) mantidos sob cuidados humanos.

REVISÃO DE LITERATURA

Felídeos Brasileiros

A família *Felidae* é uma das que vem sendo grandemente afetada. Em todo o mundo, a família *Felidae* possui 38 espécies em sua totalidade, sendo que 5 destas espécies estão em ameaça de extinção, 12 encontram-se vulneráveis, 6 estão quase ameaçadas e apenas 15 apresentam estado pouco preocupante, com 12 populações consideradas estáveis, de acordo com a *Red List of Threatened Species* publicada em 2022-2 pela IUCN (Figura 1) (IUCN, 2023).

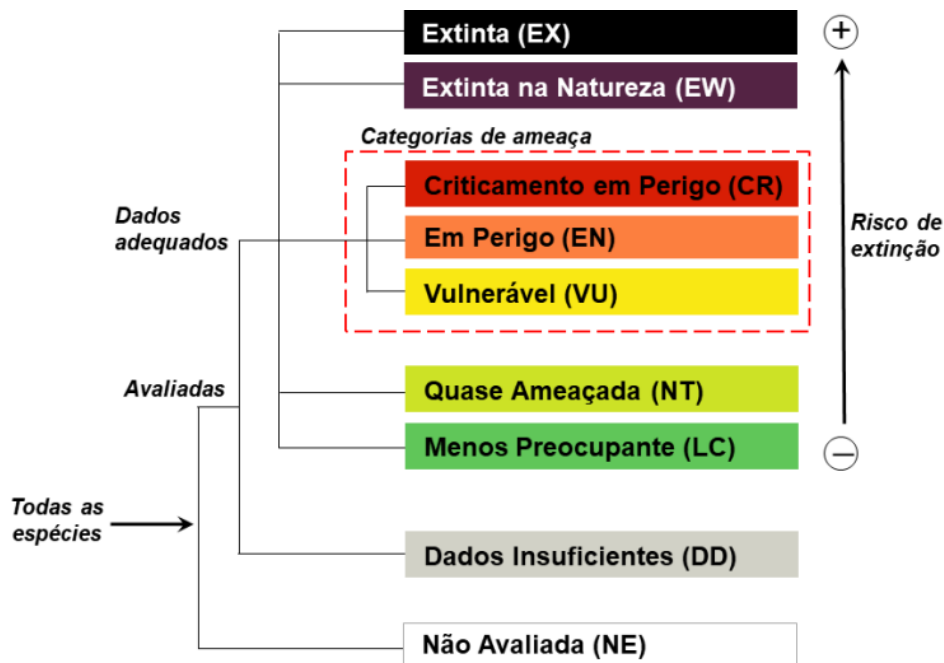


Figura 1 Estrutura das Categorias da Lista Vermelha da UICN (UICN, (2022).

Oito espécies de felídeos selvagens ocorrem no Brasil, sendo seis espécies de pequenos felídeos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), o gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), a Jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), o gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*), e duas espécies de grandes

felídeos: a onça-parda (*Puma concolor*) e a onça-pintada (*Panthera onca*). Todas elas com algum grau de vulnerabilidade, exceto o gato do mato grande que se encontra com sua população estável atualmente (ICMBio/MMA, 2018; IUCN, 2023).

Neste trabalho serão estudadas 3 espécies de felídeos selvagens da fauna brasileira, *Puma concolor*, *Puma yagouaroundi* e *Leopardus tigrinus*, todas estão vulneráveis segundo a lista vermelha da IUCN (IUCN, 2023), e serão apresentadas a seguir:

Puma concolor (nome comum: sussuarana, puma, onça parda, leão da montanha)

Segunda maior espécie de felídeo do Brasil, são animais com pelagem curta, em geral, de cor marrom acinzentado claro ao marrom avermelhado, porém os filhotes nascem com pintas negras pelo corpo, que podem ser visualizadas até os 4 meses de idade, e olhos azuis. Os machos adultos podem pesar de 53 a 72 quilos e as fêmeas adultas de 34 a 48 quilos, apresentam corpo esguio, membros fortes e cauda longa. São animais solitários e terrestres com hábito crepuscular. Percorrem grandes áreas de 56 a 155 km, são ágeis, capazes de subir em árvores com facilidade, e bem adaptados a climas diversos. Escondem suas presas grandes debaixo de folhas para se alimentar depois. Normalmente utilizam tocas apenas quando estão com filhotes, e costuma descansar em galhos altos de árvores. A expectativa de vida em cativeiro é de 20 anos. No Brasil, já foi registrada em todos os ecossistemas, desde a floresta Amazônica, cerrado, caatinga até os pampas gaúchos.

Devido a destruição do meio ambiente e conseqüente aproximação das áreas urbanas, esse felídeo está ameaçado, inclusive pela caça ilegal perto de fazendas e até mesmo por atropelamentos em rodovias. Em 2005 existiam 175 indivíduos sob cuidados humanos e a população era considerada muito crítica, e a taxa de crescimento nos últimos 10 anos foi de 6% (CUBAS, 2014; IUCN, 2023).

Leopardus tigrinus (nome comum: Gato do mato pequeno, maracajá, gato macambira)

Menor espécie de felídeo do Brasil. Fêmeas são menores que os machos, pesam em média 2,2 a 2,4 kg. O corpo é esbelto com cauda medindo de 19 a 22 cm. A pelagem pode ser desde amarelo claro, ocre e acinzentada, com ventre mais claro com pintas pretas, possuem ocelos pretos pelo corpo em formato de 8, e anéis negros na cauda, e atrás da orelha uma macha redonda de coloração mais clara.

Tem hábitos solitários e noturnos predominantemente, podem ocupar uma área de 0,9 a 17 km. Caçam presas menores de 90g normalmente, mas podem preda animais de até 500g.

É uma espécie que se encontra vulnerável segundo a *Red List of Threatened Species* publicada em 2022-2 pela IUCN, pouco estudada, com poucos animais vivendo em instituições. Difícil de ser visualizado na natureza e suas pegadas são muito semelhantes à dos gatos domésticos, pois tem o mesmo tamanho. Pode ser encontrado em parte da América Central, alguns países do norte da América do Sul e Brasil. Tem preferência por ambientes como florestas subtropicais, cerrado, pantanal, pampas gaúchos caatinga e áreas adjacentes a áreas agrícolas (CUBAS, 2014; IUCN, 2023).

Puma yagouaroundi (nome comum: gato mourisco, jaguarundi, gato vermelho)

Espécie de porte médio, com peso médio de 5,2kg, podendo chegar a 7kg. possui a cabeça pequena, alongada e achatada, orelhas pequenas, e arredondadas, parecido com um mustelídeo (ex.: lontra). Patas curtas em comparação com o corpo e cauda alongados. A coloração é uniforme e apresenta 3 variações básicas: amarronzada negra, acinzentada e vermelho amarelada.

O seu hábito é solitário e terrestre, com atividade diurna predominantemente e forrageamento arborícola. Podem ser observados andando em pares, com o pico de atividades entre as 4 e as 11 horas. São bons nadadores, dormem em tocas árvores, em galhos altos ou no meio da vegetação mais densa. São sociais, seu território pode ser dividido com outros da mesma espécie e são muito vocais. Fêmeas podem caminhar entre 88 e

100 km². Caçam normalmente ao entardecer ou ao amanhecer. Predam aves e pequenos mamíferos.

Ocorre desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e todo o território brasileiro. São animais com grande facilidade de adaptação, podendo ser encontrados em florestas tropicais, subtropicais, cerrado, caatinga, pantanal e vegetação secundária.

A espécie tem o risco de estar extinta no Uruguai e no extremo sul do Rio Grande do Sul. São capturados para tráfico comercial de pele além de serem conhecidos por predarem aves domésticas e por esse motivo podem ser caçados ilegalmente com o objetivo de abatê-los (CUBAS, 2014; IUCN, 2023).

Aspectos Reprodutivos de Felídeos

De acordo com a literatura geral, a grande maioria das fêmeas felinas são de ovulação induzida e na ausência de cópula o ciclo estral é normalmente dividido em pró-estro, estro e interestro, com duração total média de 14 a 21 dias. O pró-estro é a fase imediatamente antes do estro e dura de 0,5 a 2 dias. O comportamento típico desta fase inclui maior vocalização, o roçar da cabeça e corpo contra objetos, agachamento, sapateado, lordose e lateralização da cauda, porém a fêmea não aceita as investidas do macho. Nesta fase ocorre um pico de metabólitos de estrógeno (E2) circulante, devido ao rápido crescimento folicular. O estro, que dura de 5 a 7 dias, é a fase de mais fácil visualização. Os comportamentos são os mesmos do pró-estro, com lordose, lateralização da cauda e apresentação da vulva para a monta, e agora a fêmea aceita a monta. Nesse período ocorre o maior pico de secreção de metabólitos de E2. Caso não ocorra a cópula, a fêmea entra em interestro, que dura de 8 a 10 dias, período no qual não apresenta nenhuma manifestação de comportamento sexual. O nível de metabólitos de E2 cai a concentrações basais. Caso haja cópula, ou eventualmente de forma espontânea, haverá a liberação do pico pré-ovulatório de LH e a fêmea irá ovular. Com a ovulação haverá a formação de corpos lúteos que irão secretar metabólitos de

progesterona (P4), e conseqüentemente, irão aumentar dos níveis deste hormônio. Se houver fertilização, a fêmea evolui para uma gestação (que dura em torno de 60 dias em gatas domésticas), e caso não haja fertilização a fêmea passará por uma “pseudogestação” (com duração de aproximadamente 40 dias). Em ambos os casos este período é finalizado com a regressão do corpo lúteo e a queda da P4 a níveis basais. É importante ressaltar que a maior parte destas informações foi obtida a partir de observações de gatos domésticos (*Felis catus*) e generalizadas para todos os felídeos (MICHAEL, 1961; JOHNSTON *et al*, 2001; FELDMAN & NELSON, 2004; BROWN, 2011).

Aspectos do comportamento sexual e dosagens hormonais foram descritos para apenas uma parcela dos felídeos (para uma revisão veja BROWN, 2006). De modo geral as dosagens de hormônios esteroides sexuais em animais selvagens é feita por meio da extração de seus metabólitos liberados nas fezes, o que já se mostrou ser efetivo e não invasivo. Fazendo uma revisão da literatura pertinente, estudos envolvendo dosagem de hormônios sexuais em felídeos selvagens já foram realizados em tigre (*Panthera tigris*), leão (*Panthera leo*), leopardo das neves (*Panthera uncia*), caracals (*Felis caracal*), guepardo (*Acinonyx jubatus*) (GRAHAM *et al*, 1995; BROWN *et al*, 1996), leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*) (BROWN *et al*, 1995), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato maracajá (*Leopardus wiedi*) (MOREIRA *et al*, 2001), gato de Pallas (*Otocolobus manul*) (BROWN *et al*, 2002) e gato pescador (*Prionailurus viverrinus*) (MORELAND *et al*, 2002; SANTYMIRE *et al*, 2011). A dosagem de esteroides fecais também tem sido realizada com diversas finalidades em gatas domésticas (GRAHAM *et al*, 2000; MALANDAIN *et al*, 2011; TOYDEMIR *et al*, 2012), inclusive por nosso grupo de pesquisa (LEONEL *et al*, 2018).

Brown *et al* (1995) realizaram um estudo com 14 animais da espécie leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*), que estavam localizados em 3 locais diferentes: 1) Centro de Conservação e Pesquisa (CRC), Front Royal, VA (n = 3); 2) Minnesota Zoological Garden (MZG), Apple Valley, MN (n = 3); e 3) Nashville Zoo, Joelton, TN (n = 8). Esse trabalho avaliou o ciclo reprodutivo dos leopardos nebulosos, mensurou esteroides fecais (E2 e P4) em fêmeas em estro natural e induzido por hormônio gonadotrófico (eCG – gonadotrofina

coriônica equina e hCG – gonadotrofina coriônica humana). Foi observado que seis animais apresentaram ovulação na ausência de acasalamento (nove episódios), tanto de fêmeas que coabitavam com outras fêmeas como em fêmeas que viviam sozinhas. Os resultados mostraram ainda que não houve diferenças significativas na produção e excreção de E2 quando tratadas com eCG ou no seu ciclo natural. Os animais que apresentaram ovulação espontânea antes do início do tratamento com gonadotrofinas demonstraram atividade da P4 40% reduzida em comparação com as outras fêmeas do estudo (BROWN *et al*, 1995).

Brown *et al* (1996) também pesquisaram a atividade reprodutiva de 26 fêmeas adultas de chitas (*Acinonyx jubatus*), durante 24 meses em cativeiro, avaliando esteroides fecais. Foi observado o aumento dos esteroides fecais em animais que estavam em acasalamento (estro) ou que foram submetidas a administração de eCG para inseminação artificial. Baseado nos níveis desses hormônios, foi identificado o ciclo estral de 13 dias de duração em média, sendo 4 dias de estro em média. Os animais não tratados com gonadotrofina mostraram evidências de estro e ciclicidade, e todos os animais avaliados por um ano ou mais tiveram períodos longos de anestro, não sendo relacionados às estações do ano. Ovulações espontâneas puderam ser observadas apenas uma vez em dois animais. O estudo mostrou que chitas são poliéstricas e com ovulação induzida, além de 25% dos animais do estudo terem entrado em anestro sem expressar atividade ovariana, porém sem correlação com fotoperíodo (BROWN *et al*, 1996).

Em um trabalho realizado no centro de conservação de vida silvestre Itaipu Binacional e no zoológico de Curitiba, por Moreira *et al* (2001), foram caracterizados padrões endócrinos reprodutivos de 3 jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), 2 fêmeas de gato do mato (*Leopardus tigrinus*) e 2 de gato maracajá (*Leopardus wiedii*). Todos os animais foram mantidos em recintos individuais, em flutuações naturais de fotoperíodo. Amostras fecais foram coletadas cinco vezes por semana durante 14 a 18 meses. De acordo com as análises de pico de metabólitos de E2 encontradas, o ciclo estral foi em média de 18 dias para as jaguatiricas, 16 dias para as gatas do mato e 17 dias para as fêmeas de gato maracajá. As análises da concentração de P4 encontrada, juntamente

com observações laparoscópicas dos ovários nas jaguatiricas e nas gatas do mato, confirmaram que esses animais não ovulam espontaneamente. Diferentemente, as duas fêmeas de gato maracajá apresentaram corpos lúteos ocasionais não induzidos por acasalamento, os quais tiveram duração média de 40 dias (MOREIRA *et al*, 2001).

Em 2002, Brown *et al* estudaram a resposta endócrina reprodutiva para fotoperíodo e hormônio gonadotrófico exógeno em 3 machos e 6 fêmeas de gatos de Pallas (*Otocolobus manul*) no Centro de Conservação e Pesquisa do Parque Zoológico Nacional Front Royal, Virgínia, Woodland Park Zoological Gardens, Seattle, Washington e Zoológico de Cincinnati, Ohio. Foi observado no estudo que as fêmeas apresentaram anestro, com concentrações baixas de metabólitos de E2, de maio a dezembro, e durante o período reprodutivo, de janeiro a abril, a produção desses hormônios praticamente dobrou, tendo variações nos picos de concentração (BROWN *et al*, 2002). Em média a duração do ciclo estral desses animais variou de 7 a 21 dias. Houve aumento de metabólitos de P4 em duas fêmeas que ficaram prenhas através do acasalamento natural, e essas apresentaram uma elevação de metabólitos de E2 fecais com pico logo antes do parto. Durante o tratamento com hormônio eCG, os animais tiveram aumento de metabólitos de E2 fecais referentes às taxas encontradas no período reprodutivo, e um aumento de progestogênios fecais pós ovulatórios após a utilização de hCG. Apesar da boa resposta aos hormônios exógenos desses animais, não houve sucesso na gestação em nenhuma das fêmeas tratadas. A Pesquisa constatou que o gato de Pallas é um animal sazonal, que as fêmeas têm a maior taxa de concentrações de estrogênio no início do período mais quente e com mais luz, e os machos também apresentam maiores concentrações de espermatozoides no mesmo período (BROWN *et al*, 2002).

Em uma pesquisa de Graham *et al* (2000), foram feitos três estudos com 12 gatas domésticas. No primeiro estudo, com os padrões endócrinos normais, identificou-se o ciclo estral de 18 dias em média e 6 dias de estro. Oito dessas fêmeas apresentaram ovulação sem cópula, baseada no aumento dos níveis de P4 fecal. No segundo estudo as gatas acasalaram naturalmente ou foram submetidas a inseminação artificial com estimulações de 100 IU de eCG

seguido por 75 IU de hCG 80 h depois a aplicação da primeira dose. Comparadas com as gatas que acasalaram naturalmente, as fêmeas estimuladas com o hormônio exógeno tiveram as concentrações de P4 maiores e elevadas por mais tempo. No terceiro estudo, as gatas foram estimuladas com hCG e ovariectomizadas 160 horas após a administração do hormônio, corpos lúteos foram observados em fêmeas que ovularam, porém após 160 horas de estimulação com gonatotofina, exócrina apenas 55% dos embriões esperados (com base no número de ovulações/corpos lúteos) foram recuperados no útero após a ovariectomia, isso porque o tratamento com gonatotofina exógena em gatas domésticas não interfere na qualidade dos embriões, ou no seu estágio do desenvolvimento, mas prejudica o transporte deles no oviduto, a constatação disso é que em fêmeas de gatas domésticas com estro natural que acasalaram, 90% dos embriões foram encontrados no útero 48 horas após a primeira cópula (GRAHAM *et al*, 2000).

Um estudo realizado em sete zoológicos norte-americanos, por Santymire *et al* (2011), analisou a atividade dos esteroides fecais, durante 12 meses, em 4 machos e 10 fêmeas de gatos pescadores (*Prionailurus viverrinus*). Segundo a pesquisa os hormônios reprodutivos masculinos não variam de acordo com a mudança de estações, e o ciclo estral nas fêmeas tem duração média de 20 dias, sendo a concentração de estrogênio em média cinco vezes maior durante o cio. Cinco de sete fêmeas que estavam em recintos sozinhas ou com outras fêmeas apresentaram ovulação, apresentando níveis de progesterona pós-ovulação cinco vezes maior que a média basal. Essa fase lútea não gravídica durou em média 33 dias. Uma fêmea teve um filhote, resultado do acasalamento natural. Duas fêmeas adicionais foram tratadas com gonatotofinas exógenas (150 UI de eCG; 100 UI de hCG), o que resultou em concentrações superelevadas de metabólitos de E2 fecais e ovulação. O trabalho apontou que os gatos pescadores dos zoológicos da América do Norte apresentam ciclo reprodutivo durante todo o ano, e que mais da metade das fêmeas de gatos pescadores apresentam ovulação sem cópula (SANTYMIRE *et al*, 2011).

Como pode ser observado, poucos são os estudos relativos à fisiologia reprodutiva de felídeos selvagens, e quase não existem trabalhos descrevendo

os níveis de hormônios esteroides em felídeos silvestres nativos da América do Sul.

Corticosteroides e relação com a reprodução em felídeos

É importante ressaltar que ao se trabalhar com animais em cativeiro é possível que haja situações de estresse. O estresse (agudo ou crônico) promove uma liberação aumentada de cortisol e no estresse crônico esses níveis elevados são prolongados (ORSINI & BORDAN, 2006). É sabido que o estresse crônico (ou “distresse”) interfere diretamente no bem-estar animal e afeta a sua saúde de diversas maneiras, inclusive comprometendo as funções reprodutivas (CUBAS *et al*, 2014). A resposta fisiológica ao estresse envolve a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), com liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, que estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise e conseqüentemente de glicocorticoides pelo córtex da adrenal. Por sua vez, o cortisol inibe a ação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), o que faz com que não haja estímulo apropriado para a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), alterando as funções reprodutivas nas fêmeas. Portanto, uma quantidade elevada e frequente de cortisol na circulação ocasiona uma diminuição na taxa reprodutiva (MICHELETTI *et al*, 2012).

Algumas manifestações podem ser identificadas como indicativo de distresse. Dentre os sinais que podem ser observados estão o aumento dos batimentos cardíacos e da frequência respiratória, dilatação das pupilas, bem como alteração no tipo e frequência das vocalizações e até mesmo comportamentos estereotipados ou repetitivos, como andar em círculos. Já foi comprovada correlação positiva entre comportamento estereotipado e altas concentrações de corticoides em leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*) (WIELEBNOWSKI *et al*, 2002), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*L. wiedii*) (MOREIRA *et al*, 2007). O mesmo trabalho também mostrou a diminuição da atividade esteroidogênica em fêmeas de gato-do-

mato-pequeno e de gato-maracajá associada ao aumento da atividade adrenocortical (MOREIRA *et al*, 2007). No entanto, é importante salientar que é necessário mais de um indicador de estresse para se concluir que um determinado animal está sofrendo distresse. Portanto, quando utilizadas em conjunto, a identificação de distúrbios comportamentais e de alterações na concentração hormonal podem indicar exatamente o momento em que o estresse passa a ser caracterizado como distresse.

Wielebnowski *et al* (2002), investigaram os problemas de reprodução relacionados ao estresse crônico em leopardo das neves da América do Norte (*Neofelis nebulosa*), de acordo com taxas encontradas de glicocorticoides relacionada ao manejo desses animais. Setenta e dois leopardos das neves (36 fêmeas e 36 machos), de uma população do plano de conservação das Ilhas da América do Norte, foram monitorados durante um período de seis semanas, relacionando o manejo e os dados do comportamento. Fêmeas apresentaram uma concentração de corticoide maior do que machos e as análises mostraram correlações negativas entre a altura do recinto, número de horas que os tratadores passavam com cada animal por semana e concentrações de corticoides. Uma correlação positiva também foi observada entre o número de tratadores cuidando de um indivíduo e as concentrações de corticoides. Os níveis mais elevados foram visualizados em animais que eram expostos à visita pública e perto de potenciais predadores, indivíduos que apresentaram um comportamento de automutilação também tinham níveis aumentados de corticoides, e associações positivas foram vistas com alguns comportamentos como dormir, se esconder e medo, por exemplo. Esses resultados indicam que a avaliação de corticoides fecais é bastante efetiva para investigar o manejo e problemas comportamentais relacionados ao bem-estar, e podem auxiliar no controle da qualidade de vida e sucesso reprodutivo das espécies (WIELEBNOWSKI *et al*, 2002).

Em um estudo realizado no Centro de Conservação da Vida Selvagem Itaipu Binacional, em Foz do Iguaçu, Paraná, no sul do Brasil, Moreira *et al* (2007) analisaram os efeitos do ambiente sobre a ciclicidade produtiva e atividade endócrina em duas gatas do mato pequenas (*Leopardus tigrinus*) e três gatas maracajás (*Leopardus wiedii*). Os animais foram alojados sozinhos

em 3 condições diferentes: I. recinto grande, com enriquecimento ambiental por um período de 3 meses; II. Recinto pequeno, vazio, por um período de 5 meses e meio; e III. Recinto pequeno, com enriquecimento ambiental, como galhos e caixas para ninhos e esconderijos, por um período de 6 meses e meio. As amostras fecais foram coletadas 5 vezes por semana, durante o estudo. Todas as fêmeas apresentaram comportamento estereotipado antes da alimentação, de acordo com as observações. As duas espécies tiveram atividades bimodal padrão, com picos crepusculares, todas tiveram comportamento agitado, com alta frequência e durabilidade de comportamentos estereotipados, principalmente nos três primeiros dias dentro do recinto pequeno e vazio. As análises das amostras fecais mostraram diminuição de atividade ovariana e aumento do cortisol quando os animais estavam dentro do recinto vazio. As fêmeas de gatos do mato pequeno tiveram diminuição do cortisol quando foram alocadas nos recintos pequenos com enriquecimentos, enquanto as fêmeas de gatos maracajás tiveram o nível de cortisol sempre alto enquanto estiveram nos recintos pequenos, com ou sem enriquecimento. No entanto, foi possível observar que a presença de enriquecimento ambiental é suficiente para normalizar a atividade ovariana em ambas as espécies. E os dados sugerem que pode haver diferentes comportamentos entre espécies de felídeos, e enfatiza a importância do planejamento do recinto e ambientes adequados para que os animais possam expressar os comportamentos naturais das espécies (MOREIRA *et al*, 2007).

Narayan *et al* (2013) realizaram um estudo para avaliar o grau de estresse de duas subespécies de tigre (*Panthera tigris*), o tigre de bengala (*Panthera tigris tigris*) e o tigre de Sumatra (*Panthera tigris sumatrae*). Através da coleta não invasiva de fezes, pouco testado anteriormente, através do método de ensaio imunoenzimático, testaram e validaram os metabólitos de cortisol fecal desses animais. Foram ao todo 22 tigres, em dois grandes zoológicos em Queensland, Austrália (Dreamworld Theme Park e Australia Zoo). As amostras foram coletadas frescas todas as manhãs por um período de 21 dias, além disso foi feita a validação biológica através de coleta sanguínea 5 dias antes e 5 dias após o experimento de 5 fêmeas e 5 machos de tigres do estudo. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa dos

metabólitos fecais de cortisol entre as duas subespécies de tigres e o sexo. Os níveis médios de metabólitos fecais de cortisol apresentaram-se significativamente maiores nas fêmeas do que nos machos, nos animais que tinha algum problema de saúde também apresentaram níveis elevados. Os animais que participavam de condicionamento animal mostraram uma possível habituação dos níveis. Esse estudo demonstrou mais uma vez que medir metabólitos fecais de cortisol é uma técnica excelente para se avaliar o nível de estresse de felídeos de zoológicos, por ser menos invasiva.

Avaliação de metabólitos fecais de hormônios esteroides

A avaliação dos níveis de hormônios que permitem investigar condições metabólicas dos animais. Os níveis séricos sempre são os mais fidedignos, porém, quando se trata de animais selvagens a coleta de sangue apresenta várias limitações, especialmente se a frequência desejada é alta. Os hormônios esteroides, a exemplo do estradiol, da progesterona e do cortisol, são excretados quase que exclusivamente pelas fezes, na forma de metabólitos (BROWN *et al*, 2006). Assim, a dosagem de metabólitos dos esteroides de interesse nas fezes fornece uma alternativa viável para a análise desses hormônios em animais selvagens. Esta estratégia facilita a coleta de amostras por não precisar de contenção ou anestesia dos animais.

A maioria dos trabalhos de análises de hormônios em felídeos selvagens utiliza a técnica de mensuração de metabólitos de corticoides e esteróides sexuais nas fezes. A dosagem de esteroides fecais já foi validada para alguns felídeos selvagens como chita (*Acinonyx jubatus*), leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*), leopardo-das-neves (*Panthera uncia*), tigre (*Panthera tigris*), leão (*Panthera leo*), gato-bravo-de-patas-negras (*Felis nigripes*), gatas do deserto (*Felis Margarita*), gato de Pallas (*Otocolobus manul*), gato pescador (*Prionailurus viverrinus*), caracals (*Felis caracal*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato maracajá (*Leopardus wiedi*) (CZEKALA *et al*, 1994; BROWN *et al*, 1995; GRAHAM *et al*, 1995; BROWN *et al*, 1996; MOREIRA *et al*, 2001; BROWN *et al*, 2002,

MORELAND *et al*, 2002; WIELEBNOWSKI *et al*, 2002; MOREIRA *et al*, 2007; HERRICK *et al*, 2010; SANTYMIRE *et al*, 2011; NARAYAN *et al*, 2013).

Para a quantificação dos hormônios duas técnicas são utilizadas, o radioimunoensaio (RIA) e o ensaio imunoenzimático (EIA ou ELISA). O RIA é um teste radioativo que utiliza um reagente marcado, antígeno ou anticorpo. Assim, o composto a ser quantificado é determinado pela quantidade de radioatividade que ele emite, e o radioisótopo mais utilizado é o iodo-125. O EIA permite testes qualitativos e quantitativos e detecta tanto antígenos quanto anticorpos. Esse teste mede a coloração da interação da enzima com o seu substrato, que é a medida da reação do antígeno com o anticorpo a ser quantificado (BENDER e VON MUHLEN, 2008). Os métodos de RIA exigem o manuseio de material radioativo, treinamento técnico e licenças especiais para ser realizado, além de que o uso do material é prejudicial à saúde humana. Pelo fato de não precisar de compostos radioativos, o EIA apresenta vantagens em comparação ao RIA (JERICÓ *et al*, 2002).

Em um estudo com chitas (N=4), foram quantificados metabólitos fecais de cortisol. Após administração de ACTH houve aumento das concentrações séricas de cortisol dentro de 10 minutos, seguido de elevação correspondente dos metabólitos fecais de cortisol 48 horas depois. Posteriormente, outros animais (N=7) foram expostos a diferentes situações estressantes, como imobilização e transporte, e foi observado aumento das concentrações de metabólitos fecais de cortisol 24 a 72 horas após o estímulo estressor. O estudo demonstrou que a atividade adrenocortical pode ser monitorada de forma não invasiva pela análise dos metabólitos fecais (TERIO *et al*, 1999). Esta forma de avaliação também foi recentemente utilizada para avaliar as condições de estresse em tigres comparando animais em cativeiro, reintroduzidos na natureza e de vida livre (JESPEN *et al*, 2021).

JUSTIFICATIVA

Uma das ferramentas para a preservação de espécies ameaçadas de extinção é o uso de metodologias de reprodução assistida. E de fato, a criopreservação de células germinativas e outras formas de material genético de diversas espécies já vem sendo feito, na forma de bancos de germoplasma, com o intuito de salvaguardá-lo para utilização futura. Porém, para desenvolver e aplicar tecnologias reprodutivas, é importante ter conhecimento da fisiologia reprodutiva da(s) espécie(s) em questão. Além disso, é sabido que o estresse crônico é um fator que interfere diretamente no bem-estar animal e nos ciclos reprodutivos.

Sabe-se que a maioria dos felídeos silvestres estão com algum grau de vulnerabilidade, segundo o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, e assim os conhecimentos sobre esses animais são fundamentais para a sua conservação e manutenção no habitat (ICMBio/MMA, 2018). No entanto, há ainda poucos estudos na literatura em relação à fisiologia reprodutiva e ao comportamento reprodutivo de felídeos selvagens. Assim, muito pouco é conhecido a respeito dos padrões de hormônios sexuais em felídeos selvagens, especialmente das espécies que ocorrem no Brasil.

No presente trabalho foram estudadas fêmeas de 3 espécies de felinos selvagens da fauna brasileira (*Puma concolor*, *Puma yagouaroundi* e *Leopardus tigrinus*) mantidas sob cuidados humanos. Foram avaliados o comportamento reprodutivo e relacionado a estresse, bem como a dosagem de metabólitos fecais de esteroides sexuais e corticosteroides. É importante ressaltar que as 3 espécies estudadas estão vulneráveis segundo a lista vermelha da IUCN (IUCN, 2023) e que quase não existem trabalhos sobre elas na literatura.

OBJETIVOS

Este trabalho se propõe a avaliar os níveis fecais de metabólitos de esteroides sexuais e cortisol, e correlacioná-los com manifestações comportamentais, em fêmeas de diferentes espécies de felídeos selvagens, habitantes do Zoológico de Brasília, com os seguintes objetivos específicos:

- Mensurar os níveis de metabólitos de esteroides sexuais em fezes de fêmeas de felídeos selvagens habitantes do Zoológicos de Brasília e correlacionar os dados obtidos com o comportamento sexual desses animais.

- Mensurar os níveis de metabólitos de cortisol em fezes de fêmeas de felídeos selvagens habitantes do Zoológico de Brasília e correlacionar os dados obtidos com o comportamento e os níveis de estresse desses animais.

- Verificar se há relação entre estresse e ciclos reprodutivos.

METODOLOGIA

Animais

Esta pesquisa foi realizada no Zoológico de Brasília (-15° 50' 41" S -47° 56' 36" O) e no período de setembro de 2020 a fevereiro de 2021, primavera e verão, época de calor intenso e chuvas na cidade do experimento. Foram estudadas as fêmeas de felídeos selvagens, todas em idade reprodutiva das seguintes espécies: duas sussuaranas (*Puma concolor*), uma gata do mato pequena (*Leopardus tigrinus*) e uma jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), cujos históricos serão apresentados a seguir.

A sussuarana Locki (Figura 2), nascida em meados de 2017, foi encontrada sem a mãe em uma fazenda nas proximidades de Brasília e diretamente encaminhada para a Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB). A sussuarana Nala (Figura 3) nasceu em 2011 e chegou ao Zoológico de Brasília com aproximadamente 2 anos de idade, oriunda do Centro de triagem de Goiânia.



Figura 2 *Puma concolor* – A: sussuarana Locki e B: seu recinto no Zoológico de Brasília.



Figura 3 *Puma concolor* – A: *sussuarana Nala* (sentada) e B: seu recinto no Zoológico de Brasília.

Tanto a gata do mato pequena (Potira, Figura 4) quanto a jaguarundi (Fênix, Figura 5) nasceram no Zoológico de Brasília em 2018.

As fêmeas desse estudo são todas nulíparas, e as que tem contato com machos não castrados não apresentaram gestação comprovada até o momento dessa pesquisa.

Recintos e manejo

Sussuarana (Locki)

O recinto em que a Locki (Figura 2B) mede 318 m², é restrito à visitação e está localizado próximo ao hospital veterinário. Contém muitas plantas rasteiras para mimetizar o habitat da espécie, um tanque com água, substrato de terra e cimento próximo ao cambiamento. Frequentemente os tratadores ofereciam objetos preparados como enriquecimento ambiental, como redes fabricadas de mangueira de bombeiro ou alimentação escondida dentro do recinto, por exemplo.



Figura 4: *Leopardus tigrinus* – A: casal de gatos do mato pequeno, mais à direita na foto está a fêmea Potira, mais à esquerda na foto, o macho Tupã, marcando território. B: Fêmea de gato do mato pequeno Potira. C: Recinto dos gatos do mato pequenos no Zoológico de Brasília.

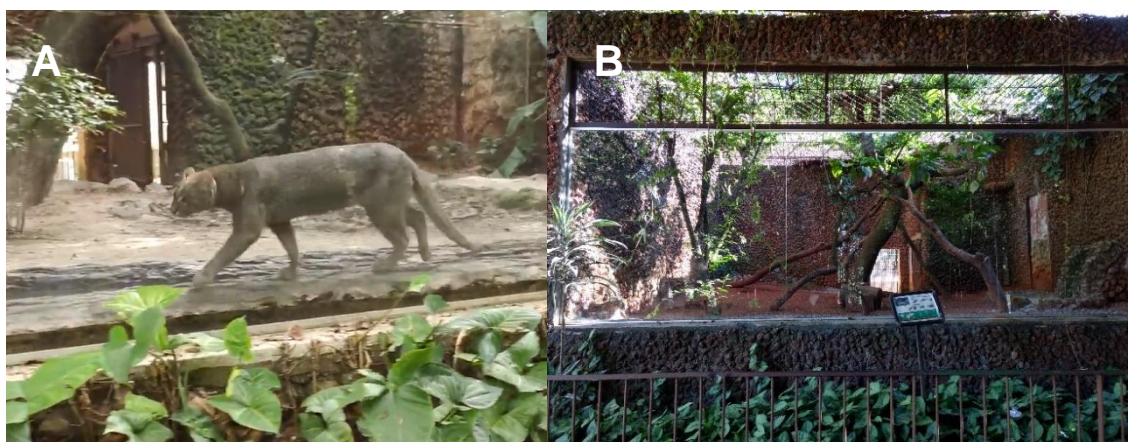


Figura 5: *Puma yagouaroundi* – A: Fênix e B: seu recinto no Zoológico de Brasília.

Sussuarana (Nala)

O animal em questão vivia em um recinto tipo fosso com 555m² que é aberto para a visitação pública pela parte de cima do recinto, juntamente com mais uma fêmea e um macho vasectomizado da mesma espécie (Figura 3). O recinto possui um estaleiro de madeira com dois níveis de altura, algumas palmeiras e um tanque em torno do recinto. O chão é todo gramado, com apenas a área próxima aos cambiamentos cimentada. O recinto possui quatro entradas para cambiamentos, mas apenas um tem contenção para procedimentos.

A dieta das sussuaranas é composta de carne fresca ou frango fresco, ossos e suplementos quando necessário, preparada no setor de nutrição do Zoológico de Brasília, cada animal recebe a quantidade ideal de acordo com o seu tamanho e necessidade nutricional. A alimentação é fornecida diariamente, exceto quintas e domingos, além disso elas tem acesso a água fresca à vontade. Como são animais condicionados, durante a alimentação, os tratadores as cambiavam para ter acesso a área interna do recinto. No restante do tempo os animais ficam soltos no recinto.

Gata do mato (Potira) e Jaguarundi (Fênix)

Os pequenos felídeos estavam locados no setor gatário, que é dividido em recintos menores, de 30 m² cada, separados do público por vidros temperados. A gata do mato divide o recinto com um macho não castrado da mesma espécie. A jaguarundi dividia o recinto com sua irmã, que veio a óbito em agosto de 2021, e desde então vive sozinha. Em cada recinto há ambientação para a espécie em questão (Figuras 4C e 5B), com troncos de árvores, vegetação mais próxima ao habitat dos animais, com piso de diversos substratos, como terra, grama, areia, pedras, e que são alterados rotineiramente como forma de enriquecimento ambiental físico. O cambiamento tem uma entrada do lado de dentro do recinto, e uma porta para o lado de fora para o corredor de segurança do setor. Não há contenção, para qualquer procedimento os animais precisam ser contidos fisicamente com puçás e contenção química quando necessário.

Os pequenos felídeos também são animais condicionados, porém muito mais reativos a qualquer mudança ou presença de pessoas estranhas dentro do setor, o que por vezes dificulta a alimentação e a coleta de fezes durante o trabalho. A dieta desses animais é feita de pedaços de carne ou frango, normalmente suplementada com cálcio, preparada no setor de nutrição do Zoológico de Brasília. Estes animais são alimentados diariamente, duas vezes ao dia, sendo a primeira refeição às 7h30 e a segunda às 14h30, e têm acesso a água fresca à vontade.

Coleta das amostras

Amostras de fezes foram coletadas de cada um dos animais, para acompanhamento dos metabólitos fecais dos hormônios esteroides (E2, P4 e cortisol). Era feitas tentativas de coleta das fezes cinco vezes por semana (de segunda a sexta), sempre pela manhã e com o auxílio dos tratadores. O sucesso da coleta dependia da entrada dos animais no cambiamiento, o que nem sempre ocorria, de forma que o número total de amostras de cada animal foi variado. A duração do estudo também variou entre os animais, e as análises finais foram feitas num período de 4 meses e meio para a sussuarana Locki, totalizando 61 amostras coletadas, 2 meses e um total de 17 amostras de fezes coletadas para a sussuarana Nala, 4 meses e meio para a gata do mato pequena Potira com 82 amostras de fezes, e 4 meses para a jaguarundi Fênix com um total de 79 amostras de fezes.

Todas as amostras de fezes foram acondicionadas em pequenos potes plásticos e congeladas (- 20 °C) para posterior processamento.

Diferenciação das amostras

Como alguns animais dividiam o recinto com outros, fez-se necessário diferenciar as fezes de cada animal, o que foi feito com a introdução de

semente de alpiste e painço em sua alimentação (PAGANI *et al.*, 2019), conforme demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1: Sementes utilizadas para diferenciação das fezes, inseridas na alimentação dos animais que se encontram no mesmo recinto.

Semente utilizada	Recinto das Sussuaranas			Recinto dos Gatos do mato	
	Cristal*	Nala	Fred *	Potira	Tupã *
Alpiste	X		-	X	-
Painço		X	-		-

* A fêmea Cristal e os machos Fred e Tupã não participam do estudo.

Considerando o tempo de passagem pelo trato gastrintestinal (de em média 24 horas para felídeos de grande porte e de 4-6 horas para pequenos felídeos (LITTLE, 2015) e de acordo com a orientação do diretor de nutrição do FJZB, as sementes foram misturadas em uma pequena porção do alimento de cada animal (Figura 6) que foi oferecido individualmente. Esse alimento era oferecido diariamente separado e antes da alimentação em si, para garantir sua ingestão completa.

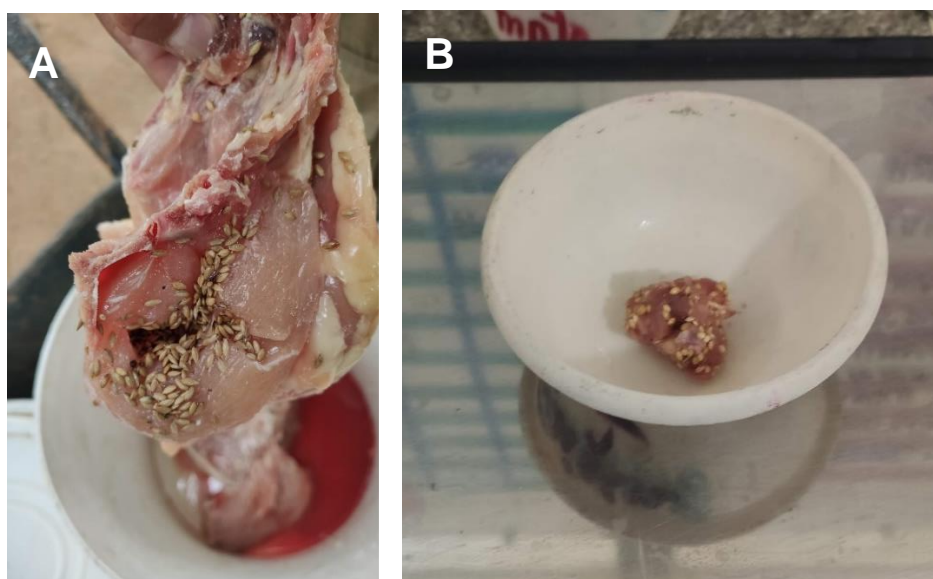


Figura 6 Sementes de alpiste na alimentação da Sussuarana Nala (inseridas em um pedaço de frango) e B: sementes de painço na alimentação da gata do mato pequena Potira (misturadas em um bolinho de carne moída).

Observação do comportamento

A avaliação do comportamento dos animais foi feita por observação direta, diariamente, durante um período mínimo de 30 minutos para cada um deles, de acordo com a folha de anotação mostrada no Quadro 2. O etograma dos animais foi iniciado primeiramente com a anotação de todos os comportamentos que os animais apresentavam sem controle de tempo, nesse momento o objetivo é identificar todos esses comportamentos e listá-los para montar a ficha de observação com as siglas de cada comportamento identificado. O principal foco do etograma eram comportamentos característicos de proestro (fricção da cabeça e do pescoço contra superfícies, movimentação demasiada e rolamento) e estro (agachamento com hiperextensão do trem posterior, lordose, lateralização da cauda) (MICHAEL, 1961), bem como de estresse crônico (vocalizações e comportamentos estereotipados ou repetitivos, como andar em círculos) (ACCO *et al*, 1999; RIVERA, 2002). Todos os registros dos etogramas foram compilados numa planilha e agrupados em tabelas. A lista de todos os comportamentos observados encontra-se no Quadro 3.

Quadro 2: folha de anotação do etograma, na observação direta.

NOME OBSERVADOR:		HORÁRIO: DE ÀS	
DATA:	ANIMAL:	SENSAÇÃO TÉRMICA: QUENTE () FRIO () CHUVA () SOL ()	
1´		OBSERVAÇÕES:	
2´			
3´			
4´			
5´			
6´			
7´			
8´			
9´			
10´			
11´			
12´			
13´			
14´			
15´			
16´			
17´			
18´			
19´			
20´			
21´			
22´			
23´			
24´			
25´			
26´			
27´			
28´			
29´			
30´			

Quadro 3: Comportamentos observados e as siglas utilizadas.

PARADO ATIVO	PA
PARADO INATIVO	PI
VOCALIZANDO	VOC
FORAGEANDO	FOR
DEITADA	DEI
ANDANDO	AND
CORRENDO	COR
URINANDO	URI
DEFENCANDO	DFE
URINANDO (MARCAÇÃO DE TERRITÓRIO)	MTU
UNHA (MARCAÇÃO DE TERRITÓRIO)	MTUn
INTERAÇÃO POSITIVA	IT+
INTERAÇÃO NEGATIVA	IT-
INTERAÇÃO COM ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	IEA
COMENDO	COM
BEBENDO	BEB
CAÇANDO	CAÇ
NÃO VISÍVEL	ÑV
DORMINDO	DOR
AUTOLIMPEZA	ATL
AUTOMUTILAÇÃO	AML
CÓPULA	COP
FRICÇÃO DA CABEÇA E DO PESCOÇO CONTRA SUPERFÍCIES (PROESTRO)	FCP
MOVIMENTAÇÃO DEMASIADA (PROESTRO)	MD+
ROLAMENTO	ROL
AGACHAMENTO COM HIPEREXTENSÃO DO TREM POSTERIOR (ESTRO)	AHP
LORDOSE (ESTRO)	LOR
LATERALIZAÇÃO DA CAUDA (ESTRO)	LCA

Processamento das amostras

Para a extração dos metabólitos de esteroides das amostras fecais foi utilizado um método descrito por Graham *et al* (2001). Em resumo, após serem retiradas do congelador, as amostras foram homogeneizadas e pesadas, separando 0,5 g e colocada em um tubo de vidro com 5 ml de metanol 80%, misturadas no vórtex por 5 segundos e colocadas na mesa agitadora por 16 horas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 500 rotações por minuto, em seguida 1 ml do sobrenadante de cada amostra foi transferido para um eppendof e esses foram colocados abertos dentro da capela de fluxo até a secagem total das amostras. Concluído esse processo, as amostras foram acondicionadas novamente no freezer a -20 °C, para serem enviadas ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus Zona Leste e IFAM/CMZL, Manaus, Amazonas, Brasil.

Os níveis de metabólitos de E2, P4 foram quantificados pelo método de ELISA, utilizando anticorpos específicos para os hormônios analisados. No caso do E2, o método utilizado neste trabalho já foi utilizado anteriormente para felídeos não domésticos (BARNES *et al* 2016; REICHERT-STEWART *et al* 2014) e para gatos domésticos (LEONEL *et al*, 2018).

Os extratos fecais foram analisados por ensaio imunoenzimático utilizando um protocolo descrito para várias outras espécies (BROWN, 1995; GRAHAM *et al*, 1995, BROWN *et al*, 1996; BROWN *et al*, 2002, GRAHAM *et al*, 2002; SANTYMARI *et al*, 2011). Foram utilizados os anticorpos CL425 (1:5.000) para progesterona e R0008 (1:12.000) para estradiol, com os seus respectivos hormônios conjugados com peroxidase (1:160.000; 1:350.000), todos fornecidos pela Universidade de Davis - UC Davis, EUA.

Microplacas de poliestireno de 96 poços de alta adsorção (MaxiSorp, Nunc, Rochester, EUA) foram marcadas (50µl/poço) com o anticorpo diluído em solução de marcação (0,015 M Na₂CO₃.H₂O, 0,035 M NaHCO₃; pH 9,6), seladas com adesivo de acetato e incubadas a 4 °C por 16hs. Após a

incubação, as microplacas foram submetidas a um ciclo de três lavagens com solução de lavagem (0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20). Foi adicionado 25µL de solução tampão em cada poço e, posteriormente, 50µL de cada amostra, padrão da curva, ou controle. Imediatamente após, foi adicionado 50µL de solução de hormônio conjugado com enzima diluída em solução tampão. As microplacas foram seladas e incubadas por 2hs em temperatura ambiente (MUNRO *et al*, 1991; BROWN, 1995; GRAHAM *et al*, 1995, BROWN *et al*, 1996; BROWN *et al*, 2002 GRAHAM *et al*, 2001; LEONEL *et al*, 2018).

Após a incubação, as microplacas foram lavadas sendo posteriormente adicionado 100µL/poço de solução de substrato (250µL de 0,016 M Tetrametilbenzidina em dimetilsufóxido; 50µL de 0,1752 M H₂O₂; 11mL de tampão substrato [0,01 M C₂H₃Na; pH 5,0]). A reação cromógena foi interrompida com 50µL de solução ácida (4,0 M H₂SO₄). A densidade óptica de cada poço foi medida em uma leitora de microplacas utilizando um filtro de 450nm (MUNRO *et al*, 1991; BROWN, 1995; GRAHAM *et al*, 1995, BROWN *et al*, 1996; BROWN *et al*, 2002 GRAHAM *et al*, 2001; LEONEL *et al*, 2018).

Todas as amostras, controles e padrões foram analisados em duplicata. As sensibilidades dos ensaios de progesterona e estrona foram de 0,07 ng/mL e 0,08 ng/mL, respectivamente. Os coeficientes de variação intra e interensaios dos controles alto (70% de ligação) e baixo (30% de ligação) foram <10,25% para ambos os ensaios, e todos os ensaios apresentaram paralelismo entre diluições seriadas das amostras e a curva padrão do ensaio hormonal. Os níveis de metabólitos fecais de progesterona e estrona foram corrigidos e apresentados em ng/g de fezes (MUNRO *et al*, 1991; BROWN, 1995; GRAHAM *et al*, 1995, BROWN *et al*, 1996; BROWN *et al*, 2002 GRAHAM *et al*, 2001; LEONEL *et al*, 2018).

As dosagens de metabólitos fecais de cortisol foram realizadas por enzimaímunoensaio utilizando conjunto comercial (catálogo ISWE0002; Arbor Assays, Ann Arbor, MI, EUA) desenvolvido para dosagem de metabólitos de cortisol e seus metabólitos em diferentes matrizes biológicas (MUNRO *et al*, 1991; BROWN, 1995; GRAHAM *et al*, 1995, BROWN *et al*, 1996; BROWN *et al*, 2002; GRAHAM *et al*, 2001).

Foi seguido o protocolo laboratorial do fabricante, incluindo a utilização de anticorpo anti-IgG de coelho desenvolvido em cabra como anticorpo secundário. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, os coeficientes de variação intra e interensaios foram < 5,3%, e a sensibilidade do ensaio foi de 27,6 pg/mL. Os resultados foram expressos em ng/g de fezes (MUNRO *et al*, 1991; BROWN, 1995; GRAHAM *et al*, 1995, BROWN *et al*, 1996; BROWN *et al*, 2002 GRAHAM *et al*, 2001).

Os dados da dosagem hormonal foram avaliados separadamente para cada animal. Os resultados passaram por um processo iterativo de análise no qual são excluídos valores maiores que a média mais duas vezes o desvio padrão até que os valores basais possam ser determinados. Valores maiores que os valores basais são considerados picos hormonais.

Foi feita a avaliação entre os dados obtidos das análises hormonais e as observações de comportamento.

RESULTADOS

Com a análise dos etogramas foi possível delimitar a frequência de cada um dos comportamentos relacionados à reprodução e ao estresse para cada animal e assim destacar os de maior frequência. Os dados são apresentados individualmente para cada animal avaliado.

Sussuarana (Locki)

Comportamentos relacionados aos períodos de proestro e estro foram observados na sussuarana Locki (Figura 7). No total foram 168 minutos de vocalizações, 46 de agachamentos com hiperextensão do trem posterior, 16 de lordoses e 3 de estimulações na vulva (no qual se abaixava, em decúbito ventral, levantava a pelve e lateralizava a cauda, realizando movimentos com os membros pélvicos, com o intuito de roçar a região da vulva em plantas e arbustos), em 32 dias de comportamento característico de proestro ou estro.

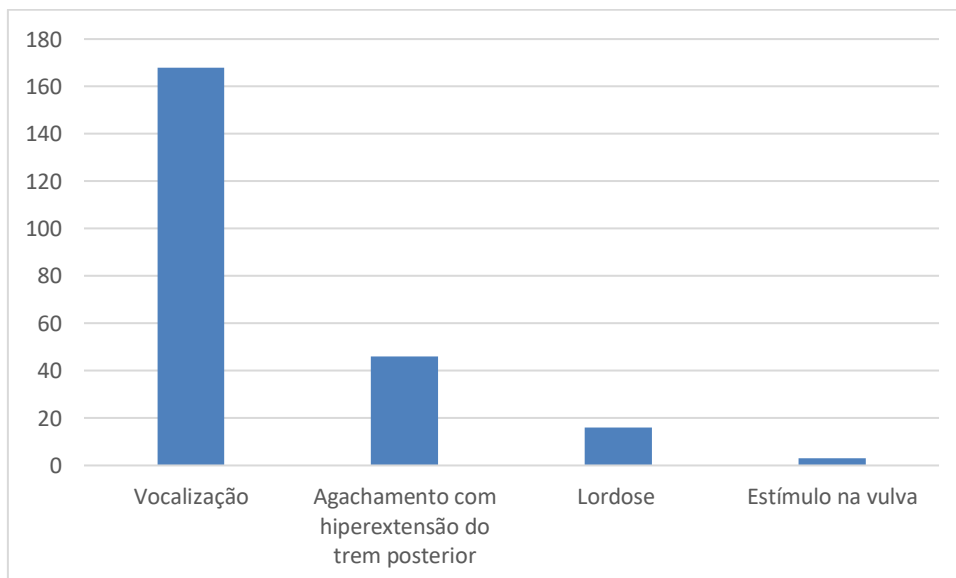


Figura 7: Duração total de comportamentos reprodutivos da sussuarana Locki.

Durante o período do experimento, Locki apresentou comportamentos de proestro, como vocalização excessiva nos dias 23 a 28 de setembro, 17 a 22 de outubro, 8, 14, 15 de novembro, e 18 de dezembro. Nos dias 14 de novembro e 18 de dezembro, apresentou também agachamentos com hiperextensão do trem posterior, lordose e lateralização da cauda, incluindo possível estimulação da vulva em um galho de um arbusto (Figura 8).



Figura 8: Comportamento de estimulação da vulva da sussuarana Locki.

Ao todo tivemos 4 meses e meio de coletas de amostras de fezes da sussuarana Locki, totalizando 61 amostras de fezes coletadas.

Os níveis de metabólitos de E2 e P4 nas fezes da Locki durante o período experimental são mostrados na Figura 6. Locki apresentou 2 grandes picos de metabólitos de E2, nos dias 27 de setembro (2476 ng/g de fezes), 22 de outubro (2424 ng/g de fezes), e outros picos menores, nos dias 29 de setembro (394 ng/g de fezes), 6 de outubro (565 ng/g de fezes), 17 de novembro (253 ng/g de fezes), 2 de novembro (201 ng/g de fezes), 14 de dezembro (225 ng/g de fezes) e 28 de dezembro (244 ng/g de fezes). Locki apresentou intervalos entre picos de metabólitos de E2 que variaram de 7 a 16 dias.

Já em relação à P4, Locki apresentou vários picos, por exemplo nos dias 27 e 29 de setembro (3372 e 1826 ng/g respectivamente), 22 de outubro (1910 ng/g de fezes), 2 de novembro, (1918 ng/g de fezes), 11 de novembro (1362 ng/g de fezes), 28 de dezembro (2380ng/g de fezes) e 5 a 7 de janeiro (2161 ng/g dado do dia 5/01).

Fazendo um paralelo entre o comportamento observado e os hormônios dosados nas fezes, é possível ver uma coincidência entre os comportamentos de estro e os picos de metabólitos de E2 dos dias 27 de setembro e 22 de outubro, 2 de novembro e 12 de novembro, como apontado na Figura 10. Também é possível observar que em vários momentos houve um pico de metabólitos de P4 concomitante a um pico de metabólitos de E2 (Figura 9).

Com relação a estresse, muitos estímulos externos interferiram no comportamento da sussuarana Locki, especialmente de dezembro de 2021 a fevereiro de 2022. Dentre estes, podemos citar: a presença do tratador, reforma perto do recinto, roçadeiras fazendo barulho, além de outros animais que foram alocados no recinto vizinho. Por exemplo, no dia 2 de dezembro, uma urso de óculos permaneceu por alguns dias no recinto contíguo ao dela. No dia 7 de janeiro, Locki foi transferida para o recinto de exposição onde estava anteriormente uma onça pintada, uma troca repentina, sem vazão sanitário. Na mesma noite, Locki fugiu e foi capturada na tarde do dia seguinte e permaneceu cambiada até o outro dia quando então foi encaminhada de volta ao local restrito à visitação em que estava antes da troca. Porém, foi alocada no recinto ao lado, pois no seu recinto já estava uma onça pintada. Após todos esses eventos, Locki começou a apresentar alguns comportamentos diferentes, ficando mais escondida e quieta por mais tempo. Além disso, a coleta de amostras de fezes e a observação de outros comportamentos se tornaram mais difíceis.

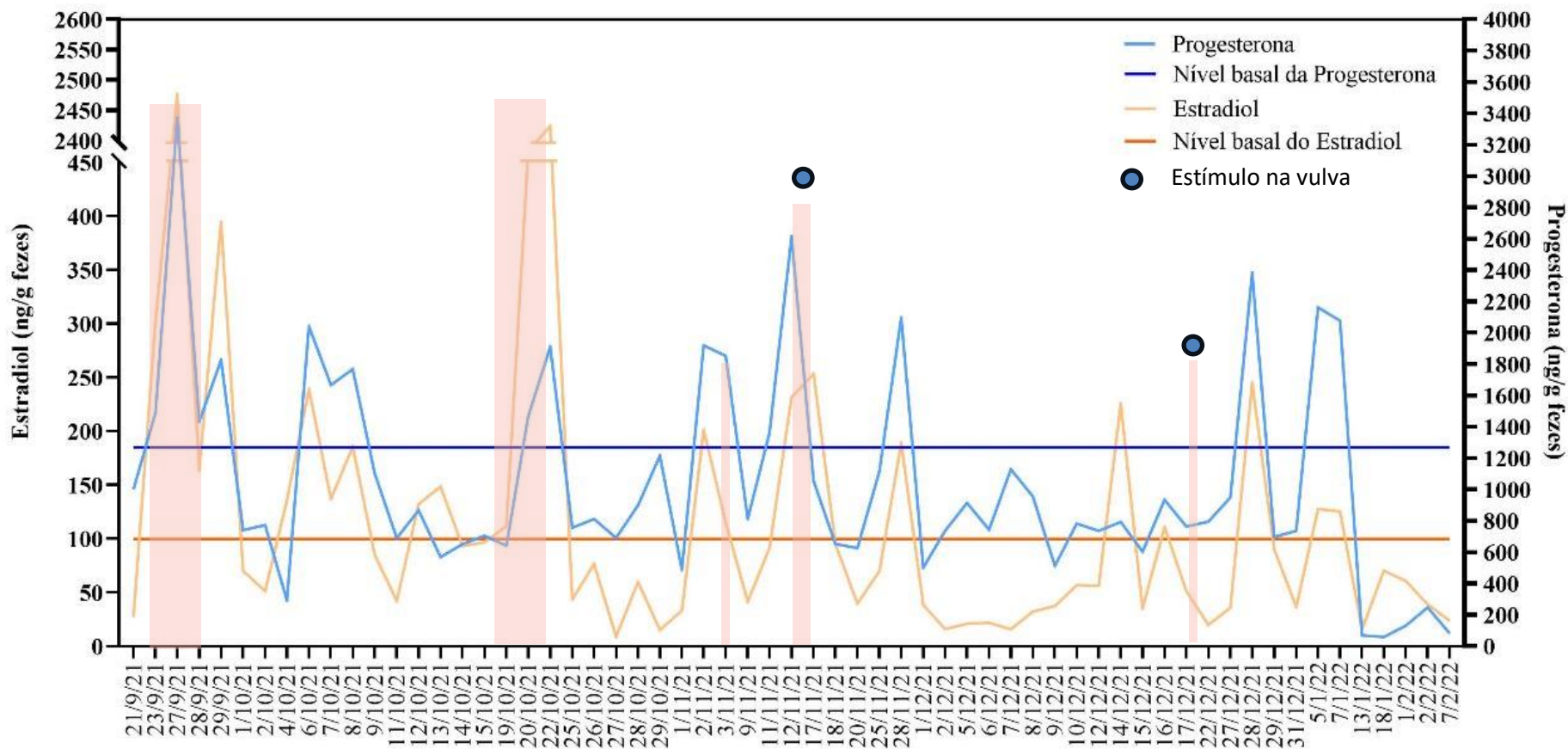


Figura 9: Níveis de metabólitos de E2 e P4 da sussuarana Locki, mostrando as variações destes hormônios, bem como suas linhas de base, ao longo do período de observação dos animais. Retângulos rosa demonstram períodos de comportamento de estro.

Para a sussuarana Locki comportamento de *pacing* foi observado no total de 65 minutos que se concentraram em 5 dias (Figura 10). Também ficou muito tempo dentro do cambiamento, ficando não visível para o observador.

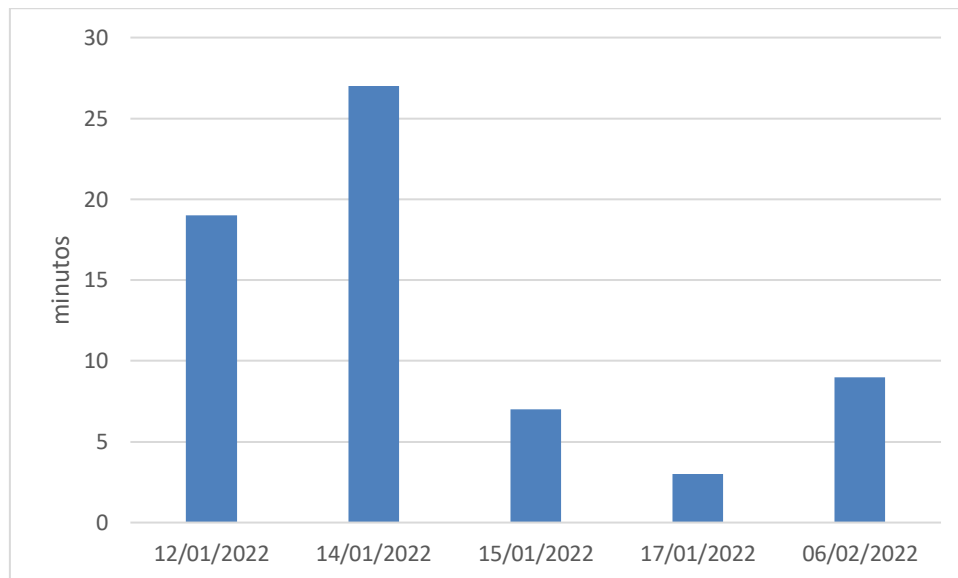


Figura 10: Datas que a sussuarana Locki apresentou mais comportamento de pacing de acordo com a observação de comportamento.

Na Figura 11 são apresentados os níveis de metabólitos de cortisol, e podemos observar que a linha de base neste caso ficou elevada (1235 ng/g), o que fez com que picos não fossem muito evidenciados. Apenas 1 pico de metabólitos de cortisol coincidiu com o comportamento de *pacing observado na sussuarana Locki* (Figura 11).

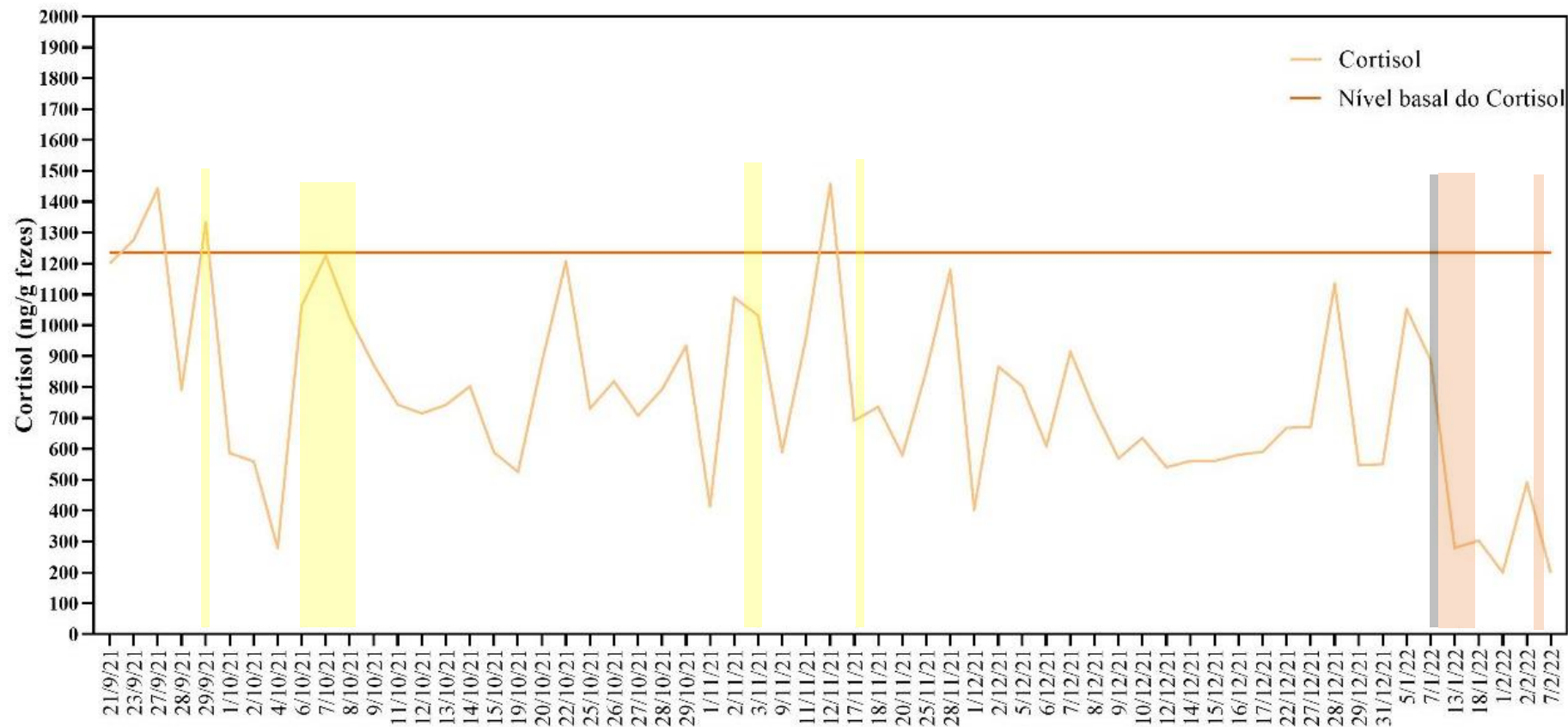


Figura 11: Níveis de cortisol da sussuarana Locki, mostrando os picos do hormônio e a linha de nível basal da sussuarana Locki. Retângulo amarelo indica não visível; Retângulo rosa indica comportamento de pacing e o cinza indica enriquecimento ambiental.

Sussuarana (Nala)

A sussuarana Nala apresentou comportamentos de proestro, como vocalização excessiva nos dias 21 de setembro, 6, 8, 9, 10, 15, 24, 29, 31 de outubro, 10, 12, 14, 30 de novembro, 1, 2, 18 de dezembro e 2 e 5 de janeiro. Desses dias, a fêmea apresentou também agachamentos com hiperextensão do trem posterior, lordose e lateralização da cauda nos dias 10, 15, 24, 29 e 31 de outubro, 10 de novembro, 18 de dezembro e 5 de janeiro. A duração total destes comportamentos está ilustrada na Figura 12. E nos dias 10 de outubro e 2 de janeiro copulou com o macho (Figura 13), caracterizando comportamento de estro, totalizando 16 dias de cio.

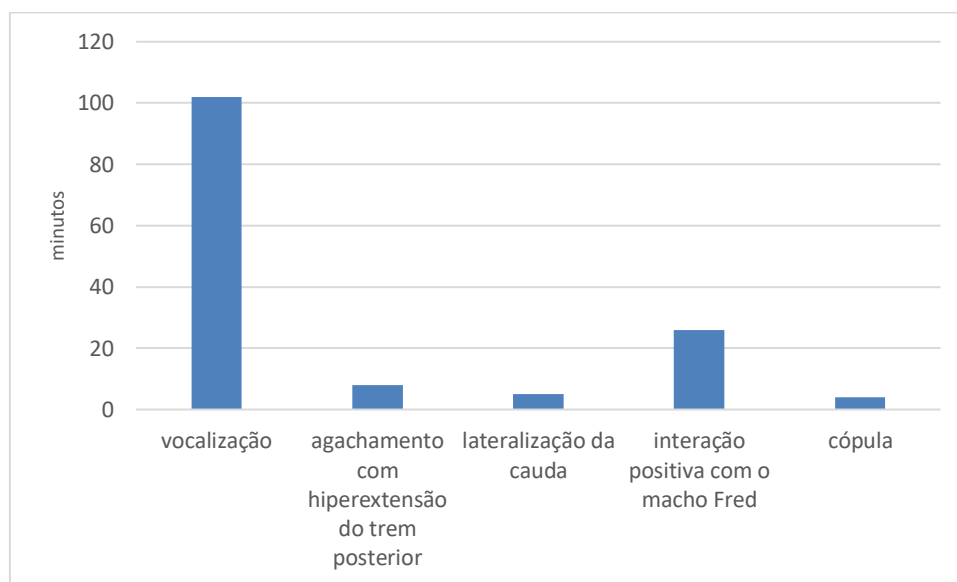


Figura 12: Frequência de observação de comportamentos reprodutivos da sussuarana Nala.



Figura 13: Nala e Fred no momento da cópula.

O período total de coleta de amostras de fezes da Nala foi de 2 meses, e neste período houve apenas 17 amostras de fezes coletadas. Os níveis de metabólitos de E2 e P4 da sussuarana Nala podem ser observados na Figura 14. Nala apresentou apenas 1 pico de metabólitos de E2, no dia 18 de outubro (940 ng/g) que não coincidiu com comportamento de estro observado. Nos outros estros observados, não houve picos de nenhum dos dois hormônios. Como as amostras de fezes da sussuarana Nala eram escassas, com intervalos grandes entre as coletas, é possível que tenha havido outros picos de metabólitos de E2 que, no entanto, não foram identificados.

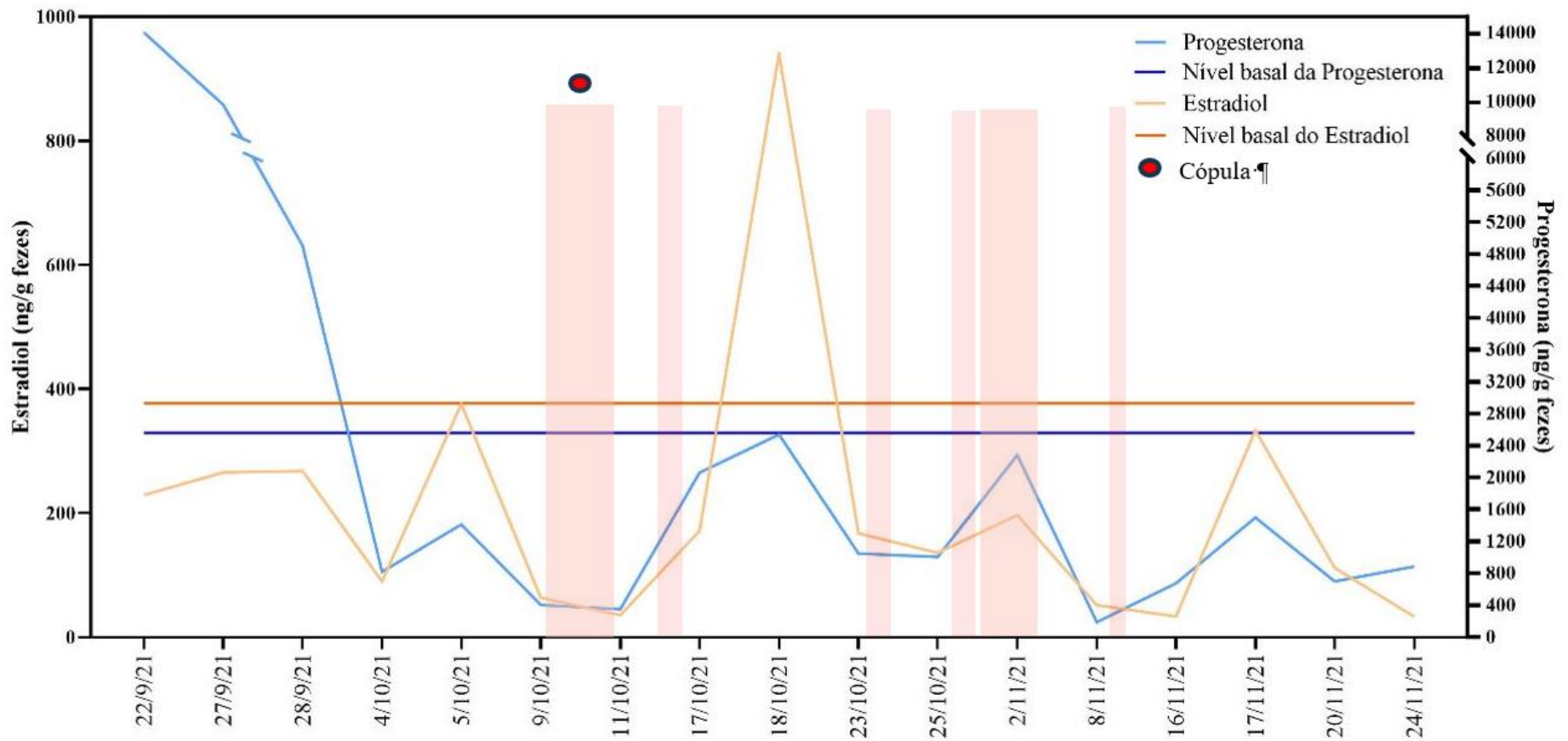


Figura 14: Níveis de metabólitos de E2 e P4 da sussuarana Nala, mostrando as variações destes hormônios, bem como suas linhas de base, ao longo do período de observação do comportamento. Retângulos rosa demonstram períodos de comportamento de estro.

É importante chamar atenção à quantidade de amostras obtidas desse indivíduo. Como Nala coabitava com outros 2 animais, a coleta das fezes dependia da sua entrada no cambiamiento, assim como de todos os outros animais no recinto, para que os tratadores pudessem entrar com segurança para recolhimento das amostras. Porém pela constante movimentação de tratadores e caminhões perto do recinto, quando um ou mais animais se recusavam a entrar no cambiamiento a coleta de fezes não era realizada. Com isso os intervalos entre as coletas de amostras de fezes ficaram muito longos, prejudicando a análise dos hormônios no gráfico.

Apesar disso, Nala não apresentou comportamentos repetitivos ou estereotípias caracterizando comportamento de estresse, o que não quer dizer que não sofra do mesmo. Na Figura 15 podem ser observadas as variações dos metabólitos do hormônio cortisol da Nala. Novamente, a linha de base neste caso ficou elevada (1821 ng/g fezes), o que fez com que picos de metabólitos de cortisol não fossem evidenciados.

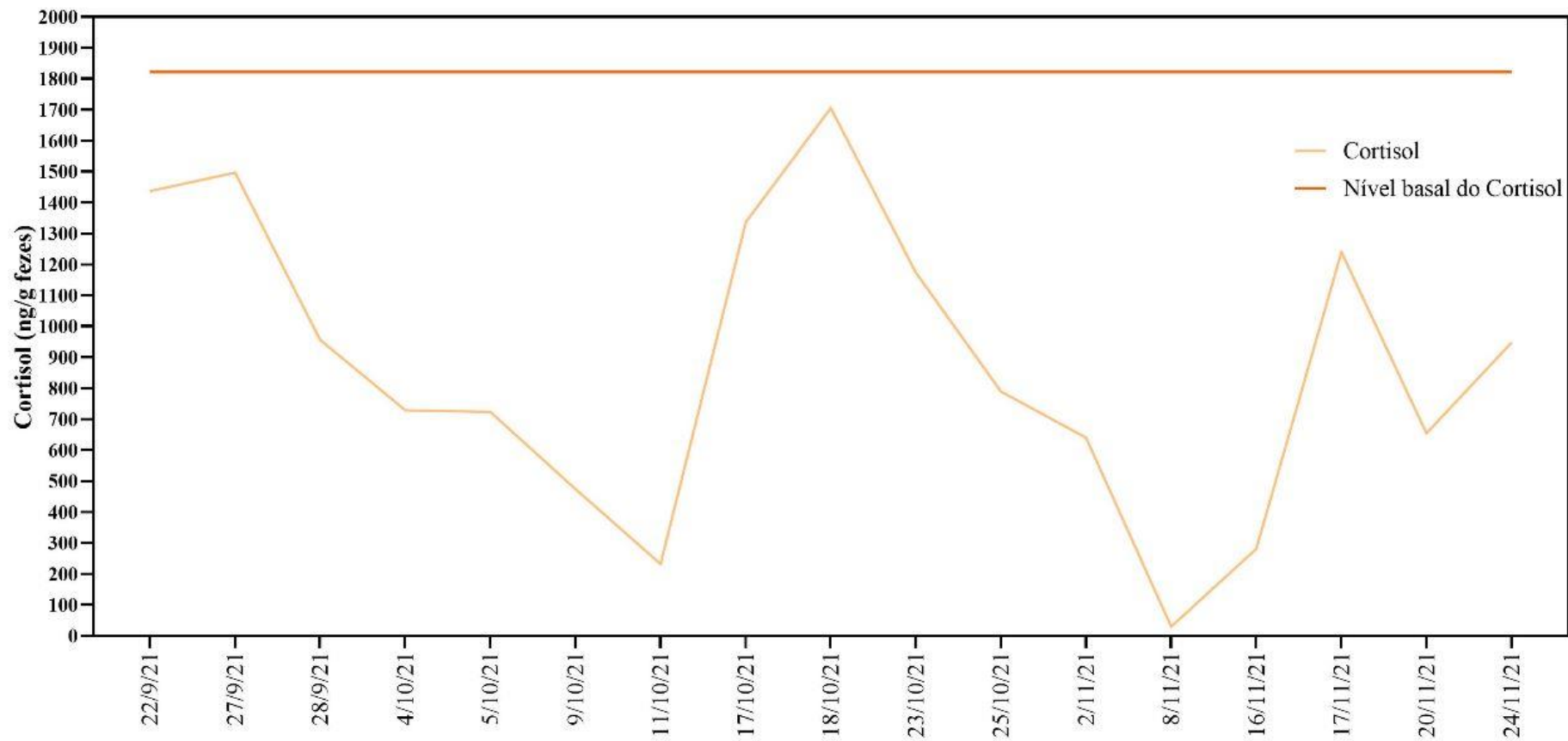


Figura 15: Níveis de metabólitos de cortisol da sussuarana Nala.

Gata do mato pequena (Potira)

A fêmea de gato do mato pequena, Potira, coabita o recinto com um macho da mesma espécie não castrado. Houve alguns registros de interação entre os dois indivíduos caracterizando comportamentos reprodutivos, incluindo cópula (Figura 16), os mais visualizados podem ser conferidos na Figura 17.



Figura 16: Interação positiva e cópula entre Potira e o macho Tupã

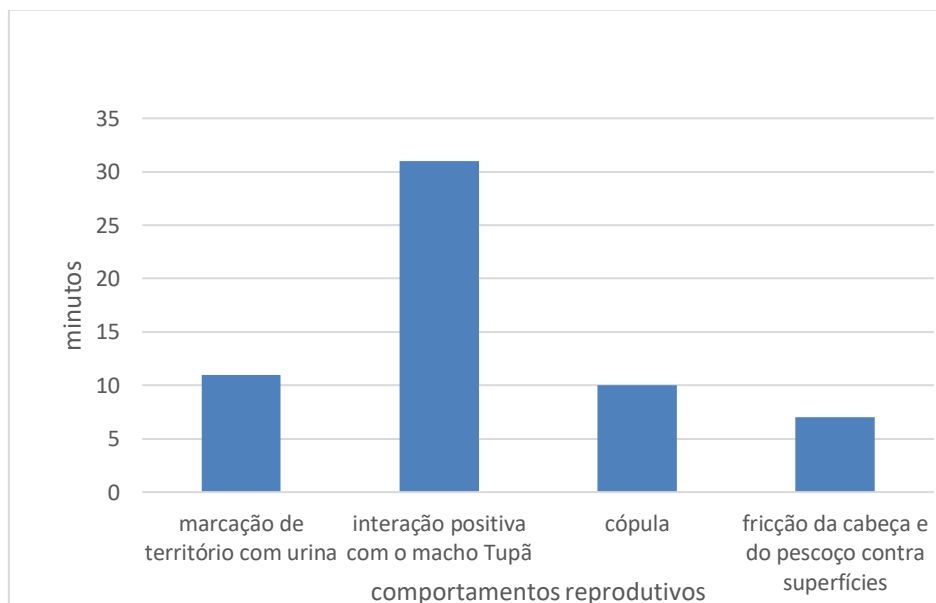


Figura 17: Frequência de comportamento reprodutivo da gata do mato pequena Potira em minutos observados.

O período de coleta de amostras de fezes da gata do mato pequena Potira durou 4 meses e meio, e totalizou 82 amostras coletadas. Durante esse período houve vários grandes picos coincidentes de metabólitos de E2 e P4 (Figura 18). No mesmo período foram observados 3 comportamentos característicos de estro, inclusive com cópula. Especificamente nos dias 4 a 10 de novembro e 10 a 17 de dezembro, foram observados picos de metabólitos de P4 e queda concomitante no nível de E2. Os dois animais sempre apresentaram bastante interação positiva durante a pesquisa. O intervalo entre os picos de metabólitos de E2 variou de 4 a 21 dias.

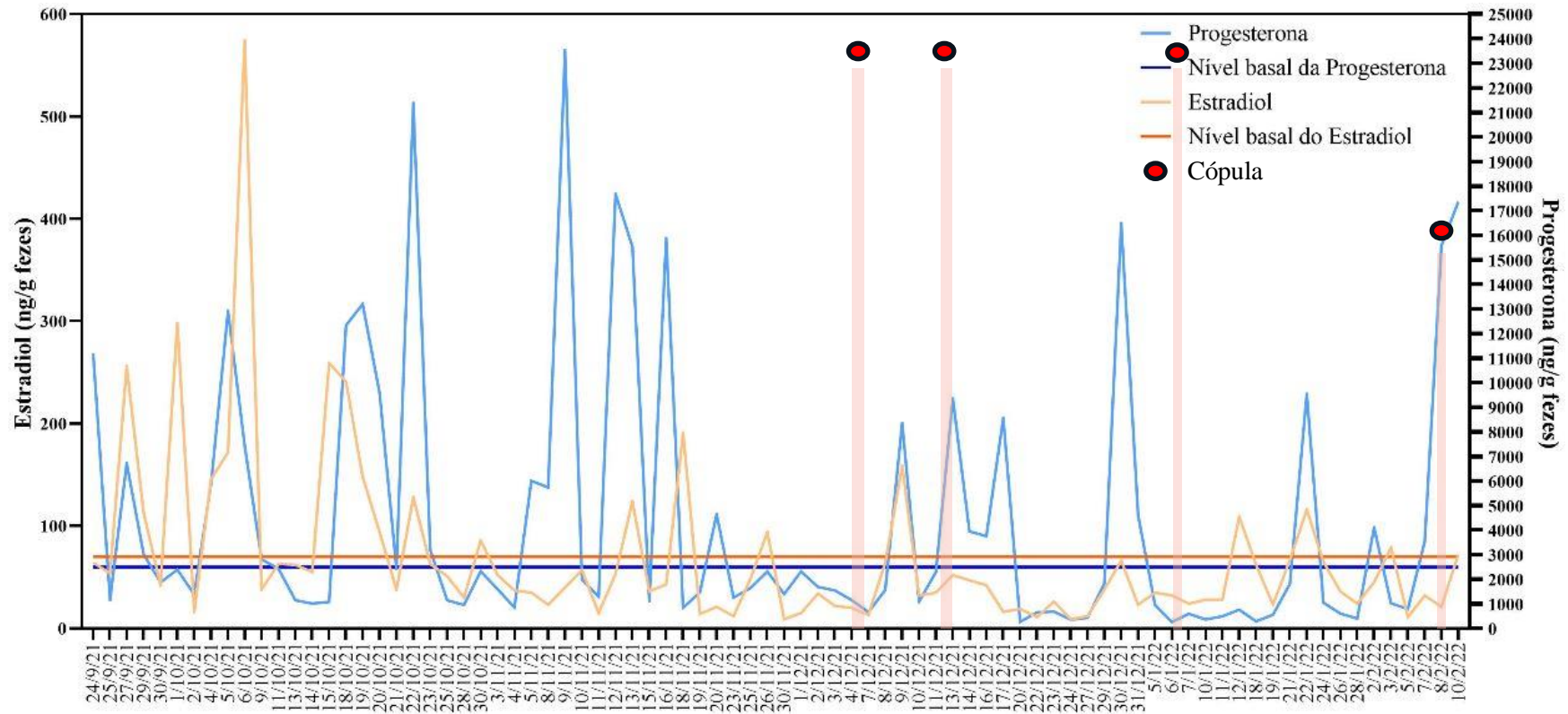


Figura 18: Níveis de metabólitos de E2 e P4 da fêmea de gato do mato pequeno Potira, mostrando as variações destes hormônios, bem como suas linhas de base, ao longo do período de observação do comportamento. Retângulos rosa demonstram períodos de comportamento de estro.

Comportamentos estereotipados ou repetitivos não foram apontados nas observações. Outros comportamentos apresentados estão expostos na Figura 19.

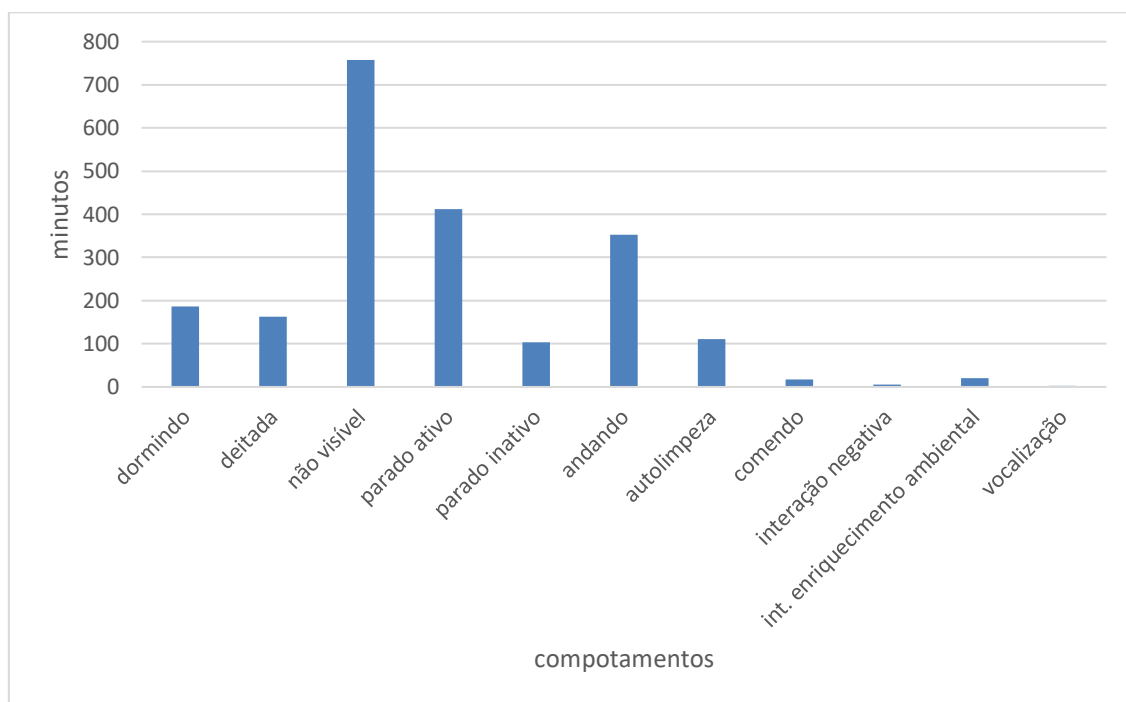


Figura 19: Duração de comportamentos aleatórios observados durante a pesquisa da gata do mato pequena Potira.

Alguns picos de metabólitos de cortisol puderam ser identificados na análise dos esteroides fecais da gata do mato pequena, demonstrados na Figura 20. Um desses picos (29 de setembro) pode ser relacionado com o deslocamento para realização de exames no hospital veterinário do zoológico. Também pode ser observado um grande pico em 18 de outubro, mesmo dia em que foi observado ansiedade perto do horário da alimentação, na presença do tratador. Neste dia Potira ficou agitada e andando pelo mesmo percurso dentro do recinto repetidas vezes. Este mesmo comportamento perante a presença do tratador também foi observado nos dias 13 de novembro e 8 de fevereiro, e sendo apenas o comportamento do dia 13 de novembro concomitante com um pico de metabólitos de cortisol. Nos dias 6 e 15 de dezembro Potira apresentou *pacing*, porém não houve picos nos mesmos dias. Os demais picos não tiveram correlação com comportamentos específicos que pudessem caracterizar ansiedade ou estresse.

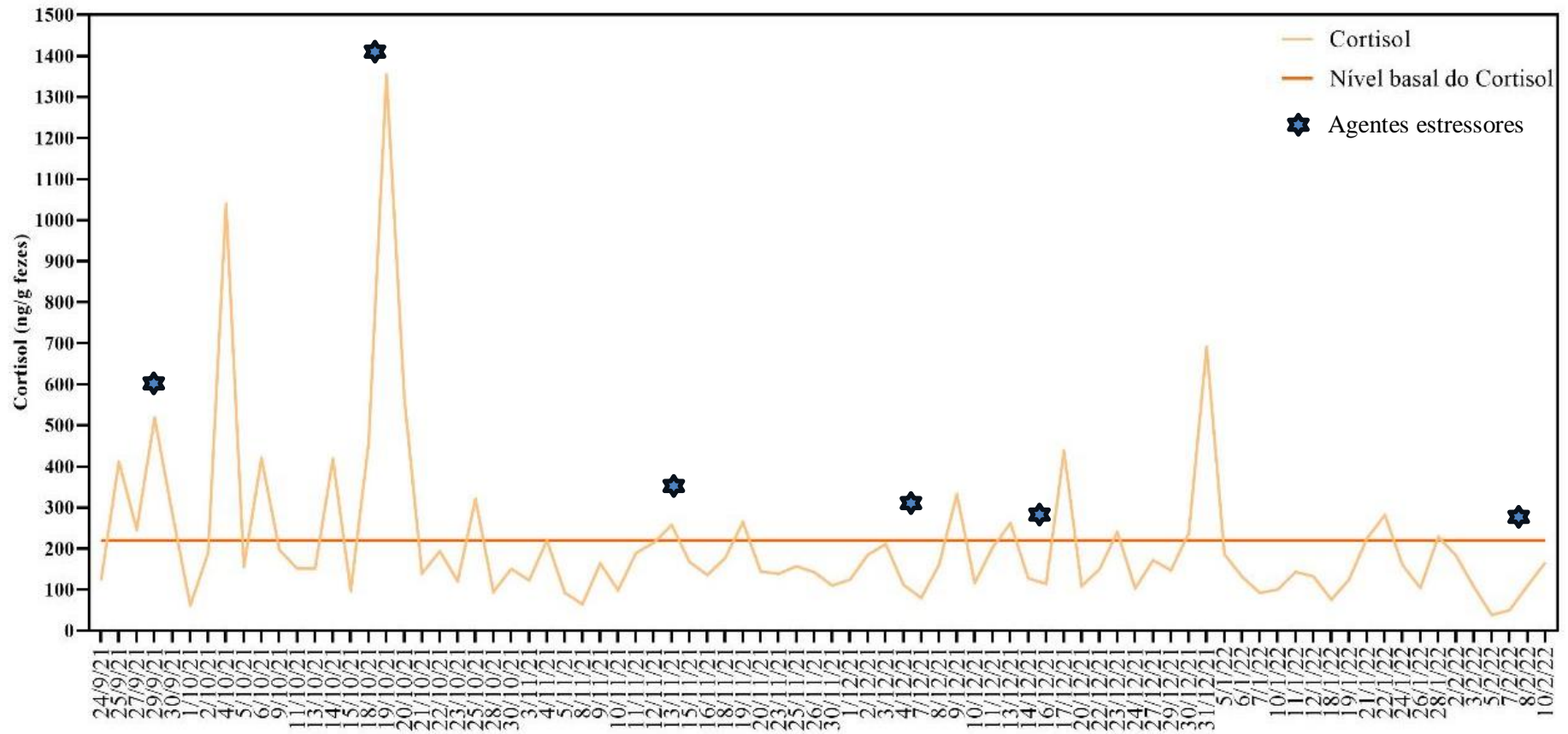


Figura 20: Níveis de metabólitos de cortisol, mostrando os picos do hormônio e a linha de nível basal, da gata do mato pequena Potira.

Jaguarundi (Fênix)

A jaguarundi Fênix habitava um recinto sozinha, e durante as observações não apresentou nenhum comportamento que caracterizasse proestro ou estro. Além disso, era um animal que não tinha comportamentos intensos, nem estereotípias.

Na Figura 21 podemos visualizar os comportamentos predominantes da Fênix. Pode ser observado que não são comportamentos atípicos, e salientar que os comportamentos que ela mais apresentou foi o de “deitada” e “parada ativo”, que pode ser explicado pelo animal ficar parado em algum local do recinto apenas percebendo que está acontecendo em sua volta.

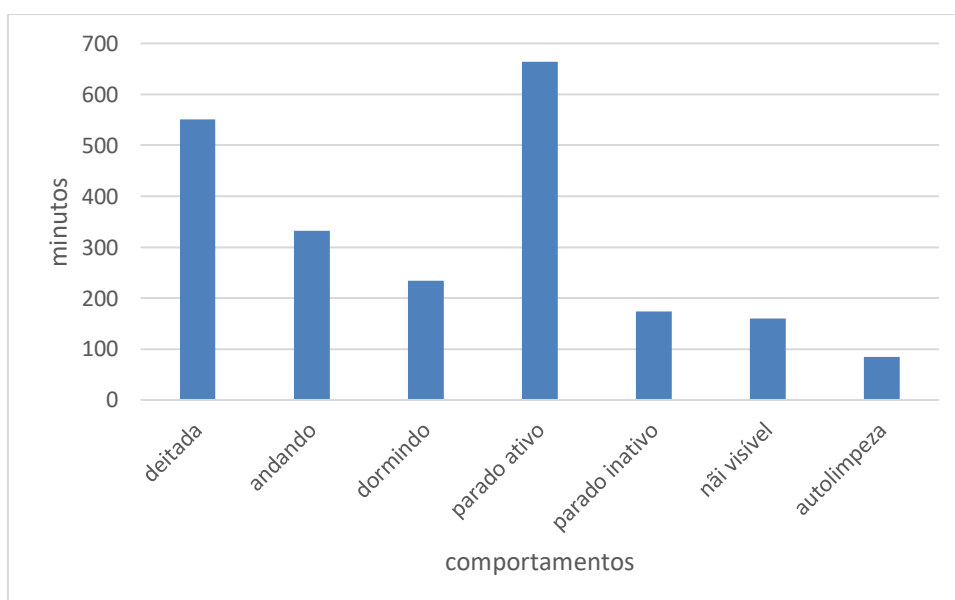


Figura 21: Frequência de comportamentos aleatórios da jaguarundi Fênix.

Enquanto era realizado o estudo, Fênix apresentou vários picos de metabólitos de E2 (Figura 22), sendo dois concomitantes com metabólitos de P4 (nos dias 25 de outubro e 10 de dezembro), porém não foi anotado nenhum comportamento característico relacionado à reprodução.

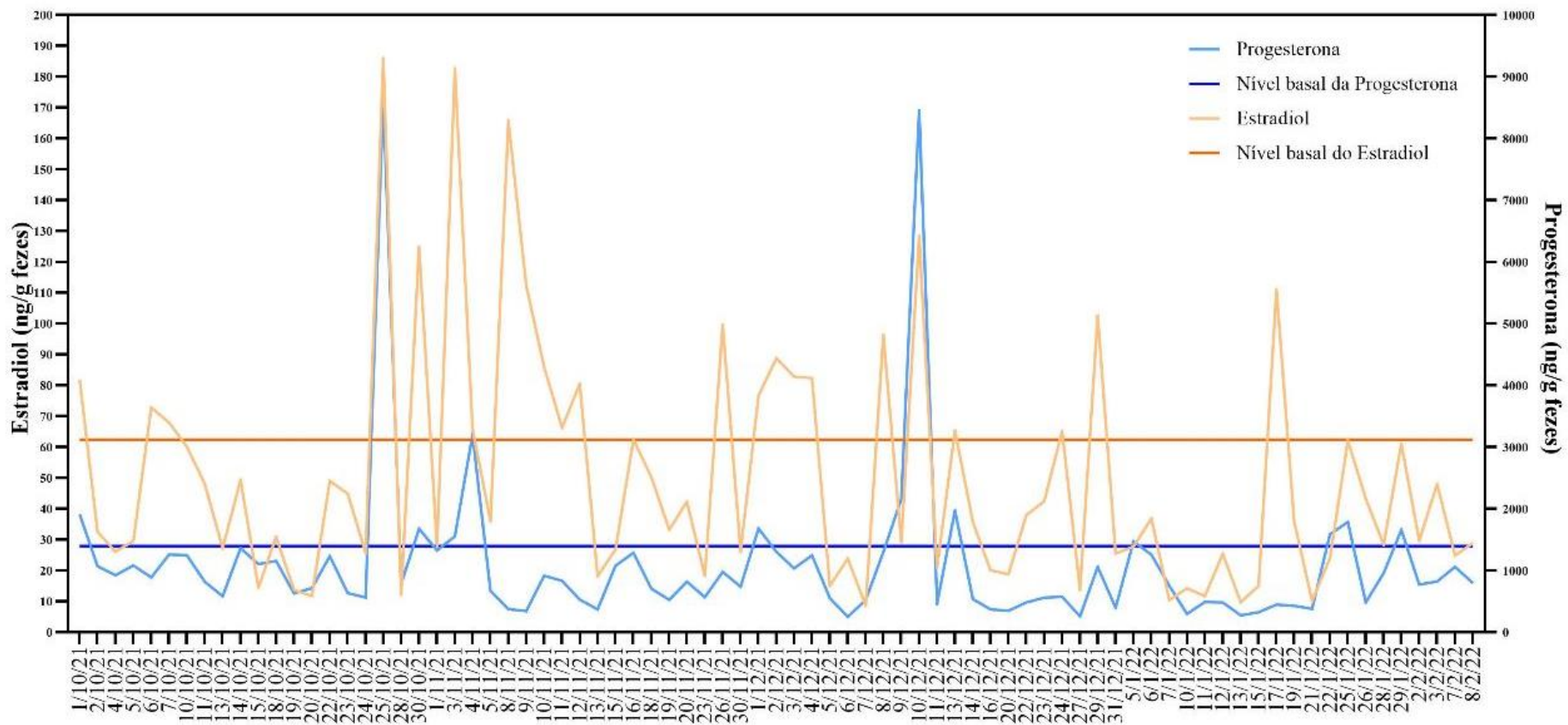


Figura 22: Níveis de metabólitos de E2 e P4 da jaguarundi Fênix, mostrando as variações destes hormônios, bem como suas linhas de base, ao longo do período de observação dos animais.

Na dosagem de metabólitos de cortisol (Figura 23) foi observado um período (6 a 18 de dezembro) de picos nas taxas apresentadas, porém nenhum comportamento de estresse foi observado. No dia 25 de outubro, foi oferecida dentro do recinto uma bola feita de papel com feno e pedaços de carne dentro, como técnica de enriquecimento ambiental, mas não foi detectada nenhuma alteração importante no nível de metabólitos de cortisol no período.

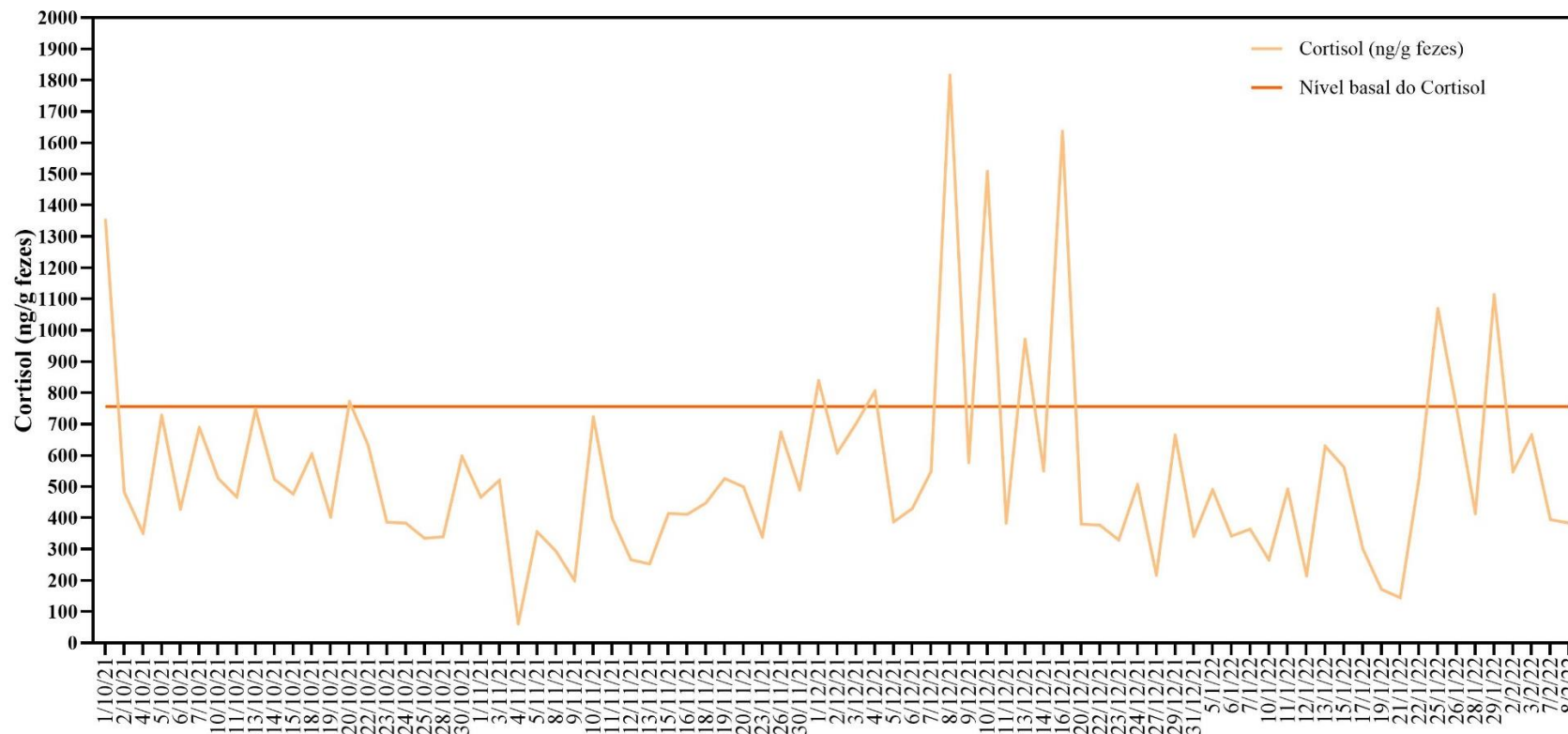


Figura 23: Gráfico dos metabólitos do hormônio cortisol, mostrando os picos do hormônio e a linha de nível basal da jaguarundi Fênix.

Os resultados resumidos de todos os animais do presente estudo, estão compilados no Quadro 4.

Quadro 4: Tempo de coleta, quantidade de amostras de fezes, níveis basais e quantidade de picos dos metabólitos de E2, P4 e cortisol, e duração dos ciclos estrais das sussuaranas Locki e Nala, da gata do mato pequena Potira e da jaguarundi Fênix

Animais	Tempo de coletas (meses)	N de amostras	E2			P4		CORTISOL	
			Nível basal (ng/g fezes)	N de picos	Ciclo estral (dias)	Nível basal (ng/g fezes)	N de picos	Nível basal (ng/g fezes)	N de picos
LOCKI	4,5	61	99	8	7 a 16	1267	8	1235	2
NALA	2	17	376	1	?	2558	0	1821	0
POTIRA	4,5	82	70	13	4 a 21	2499	13	219	14
FÊNIX	4	79	62	14	5 a 21	1393	8	756	7

DISCUSSÃO

Estudos com felídeos selvagens *ex situ* são desafiadores, e é comum apresentarem um número de animais relativamente pequeno, como aquele de Brown *et al* (2002) que estudaram 6 fêmeas de gatos de Pallas, Moreira *et al* (2001) que avaliaram 3 jaguatiricas, 2 fêmeas de gato do mato e 2 de gato maracajá, e Viau *et al* (2005) que trabalharam com 5 onças pintadas. Esse fato acontece porque as instituições que abrigam felídeos selvagens normalmente não possuem um grande número desses animais. Além disso, sempre há a dificuldade de obter amostras para estudos, que dependem de uma série de fatores como ajuda dos cuidadores dos animais, capacidade do animal em aceitar a manipulação, local de acesso às amostras, mesmo que elas sejam menos invasivas como por exemplo coletas de fezes.

No presente estudo, foram coletados dados do comportamento e amostras de fezes de 4 fêmeas felinas residentes do Zoológico de Brasília durante um período que variou de 2 a 4,5 meses. Especificamente para uma das sussuaranas (Nala) o número de amostras de fezes foi bastante reduzido. Isto ocorreu por esta fêmea habitar o mesmo recinto que outros 2 animais, de forma que os 3 tinham que entrar no cambiamento para permitir a entrada dos tratadores com segurança ao local. Se apenas um desses animais

simplesmente não entrava na área de contenção, a coleta das fezes ficava impossibilitada. Animais selvagens frequentemente não são condicionados ou aceitam ser manipulados. O trabalho junto a esses animais exige expertise e cuidado, pois acidentes podem acontecer por serem animais selvagens, como mordidas e arranhões. Esses acidentes podem acontecer por excesso de confiança ou associação sentimental do tratador com o animal, descuido ou cansaço. Além disso os animais podem ter seus comportamentos alterados por inúmeras razões, como idade, ciclo reprodutivo, hierarquia, doença ou defesa territorial (LECAROS *et al*, 2010).

Foi registrado que mesmo estando em cativeiro, todas as fêmeas desse estudo apresentaram ciclos estrais com frequência e duração considerados normais para felídeos. A sussuarana Locki apresentou ciclos com duração de 7 a 16 dias, a gata do mato pequena Potira apresentou ciclos com duração de 4 a 21 dias e a jaguarundi Fênix ciclos com intervalos de 5 a 21 dias. Estes dados são coerentes com os descritos por Brown *et al* (2006), que relatam que os ciclos da maioria das espécies de felídeos duram em média de 10 a 20 dias, podendo variar dentro da mesma espécie. Em gatas domésticas, a espécie felina mais estudada, a duração do ciclo estral pode ser bastante variável, sendo tão curto quanto 4 dias e tão longo quanto 42 dias, de acordo com Feldman e Nelson (2004). Herrick *et al* (2010) observaram ciclos estrais de 11 a 12 dias em média em gatas bravas de patas negras (*Felis nigripes*) e gatas do deserto (*Felis margarita*). Sabe-se ainda que em situação de cativeiro, sob cuidados humanos, alguns animais podem alterar seu comportamento reprodutivo natural, por exemplo suprimindo comportamentos de estro, como foi descrito por Herrick *et al* (2010), num estudo realizado com pequenos felídeos selvagens. É possível que este tenha sido o caso da jaguarundi Fênix, que apesar de ter apresentado vários picos de metabólitos de E2 não demonstrou comportamentos característicos de cio.

Os níveis basais de metabólitos de E2 encontrados nesse estudo foram de 99 ng/g de fezes para a sussuarana Locki, 70ng/g de fezes para a gata do mato pequena Potira, e 62 ng/g de fezes para a jaguarundi Fênix. Segundo Santymire *et al* (2011), a linha de base de metabólitos de E2 em gatas pescadoras foi de 87,3 ng/g de fezes, o que se aproxima dos valores

encontrados no presente estudo. Uma exceção foi o observado para a sussuarana Nala, que apresentou valor basal mais elevado (376 ng/g de fezes), provavelmente por causa da quantidade menor de amostras de fezes coletadas desse indivíduo. Com relação ao valor obtido pela dosagem de metabólitos de E2 em fêmeas de leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*), outro grande felino, Brown *et al* (1995) relataram pico pré-ovulatório de metabólitos de E2 de 231 ng/g fezes secas em estro natural (média de 8 animais), o que diferiu tanto do observado para as sussuaranas quanto para as fêmeas de pequenos felídeos do presente estudo. Já o trabalho de Herrick *et al* (2010), descreve nível basal de metabólitos de E2 de 1307 ng/g e pico de 2962 ng/g de fezes secas para a gata brava de patas negras, e nível basal de 493 ng/g e pico de 1669 ng/g de fezes secas para as gatas do deserto. As divergências encontradas entre os trabalhos anteriores e o nosso podem ser devidas tanto às espécies estudadas, quanto à diferença no método de dosagem hormonal, já que em nosso estudo usamos enzimoimunoensaio (ELISA) e os demais utilizaram radioimunoensaio (RIA). Fragoso (2013) estima que estes dois métodos sejam diferentes quantitativamente, apesar de semelhantes qualitativamente.

Já o comportamento dos picos de metabólitos de E2 para as fêmeas de pequenos felídeos do presente estudo apresentou semelhança com o descrito por Santymire *et al* (2011) e Herrick *et al* (2010). Santymire *et al* (2011) relataram uma média de pico de estrogênio 5 vezes maior do que a linha de base em gatas pescadoras, um pequeno felino. Da mesma forma, Herrick *et al* (2010) descrevem aumento de 2,7 vezes o nível basal em fêmeas de gato bravo de patas negras e gato do deserto durante o comportamento de estro. No presente trabalho a gata do mato pequeno Potira apresentou pico 8 vezes maior que a linha de base, e a jaguarundi Fênix 3 vezes maior que a linha de base, o que se assemelha aos dois estudos citados. Por outro lado, para a fêmea de grande felino (sussuarana Locki) houve pico de metabólitos de E2 25 vezes maior que a linha de base (2476 ng/g de fezes), bem diferente do descrito para pequenos felídeos por Herrick *et al* (2010) e Santymire *et al* (2011). Comparar a relação entre picos e o valor basal para estabelecer um paralelo entre as fêmeas de felídeos do presente estudo e das fêmeas dos

estudos da literatura tem maior probabilidade de refletir semelhanças e/ou diferenças entre as espécies do que comparar o valor numérico obtido.

Os picos de metabólitos de E2, em vários momentos, coincidiram com as observações de comportamentos de estro, o que também foi observado por outros autores (Herrick *et al* 2010). Porém, no presente estudo, quando os picos existiam e não eram observados comportamentos característicos de estro, não se pode afirmar que não houve estro, pois devido ao tempo de observação diária de 30 minutos para cada animal, o comportamento pode ter ocorrido em um momento fora do período de observação. Tempos de observação de 30 minutos a 1 hora são comuns em estudos de avaliação de comportamento de animais (SILVA *et al* 2014; CALDEIRA e SANTOS, 2019; SILVA e SANTOS, 2020). De modo geral, fêmeas felinas apresentam período de estro com duração de mais de um dia e com manifestações comportamentais bastante intensas (MICHAEL, 1961; JOHNSTON *et al*, 2001; FELDMAN & NELSON, 2004; BROWN, 2011), o que facilitaria a visualização destes comportamentos. No entanto, é importante salientar também que o comportamento de felídeos sofre uma adaptação quando estão mantidos em cativeiro. Estes animais, apesar de serem de hábitos crepusculares ou noturnos na natureza, normalmente ficam agitados poucos minutos antes da hora da alimentação, já que sob cuidados humanos normalmente recebem a refeição rotineiramente no mesmo horário (SHEPHERDSON *et al*, 1993).

O nível basal observado de P4 da sussuarana Locki foi de 1267 ng/g de fezes, da sussuarana Nala foi de 2558 ng/g de fezes, o da gata do mato pequena Potira foi de 2499 ng/g de fezes e da jaguarundi Fênix foi de 1393 ng/g de fezes. Na pesquisa de Rodini (2008), em jaguarundis, os valores encontrados para o nível basal de P4 foi de 750 ng/g de fezes secas, que difere do encontrado no presente estudo. A P4, apesar de ter oscilação ao longo do ciclo estral, e é um hormônio mais secretado quando da existência de corpo lúteo no ovário, e a maioria dos trabalhos utilizam as dosagem desse hormônio para identificar ou corroborar a presença desse corpo lúteo, sendo ele gravídico ou não (GRAHAM *et al*, 1994; BROWN, 1995; BROWN *et al* 1996; GRAHAM *et al*, 2000; BROWN *et al*, 2000; SANTIMARY *et al*, 2011; KINOSHITA *et al*, 2011). Porém no presente trabalho, apesar de picos de

metabólitos de P4 terem sido observados, a duração deles não sugere que tenha havido a formação de corpo lúteo em nenhum dos animais. Os valores encontrados na maioria dos trabalhos apresentam diferenças com o do presente estudo. Isso pode dever-se ao fato da técnica de RIA utilizada por eles, como já mencionado anteriormente, e, portanto, a avaliação do padrão desses hormônios nos animais tem maior chance de apresentar semelhanças e/ou diferenças entre as espécies de felídeos selvagens do que propriamente o valor numérico obtido. Em 1994, Graham *et al* conduziram um estudo com 18 fêmeas de felídeos (3 tigres, 3 leoas, e leopardos das neves, 2 guepardos, 2 lincês e 5 gatas domésticas) e concluíram que apenas as fêmeas de guepardos excretam P4 como componente principal nas fezes, os demais felídeos excretam metabólitos de prostágenos não identificados. Por esse motivo a utilização de um anticorpo com ampla reatividade cruzada deve ser escolhido para a identificação desse metabólito em felídeos.

A gata do mato pequena Potira apresentou alguns picos de metabólitos de P4 com duração de aproximadamente 5 dias, sendo que no mesmo período os níveis de metabólitos de E2 estavam baixos, o que poderia sugerir a formação de um corpo lúteo, em consequência de uma ovulação induzida por coito (elevação observada de 13 a 20 de dezembro) ou espontânea (elevação observada de 04 a 10 de novembro). Vários autores (GRAHAM *et al*. 2000, MOREIRA *et al* 2001, BROWN *et al* 2002, BROWN *et al* 2006) afirmam que a fase lútea de fêmeas felinas não grávidas dura em média de um terço a metade da gestação, sendo 2 a 4 vezes mais longa que um ciclo estral normal sem ovulação. No presente estudo, Potira apresentou ciclos com duração variando de 4 a 21 dias durante um período de 4,5 meses de observação. Considerando estes dados, não podemos afirmar que os períodos de metabólitos de P4 elevada com metabólitos de E2 baixo observados se devem a presença de corpo lúteo. Para a confirmação da presença de corpo lúteo faz-se necessária a realização de uma avaliação laparoscópica (HERRICK *et al*, 2010) ou ultrassonográfica, o que não foi realizado no presente estudo.

A sussuarana Locki realizava um comportamento que foi caracterizado como estímulo na vulva quando apresentava comportamento característico de estro. Ela se colocava em posição de hiperextensão dos membros e lordose

exatamente onde havia um arbusto dentro do recinto, sugerindo um estímulo na região, o que pode estimular uma ovulação induzida por um objeto. Rodini (2008) observou ovulação em gatas domésticas que tiveram contato físico com machos ou por outro estímulo, sem necessidade de cópula. Brown *et al* (1995) também descrevem que em várias espécies de felídeos selvagens pode ocorrer ovulação induzida independente de acasalamento, ocorrendo por estímulos físicos ou psicossociais, quando essas fêmeas coabitam com outra fêmea da mesma espécie, por exemplo. No entanto, no caso da sussuarana Locki, não houve elevação da P4 que sugerisse uma ovulação mesmo com esta estimulação.

Os níveis basais dos metabólitos de cortisol encontrados no presente trabalho diferiram bastante entre as fêmeas acompanhadas. Para a sussuarana Locki o nível basal dos metabólitos de cortisol foi 1235ng/g de fezes com o maior pico alcançando 1457 ng/g. Para a sussuarana Nala o basal foi de 1821ng/g de fezes e o maior valor dosado foi de 1705 ng/g. Da gata do mato pequena Potira o nível basal foi de 219 ng/g de fezes com pico de 1353 ng/g. E da jaguarundi Fênix nível basal de 756 ng/g de fezes e o pico de 1815ng/g. Foi observado ainda que os níveis de metabólitos de cortisol da Sussuarana Nala estavam sempre abaixo da linha basal, porém a própria linha basal foi bastante alta. Os níveis de metabólitos de cortisol encontrados nessa pesquisa não foram muito elucidativos, pois os animais não apresentaram picos coincidentes com o comportamento estereotipados e nem muito constantes, que possam sugerir estresse crônico, que pode ser definido quando os picos de metabólitos de cortisol forem constantemente acima da linha de base junto com comportamentos estereotipados característicos, facilmente visualizados (CALDEIRA e SANTOS, 2019), apesar de ter havido fatores estressores. Nogueira e Silva (1997) relataram que os níveis de metabólitos de cortisol podem diferir entre as espécies de felídeos e entre felídeos de uma mesma espécie, indicando que os níveis dos metabólitos de cortisol vão depender dos agentes estressores próximos ao animal avaliado. Segundo WIELEBNOWSKI *et al* (2002), uma boa análise dos metabólitos de cortisol pode elucidar problemas de manejo e comportamento indesejados ligados ao bem-estar do animal, e permitir assim, a implantação de estratégias para melhoria do manejo

e da qualidade de vida dos animais, especialmente os mantidos sob cuidados humanos. É importante considerar que a dosagem nas fezes pode não refletir o real estado de estresse dos animais (especialmente estresse agudo), já que o cortisol é um hormônio com flutuações rápidas no sangue e as dosagens de metabólitos de cortisol nas fezes avalia os níveis deste hormônio após ser metabolizado pelo fígado e a dosagem fecal ser referente à secreção de várias horas(WIELEBNOWSKI *et al*, 2002). No entanto, a utilização da avaliação dos esteroides fecais tem sido recomendada para espécies de felídeos não domésticos, justamente por ser menos invasiva e permitir demonstrar diferenças entre as espécies (GRAHAM *et al*, 1995).

Felídeos em geral são muito suscetíveis ao estresse, sendo que alterações de ambiente e contenções para procedimentos podem prejudicar o sistema imunológico e a eficiência reprodutiva. Agentes estressores podem induzir secreção de metabólitos de cortisol e P4 pelo córtex da adrenal em gatos domésticos, e alguns autores sugerem a dosagem desses dois hormônios para avaliar a resposta ao estresse (CHATDARONG *et al*, 2006; CUBAS *et al*, 2014). Já Stoebel *et al* (1982) e Cubas *et al* (2012) relatam que em situação de estresse crônico, os efeitos do cortisol induzem a diminuição na secreção de hormônio luteinizante (LH), E2 e P4, culminando na infertilidade do animal. No presente estudo, apesar da análise de metabólitos de cortisol não ter permitido tirar conclusões a respeito do nível de estresse dos animais avaliados, como todas as fêmeas do estudo apresentaram ciclicidade reprodutiva, podemos inferir que se estas fêmeas estavam com algum nível de estresse, este não era tão significativo.

Estudos com felídeos selvagens *ex situ* são poucos e limitados. Um levantamento de dados de todos os estudos com felídeos feitos no Brasil de 1945 a 2014 e encontrou apenas 107 pesquisas durante esse período com felídeos selvagens da América do Sul (MELO, 2016). O presente trabalho, apesar de apresentar limitações, fornece informações a respeito de três espécies de felídeos nativas da fauna brasileira – sussuarana, gato do mato pequeno e jaguarundi – contribuindo para o pouco conhecimento disponível a respeito de espécies de felídeos selvagens mantidos sob cuidados humanos.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentou níveis fecais de metabólitos dos hormônios estradiol, progesterona e cortisol em duas sussuaranas, uma gata do mato pequena e uma jaguarundi, habitantes do Zoológico de Brasília, fazendo um paralelo com a observação de comportamentos relacionados à reprodução e ao estresse.

Com relação à reprodução, todas as fêmeas apresentaram níveis oscilantes de metabólitos de estradiol e progesterona durante o período do estudo. Foi possível determinar o intervalo entre picos de estradiol (sugestivo de duração do ciclo estral) como sendo de 7 a 16 dias para sussuarana, de 4 a 21 dias para gata do mato pequena e de 5 a 21 dias para jaguarundi. Com exceção da jaguarundi, todas as outras fêmeas apresentaram comportamento típico de estro durante o estudo, muitas vezes concomitantes com os picos de estradiol observados. Os níveis de progesterona observados não foram sugestivos de formação de corpo lúteo em nenhuma das fêmeas, indicando que não houve ovulação, apesar de terem sido observadas cópulas das fêmeas que coabitavam com machos (sussuarana Nala e gata do mato pequena Potira).

Os níveis de metabólitos de cortisol obtidos no presente estudo não foram muito elucidativos. Os níveis basais de metabólitos fecais de cortisol no geral apresentaram valores elevados, e poucos picos foram observados em todos os animais. Não foi possível fazer correlação entre os níveis de cortisol e comportamentos relacionados a estresse. As fêmeas deste estudo, apesar de terem vivenciado estímulos estressores, na maior parte do tempo não apresentaram comportamentos típicos de animais estressados. Ademais, como todas as fêmeas apresentaram ciclicidade reprodutiva durante o período do estudo, podemos inferir que se estas fêmeas estavam com algum nível de estresse, este não era significativo a ponto de interferir na reprodução.

O presente trabalho mostrou a viabilidade de se realizar acompanhamento dos níveis de hormônios esteroides por meio da análise de amostras de fezes em felídeos mantidos sob cuidados humanos. No presente

estudo, tendo em vista que algumas vezes a coleta de amostras foi impossibilitada, ficou claro também que ao se trabalhar com animais selvagens, mesmo com metodologias mais práticas e não invasivas, o que realmente irá determinar a possibilidade de coleta de amostras é o próprio animal.

Os dados apresentados no presente trabalho vêm contribuir para o pouco conhecimento disponível a respeito de espécies de felídeos selvagens, especialmente as nativas da fauna brasileira. Até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a descrever os níveis de esteroides sexuais e comportamento reprodutivo durante a fase adulta em fêmeas de sussuarana e jaguarundi em ciclicidade natural, havendo apenas um outro trabalho com gatas do mato pequenas.

Por fim, é certo que para que os dados sejam confiáveis e consistentes é importante que o trabalho tenha um número maior de indivíduos estudados. Contudo, mesmo com limitações, estudos como esse são necessários para o maior conhecimento de aspectos reprodutivos dos felídeos selvagens. Estudos como o presente são possíveis por meio de parcerias de pesquisadores com instituições como zoológicos, que mantem essas espécies sob cuidados humanos, com objetivo de preservá-las e conservá-las. Estes estudos podem fornecer dados para implementação de manejos melhores, aumentando a possibilidade de reintrodução de espécimes na natureza, ou até mesmo de pareamento de casais com possível sucesso reprodutivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCO, A., PACHALY, J. R., BACILA, M. Síndrome do estresse em animais - revisão. Arq Bras Med Vet Zootec 71-76. 1999.

AZEVEDO, F.C; LEMOS, F.G.; DE ALMEIDA, L.B.; DE CAMPOS, C.B.; BEISIEGEL, B.M.; DE PAULA, R.C; CROSHAW JUNIOR, P.G.; FERRAZ, K.M.P.M.B.; OLIVEIRA, T.G. Avaliação do risco de extinção da Onça-parda, *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) no Brasil. BioBrasil 3, 107-121, 2013.

BARNES S.A., ANDREW TEARE J., STAADEN S., METRIONE L., PENFOLD L.M. Characterization and manipulation of reproductive cycles in the jaguar (*Panthera onca*). General Comp Endocrinol 225:95-103. 2016.

BENDER A L., VON MÜHLEN C. A. Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica. Imunologia clínica na prática médica. Cap 5. 2008. Disponível em: [Http://docente.ifsc.edu.br/rosane.aquino/MaterialDidatico/AnalisesClinicas/avaliacao%20de%20Testes-Laboratoriais-Aplicados-Imunologia-Clinica.pdf](http://docente.ifsc.edu.br/rosane.aquino/MaterialDidatico/AnalisesClinicas/avaliacao%20de%20Testes-Laboratoriais-Aplicados-Imunologia-Clinica.pdf). Acessado em: 25/08/2023

BRIAN E., WASHBURN, JOSHUA J., MILLSPAUGH. Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. General Comp Endocrinol 127:217-222, 2002.

BROWN J.L., GRAHAM L.H., WU J., COLLINS D., SWANSON W.F. Reproductive endocrine responses to photoperiod and exogenous gonadotropins in the Pallas' cat (*Otocolobus manul*). Zoo Biol 21:347-64. 2002.

BROWN J.L., WASSER S.K., WILDT D.E., GRAHAM L.H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. Biol Reprod. 51(4):776-86. 1994.

BROWN J.L., WILDT D.E., GRAHAM L.H., BYERS A.P., BARRETT S., HOWARD J.G. Comparison of natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroids. Biol Reprod 53:93-102. 1995.

BROWN J.L., WILDT D.E., WIELEBNOWSKI N., GOODROWE K.L., GRAHAM L.H., WELLS S., *et al.* Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. J Reprod Fertil 106:337–346. 1996.

BROWN, J.L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. Theriogenology 66:25–36. 2006.

BROWN, J.L. Female reproductive cycles of wild female felids. Anim Reprod Sci 124:155–162. 2011.

CALDEIRA, M.B.; SANTOS, C.M. Etograma comportamental de suçuarana (*Puma concolor*, Linnaeus, 1771) em um Zoológico Municipal. Rev Saberes Acad 3:125-134, 2019.

CAMPOS, B; QUEIROZ, V.S.; MORATO, R.G. GENARO G. Padrão de Atividade de Onças Pintadas (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) Mantidas em Cativeiro – Manejo e Comportamento. Rev Etol 7:75-77, 2005.

CARVALHO, D.C. Análise comparativa dos cativeiros de *Puma Concolor* e *Panthera onca* no criadouro conservacionista No extinction – Nex e na Fundação Jardim zoológico de Brasília/DF. 50f. 2011. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília, Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011.

CASTRO, L.S. Influências do enriquecimento ambiental no comportamento e nível de cortisol em felídeos silvestres. Dissertação de mestrado: 110f. 2009. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília: Brasília: 2009.

CUBAS, Z., SILVA, J., CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. 2 v.

CZEKALA N.M, DURRANT B.S., CALLISON L., WILLIAMS M., MILLARD S. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. Zoo Biol 13:119–28. 1994

DE ROUCK, M.; KITCHENER, A.C.; LAW, G.A comparative study of the influence of social housing conditions on the behavior of captive tigers (*Panthera tigris*). *Anim Welf*14, 229-238, 2005.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Ed. Saunders:1016-1044, 2004.

FRAGOSO, P.L. Métodos de imunoensaio não radiométricos - enzimaimunoensaio (EIA) - e radiométricos - radioimunoensaio (RIA) - na avaliação dos metabólitos fecais de glicocorticoides em gatos domésticos que vivem sozinhos e em pequenas colônias. Dissertação de mestrado: 99f. 2013. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, departamento de clínica médica, Universidade de São Paulo. São Paulo: 2013.

GARCIA, L.C.F.; BERNAL, F.E.M. Enriquecimento ambiental e bem-estar de animais de zoológicos. *Ciênc Anim Bras* 25:46-52, 2015.

GRAHAM L., SCHWARZENBERGER F., M€OSTL E., GALAMA W., SAVAGE A.A versatile enzyme immunoassay for the determination of progesterone in feces and serum. *Zoo Biol* 20:227-236. 2001.

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

GRAHAM, L.H., SWANSON, W.F., BROWN, J.L. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. *Theriogenology* 54:1117-31. 2000.

HASHIMOTO, C.Y. Comportamento em cativeiro e teste de eficácia de técnicas de enriquecimento ambiental (físico e alimentar) para jaguatiricas (*Leopardus pardalis*).154f, 2008. Dissertação (Mestrado) - Instituto de psicologia da universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HERRICK, J.R., Fecal endocrine profiles and ejaculate traits in black-footed cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*). *Gen Comp Endocrinol* 165:204–214. 2010

ICMBIO/ MMA. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Vol. 2. Brasília: ICMBio, 2018.

IUCN 2023. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em 12 de julho de 2023.

JERICÓ M. M., MENDONÇA B. B., OTSUKA, M., LARSSON C. E. Métodos de imunoensaio não-radiométricos [fluoroimunoensaio (fie) e enzimaimunoensaio (eie)] e o radioimunoensaio (rie) na avaliação da função adrenal de cães normais e cães com hiperadrenocorticismo. CR 32: 259-262. 2002.

JEPSEN EM, SCHEUN J, DEHNHARD M, KUMAR V, UMAPATHY G, GANSWINDT A. Non-invasive monitoring of glucocorticoid metabolite concentrations in native Indian, as well as captive and re-wilded tigers in South Africa. Gen Comp Endocrinol. Jul 1;308:113783. 2021.

JORGE-NETO, P.N. Biotecnologias reprodutivas aplicadas à produção de embriões in vitro de onça-parda (*Puma concolor*) e onças-pintadas (*Panthera onca*). Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de reprodução animal, São Paulo, 2019.

JORGE-NETO, P.N.; TRALDI, A.S.; REQUENA, L.A.; SOUZA, T.D.; CSERMAK JÚNIOR, A.C.; PIZZUTTO, C.S.; ARAÚJO, G.R.; LUCZINSKI, T.C.; BALDASSARRE, H. O que já sabemos sobre a reprodução de fêmeas de grandes felídeos? Anim Reprod Sci 45:259-266, 2021.

JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V., OLSON, P.N. Canine and Feline Theriogenology. Ed Saunders, p.396-405, 2001.

KINOSHITAA, K., OHAZAMA, M., ISHIDA, R., KUSUNOKI, H., Daily fecal sex steroid hormonal changes and mating success in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in Japan. Anim Reprod Sci 125: 204-210. 2011.

LECAROS, A., FALCON, N., ELIAS, R. Accidentes ocupacionales y zoonosis en profesionales que laboran en zoológicos y zocriaderos de Lima, Perú. Una Salud. 2:27-42, 2010.

LEMOS, V. Queimadas no Pantanal: a luta pela sobrevivência do maior felino das Américas em meio aos incêndios. BBC News Brasil. 15/09/2020. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-54153221> Acesso em: 15/09/2020.

LEONEL, E.C.R.; VILELA, J.M.V.; PAIVA, R.E.G.; JIVAGO, J.L.P.R.; AMARAL, R.S.; LUCCI, C.M. Restoration of fresh cat ovarian tissue function by autografting to subcutaneous tissue: A pilot study. *Theriogenology* 105:97-106. 2018.

LITTLE, S.E. O gato: medicina interna. 1 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015.

MAIA C. M. Comportamento de Onça-Parda (*Puma concolor*), no Zoológico de Campinas, frente à visitação pública. 41f, 2009. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2009.

MALANDAIN, E., RAULT, D., FROMENT, E., BAUDON, S., DESQUILBERT, L., BEGON, D., CHASTANT-MAILLARD, S. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. *Theriogenology*, 76: 1337-1346. 2011.

MALLAPUR, A.; CHELLAM, R. Environmental influences on stereotypy and the activity budget of Indian Leopards (*Panthera pardus*) in four zoos in Southern India. *Zoo Biol* 21:585-595. 2002

MASON, G.J.; LATHAM, N.R. Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator animal welfare, *Anim Welf* 13:57-69, 2004.

MATA, E.P.G. Estudo comportamental e efeitos da interação animal-visitante dos felinos do Zoológico de São Paulo. 2020. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2020.

MICHAEL, R.P. Observations upon the sexual behaviour of the domestic cat (*Felis catus L.*) under Laboratory Conditions. *Behaviour*, 18:1-24, 1961.

MICHELETTI, T., CUBAS, Z.S., MORAES, W., OLIVEIRA, M.J., MOREIRA, N. Reprodução natural de felídeos selvagens em cativeiro: dificuldades e orientações. Rev Bras Reprod Anim 36:39-43. 2012.

MOREIRA N, MONTEIRO-FILHO E.L.A., MORAES W., SWANSON W.F., GRAHAM L.H., PASQUALI O.L., GOMES, M.L.F., MORAIS, R.N., WILDT, D.E., BROWN, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus genus*. Zoo Biol 20:103–16. 2001.

MOREIRA N., BROWN J.L., MORAES W., SWANSON W., MONTEIRO-FILHO E. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). Zoo Biol 26:441-460, 2007.

MOREIRA, Nei. Reprodução e estresse em felídeos silvestres. Rev Bras Reprod Anim 31:333-338, 2007.

MORELAND R.B., BROWN J.L., WILDT D.E., HOWARD J.G. Basic reproductive biology of the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*). Biol Reprod 66(Suppl. 1):328. 2002.

MOREZZI, B. B.; ALVES, I. S.; KAWANICHI, L. A.; BERGAMO, M. C. S.; PIRASOL, M. G.; SANTOS, M. I.; VIEIRA, F. de P. R.; CAMARGO, M. H. B. Enriquecimento ambiental em zoológicos. Pubvet 15:1-9, 2021.

MUNRO C.J., STABENFELDT G.H., CRAGUN J.R., ADDIEGO L.A., OVERSTREET J.W., LASLEY B.L. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. Clin Chem 37:838-844. 1991.

NACARATTI, M. A.; ROCHA, C. S.; SILVA, S. C. F. Ciclo estral da fêmea felina silvestre em cativeiro. BJAER 4:6304-6308 2021.

NARAYAN, E.J; PARNELL, T; CLARK, G; MARTIN-VEGUE, P; MUCCI, A; HERO, J.M. Faecal cortisol metabolites in Bengal (*Panthera tigris tigris*) and Sumatran tigers (*Panthera tigris sumatrae*). Gen Comp Endocrinol. 1;194:318-25 2013.

NUÑEZ-PEREZ R.; MILLE B. Movements and Home Range of Jaguars (*Panthera onca*) and Mountain Lions (*Puma concolor*) in a Tropical Dry Forest of Western Mexico. In: REYNAHURTADO, R.; CHAPMAN C. A. (Org.). Movement Ecology of Neotropical Forest Mammals. Ed. Focus on Social Animals, 2019. P. 243–262, 2019.

ORSINI, H. e BORDAN E.F. Fisiopatologia do estresse em animais selvagens em cativeiro e suas implicações no comportamento e bem-estar animal – revisão da literatura. Rev Inst Ciênc Saúde 24:7-13. 2006.

PAGANI, R.S., MENDICELLI, G.P., ZANARDO, G.L.P., ARDANAZ, R.F., MAAS, C.H., REIS, A.C.G., PIZZUTTO, C.S. Utilização de sementes como marcador fecal para identificação e individualização de leões-angolanos (*Panthera leo bleyenberghi*) sob cuidados humanos. Anais do 43º Congresso da Associação de Zoológicos e Aquários do Brasil 207-210. 2019.

Parque das Aves. Parque das Aves. 06 de Março de 2018. <https://blog.parquedasaves.com.br/2018/03/um-centro-de-conservacao-integrada-de-especies-da-mata-atlantica-enquanto-zoologico-moderno/> (acesso em 16 de Junho de 2020).

REICHERT-STEWART J.L., SANTYMIRE R.M., ARMSTRONG D., HARRISON T.M., HERRICK J.R. Fecal endocrine monitoring of reproduction in female snow leopards. Theriogenology 82:17-26. 2014.

RIVERA, E.A. Estresse em animais de laboratório - Scielo Books. 2002. <http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-31.pdf> (acesso em 18 de Junho de 2020).

RODINI, D.C. Perfil analítico de progetinas fecais nas fases de puberdade e ciclicidade ovariana em Onça Pintada (*Panthera onca*); gestação e lactação de gato mourisco (*Puma yagouaroundi*). 2008. 74f Tese (Doutorado em Reprodução Animal) Departamento de Reprodução Animal. Universidade de São Paulo. São Paulo:2008.

SANTYMIRE, R. M., J. L. BROWN, R. A. STEWART, R. C. SANTYMIRE, D. E. WILDT, e J. HOWARD. Reproductive gonadal

steroidogenic activity in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*) assessed by fecal steroid analyses. *Anim Reprod Sci* 128:60-72. 2011.

SCHWARZENBERGER, F., MÖSTL, E.; PALME, R., BAMBERG, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim Reprod Sci* 42: 1-4. 1996.

SHEPHERDSON, D. J., CARLSTEAD, K., MELLEN, J. D., & SEIDENSTICKER, J. The influence of food presentation on the behavior of small cats in confined environments. *Zoo Biol*, 12:203–216, 1993.

SILVA, A. K. P., SANTOS, S. Estudo comportamental com enriquecimento ambiental para pequenos felinos cativos no zoológico do Centro de Instrução de Guerra na Selva. *Pubvet* 14:1-9. 2020.

SILVA N. C.; FRUHVALD E.; MARINHO-NETO F. A. Estresse em animais de zoológico. *REFAIT* 13, 1.2019.

SILVA, R. O. Enriquecimento ambiental cognitivo e sensorial para onças-pintadas (*panthera onca*) sedentárias em cativeiro induzindo redução de níveis de cortisol promovendo bem-estar. 2011. 58f. Dissertação (mestrado – Programa de PósGraduação em Ciências do Comportamento do Departamento de Processos Psicológicos Básicos) – Universidade de Brasília, DF, 2011.

SILVA, S. C. B.; DA SILVA, M. C.; SILVA, F. L.; SNOECK, P. P. Indução de ovulação com swab vaginal em gatas domésticas e seus efeitos sobre a morfologia uterina. *Ciênc Anim Bras*18:1-10, 2017.

SILVA, T. B. B., ABREU, J. B., GODOY, A. C., CARPI, L. C. F. G. Enriquecimento ambiental para felinos em cativeiro *Una Salud* 3:47-52. 2014.

TERIO KA, CITINO SB, BROWN JL. Fecal cortisol metabolite analysis for noninvasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J Zoo Wild Med* 30:484-91. 1999.

TOYDEMIR, T. S. F., M. R. KILIÇARLAN, e V. OLGAÇ. Effects of the GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats. *Theriogenology* 77:662-74. 2012.

VIAU, P., FELIPPE E. C.G., OLIVEIRA, C.A. CLÁUDIO ALVARENGA. Quantificação de esteróides fecais de fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro: validação da técnica. - Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP 2005. Braz. J Vet Res Anim Sci 42:267-275. 2005.

WIELEBNOWSKI N.C., FLETCHALL N., CARLSTEAD K., BUSO J.M., BROWN J.L. Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. Zoo Biol 21:77-98. 2002.

BENDER A L., VON MÜHLEN C. A. Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica. Disponível em: <http://docente.ifsc.edu.br/rosane.aquino/MaterialDidatico/AnalisesClinicas/avaliacao%20de%20Testes-Laboratoriais-Aplicados-Imunologia-Clinica.pdf>. Acessado em: 25 de agosto de 2023.