

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PRESENÇA DE ISOLAMENTO PÓS-ZIGÓTICO ENTRE
DIFERENTES CITÓTIPOS DE *MAZAMA AMERICANA* :
AVALIAÇÃO DE FÊMEAS**

Marina Suzuki Cursino

Médica Veterinária

JABOTICABAL- SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PRESENÇA DE ISOLAMENTO PÓS-ZIGÓTICO ENTRE
DIFERENTES CITÓTIPOS DE *MAZAMA AMERICANA* :
AVALIAÇÃO DE FÊMEAS**

Marina Suzuki Cursino

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL- SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARINA SUZUKI CURSINO – Nascida em São Paulo – SP, Brasil, no dia 28 de novembro de 1981. Filha de José Roberto Cursino e Yuko Suzuki. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, no ano de 2006. Durante sua graduação participou da diretoria do Grupo de Estudos de Animais Silvestres – GEAS-Jaboticabal - do ano de 2003 ao ano de 2006, organizando cursos e palestras durante este período. Obteve bolsa PIBIC/CNPq para realização do Projeto de Iniciação Científica intitulado “Estudo Comparativo da Palatabilidade de Rações em Cervídeos Brasileiros Mantidos em Cativeiro” sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, no ano de 2004/2005. Integrou o Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos em 2008, participando dos projetos de pesquisa, e onde iniciou sua pós-graduação no ano de 2009, obteve bolsa de estudos fornecida pela CAPES com o projeto intitulado Avaliação da existência de isolamento pós-zigótico entre diferentes citótipos de *Mazama americana*: fertilidade de fêmeas.

*“Descrever a história e a diversidade dos seres vivos,
fornecer o conhecimento pelo conhecimento,
é enriquecer a humanidade.”*

(Douglas J. Futuyma)

Dedico

À minha mãe,

*sem ela talvez não pudesse ter realizado os meus maiores sonhos,
ser veterinária e trabalhar com animais selvagens.*

Ofereço

Em respeito á todos os animais que são submetidos ao cativeiro e

à pesquisa em nome da conservação de sua população -

Aos animais que participaram deste experimento, em especial

Heloísa Helena, Marisa, Olívia, Cristina, Natália, Ivete, Érika,

Samantha, Clara e Nanda que nasceram exclusivamente para

este estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, orientador que me proporcionou não só a realização deste estudo, mas meu crescimento profissional e acadêmico;

Às empresas de fomento CAPES, FAPESP e CNPq, pela ajuda financeira para realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pelos conselhos em relação às metodologias da PIV aplicadas neste trabalho;

Ao Laboratório de Produção de Embriões do Departamento de Reprodução Animal, FCAV/UNESP-Jaboticabal, em especial à técnica “Rô” (Roberta) pela ajuda fundamental durante os procedimentos de Produção *in vitro* de embriões;

Ao Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV/UNESP-Jaboticabal, principalmente ao técnico “Seu” Orandi pela ajuda na montagem das lâminas histológicas;

À Yuko Suzuki, mãe e exemplo de garra, confiança, coragem e conquista, que sempre me apoiou e apoia em todas as minhas escolhas;

À Juliana Suzuki Cursino e família, que mesmo muito longe, sempre torceu e torce pelas minhas conquistas;

Às amigas queridas, Thassila (Thassi), Fernanda (Nazira), Vanessa (Plica) e Juliana (Shirra), que sempre estiveram ao meu lado, mesmo que separadas por muitos quilômetros de distância;

Ao Maurício (Janota), um amigo que tenho muita consideração, que sem ele talvez não tivesse realizado este mestrado, e pelo auxílio em alguns procedimentos;

À Dra. Eveline dos Santos Zanetti, que me co-orientou informalmente, e me ensinou a base de tudo que sei sobre reprodução de cervídeos, além auxiliar nos procedimentos;

À Dra. Vanessa Ventrini Abril que me ensinou muito sobre genética, e auxiliou em alguns procedimentos;

Ao grande amigo que conheci durante o mestrado, Maurício (Piauí), que compartilhou comigo muitas idéias e momentos de descontração. Também por me ajudar nos procedimentos.

Ao André Balerini Horta, por me ajudar sempre quando necessário, principalmente nos finais de semana e feriados, além de companheiro e confidente dos problemas e das conquistas;

Aos integrantes do NUPECCE, pela convivência durante os dias de trabalho, e pelas horas de descontração durante o cafezinho, Grupo da reprodução animal: Eveline, Maurício (Janota), Maurício (Piauí), Luciana (Barraqueira), Ellen e minha orientada Chrissie; Grupo de genética: Vanessa, , Paula (Caju), Aline (Kokotinha), Marina, Juliana e Iara; Grupo de ecologia: Natália (Onça), Ana Maria (Aninha), Vinícius (Maumau), Márcio, Pedro e Francisco (Chico); e uma ex-integrantes do grupo, mas que tenho grande carinho e amizade Christina Capalbo (Chris);

Às colegas do laboratório de Reprodução Animal, Naiara, Tatiana, Clara e Marina, por me ajudarem com as leituras das lâminas de coloração nuclear;

Às minhas companheiras de casa, Patrícia (Patty) e Amanda, que conviveram e me aturaram por todo este período de mestrado;

Por último e muito especial, ao amigo mais fiel e mais querido companheiro, que por toda sua vida se dedicou a mim e à minha felicidade, compartilhou comigo todas as minhas aflições e alegrias, agradeço pelo seu amor incondicional e necessidade de me proteger o tempo todo. Viveu o máximo que pode ao meu lado, se foi antes que pudesse compartilhar comigo mais esta conquista, mas nunca será esquecido (Mel Gibson Sant'Bels, o Cururu, 1994-2010).

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. <i>Mazama americana: descrição e classificação taxonômica</i>	11
2.2. <i>Especiação e Isolamento Reprodutivo</i>.....	15
2.3. <i>Aptidão de fêmeas híbridas</i>	18
2.4. <i>Parâmetros Reprodutivos de fêmeas</i>	20
3. OBJETIVO.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. <i>Animais</i>.....	24
4.2. <i>Manejo em cativeiro</i>	26
4.2.1. <i>Instalações</i>	26
4.2.2. <i>Alimentação</i>	26
4.3. <i>Dosagem de metabólitos fecais de progesterona</i>.....	27
4.3.1. <i>Colheita de fezes</i>	27
4.3.2. <i>Processamento das amostras</i>	27
4.3.3. <i>Ensaio Imunoenzimático (EIA)</i>	27
4.3.4. <i>Análise dos Resultados</i>	28
4.4. <i>Histologia do ovário</i>	29
4.4.1. <i>Análise dos Resultados</i>	29
4.5. <i>Superovulação, aspiração de oócitos “in vivo” e retirada do ovário</i>.....	29
4.6. <i>Produção de embriões “in vitro”</i>	31
4.6.1. <i>Colheita de sêmen para fertilização “in vitro” (FIV)</i>	31
4.6.2. <i>Coloração Nuclear Hoechst 33342</i>	31

4.6.3. <i>Análise dos Resultados</i>	32
5. RESULTADOS	33
5.1. <i>Dosagem de metabólitos fecais de progesterona</i>	33
5.1.1. <i>Teste de Validação do Ensaio Imunoenzimático</i>	33
5.1.2. <i>Perfis Hormonais</i>	34
5.2. <i>Histologia do ovário</i>	36
5.3. <i>Superovulação, aspiração folicular e Produção de embriões “in vitro”</i>	40
6. DISCUSSÃO	44
6.1. <i>Inferência da capacidade reprodutiva</i>	44
6.2. <i>Presença de Isolamento Reprodutivo Pós-zigótico</i>	49
7. CONCLUSÃO	53
8. REFERÊNCIAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fêmea de <i>Mazama americana</i> , do citótipo Paraná 2N=52 e NF = 60, utilizada nos cruzamentos para produção F1 (híbrido e puro). Identificação do Animal T257.	11
Figura 2. Mapa da distribuição geográfica da espécie <i>Mazama americana</i> (VARELA <i>et al</i> , 2010).....	13
Figura 3. Cariótipos de quatro fêmeas dos diferentes citótipos utilizados para os cruzamentos.....	25
Figura 4. Aspiração folicular in vivo da fêmea P1, no oitavo dia do protocolo de superovulação, utilizando dispositivo de infusão intravenosa número 22 (BD®) acoplado a uma seringa de 20 mL.....	30
Figura 5. Resultado do Teste de validação do Ensaio Imunoenzimático.....	33
Figura 6. Perfil de progesteronas fecais (ng de progesteronas/g de fezes) das fêmeas Puras (P1, P2, P3) no período de 6 a 18 meses de idade.	34
Figura 7. Perfil de progesteronas fecais (ng de progesteronas/g de fezes) das fêmeas Híbridas (H1, H2, H3, H4, H5 e H6) no período de 6 a 18 meses de idade.....	35
Figura 8. Imagens de cortes histológicos dos ovários.	38
Figura 9. Presença de folículos em diversas fases de crescimento.	40
Figura 10. Mórula - embrião da fêmea P2 apresentando mais de 20 núcleos corados com Hoechst 33342 após o sétimo dia de desenvolvimento.	41
Figura 11. Ovário após tratamento de superovulação.	42
Figura 12. Embriões produzidos após 10 dias de cultivo.	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Cruzamentos entre os animais dos diferentes citótipos da espécie <i>M. americana</i> (Carajás, Juína, Paraná e Rondônia) para a obtenção de animais puros – intracitótipos (P), e híbridos - intercitótipos (H).	26
Tabela 2 – Resultados obtidos dos perfis de progesterinas fecais das fêmeas híbridas e puras apresentados conforme os cruzamentos realizados.	36
Tabela 3 - Resultados da contagem de estruturas ovarianas (média \pm erro padrão) das fêmeas híbridas e puras. Ovários superovulados aos 18 meses de idade.	39
Tabela 4 - Resultado da recuperação de oócitos e da PIV após as análises da coloração nuclear com Hoechst 33342 das fêmeas híbridas e puras.	43
Tabela 5 - Valores dos Parâmetros Reprodutivos (número de folículos primordiais, oócitos e embriões) das fêmeas organizados segundo as diferenças de autossomos parentais (DAP).	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Tabela - Protocolo de Preparo de Lâminas Histológicas.	67
Anexo II. Tabela - Protocolo para coloração Hematoxilina – Eosina.....	67
Anexo III. Tabela - Protocolo para coloração Tricrômico de Masson.	68
Anexo IV. Tabela- Protocolo de Produção in vitro de embriões.	68
Anexo V. Tabela - Descrição das estruturas ovarianas observadas nos cortes histológicos.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

2N: número diploide de cromossomos;

2Na: número diploide de cromossomos autossomos;

AxA / AxB / BxA: Cruzamentos entre as linhagens evolutivas de *Mazama americana* descritas por ABRIL et al (2010);

Ca: citótipo Carajás; padrão cariotípico da espécie *M. americana* encontrada na região da cidade de Carajás – PA, Brasil;

CIDR: *Controlled Internal Drug Release*[®] - Pfizer[®] - EUA / Dispositivo Intravaginal de progesterona;

CIV: Cultivo *in vitro*;

DAP: diferença de autossomos parentais, 2Na paterno – 2Na materno = DAP;

DP: desvio padrão;

EIA: *Enzyme Immuno Assay* / Ensaio Imuno Enzimático;

F1: prole obtida dos primeiros cruzamentos;

FIV: Fertilização *in vitro*;

FSH: *Follicle-Stimulating Hormone* / Hormônio folículo estimulante;

H1 / H2 / H3 / H4 / H5 / H6 : identificação das seis fêmeas híbridas;

Ju: citótipo Juína; padrão cariotípico da espécie *M. americana* encontrada na região da cidade de Juína – MT, Brasil;

min lut_{p1} / min lut_{p2} / min lut_{p3} : valor da concentração mínima luteal das fêmeas puras 1, 2 e 3 respectivamente;

MIN LUT: média dos valores “min lut” das fêmeas puras.

Mp1 / Mp2 / Mp3: valor médio dos picos luteais do perfil de progestágenos fecais das fêmeas puras 1, 2 e 3, respectivamente;

NF: número fundamental de braços (cromossomos);

MIV: Maturação *in vitro*;

P1 / P2 / P3: identificação das três fêmeas puras;

PIV: Produção de embriões *in vitro*;

Pr: citótipo Paraná; padrão cariotípico da espécie *M. americana* encontrada na região do estado do Paraná, Brasil;

Ro: citótipo Rondônia; padrão cariotípico da espécie *M. americana* encontrada na região do estado de Rondônia, Brasil.

PRESENÇA DE ISOLAMENTO PÓS-ZIGÓTICO ENTRE DIFERENTES CITÓTIPOS DE *MAZAMA AMERICANA* : AVALIAÇÃO DE FÊMEAS

RESUMO – O veado mateiro, *Mazama americana*, apresenta populações cariotipicamente diferentes (citótipos) em diferentes regiões brasileiras. Estes citótipos apresentam uma diferenciação cariotípica que originou duas linhagens evolutivas A e B. Estas linhagens apresentam uma distância genética entre elas, maior que em relação a outras espécies de *Mazama*. A existência de mecanismo de isolamento reprodutivo pós-zigótico, devido a distância cariotípica das linhagens, comprovaria a existência de pelo menos duas espécies dentro do que hoje denomina-se *Mazama americana*. Para tal foram realizados cruzamentos inter e intracitótipos obtendo prole F1 híbrida (n=6) e pura (n=3). As fêmeas F1 foram analisadas quanto aos seus parâmetros reprodutivos por meio da dosagem de metabólitos fecais de progesterona, histologia de ovário e produção de embriões *in vitro*. As fêmeas puras apresentaram parâmetros similares aos já descritos para fêmeas de *M. americana*, porém os parâmetros das fêmeas híbridas apresentaram-se distintos das puras. Duas híbridas apresentaram esterilidade com ausência de células germinativas, resposta negativa ao protocolo de superovulação e ausência de folículos para aspiração e posterior produção de embriões *in vitro*. As outras híbridas apresentaram subfertilidade. Uma vez encontrado o isolamento reprodutivo entre as linhagens A e B, foi possível identificar ao menos duas espécies dentro de *Mazama americana*. Sugerimos que os citótipos podem ser divididos em subespécies das linhagens, porém outros estudos devem ser realizados para que esta hipótese seja comprovada.

Palavras-chave: fêmea, isolamento pós-zigótico, *Mazama americana*

PRESENCE OF POST-ZYGOTIC ISOLATION IN FEMALE F1 FROM BREEDING OF CROMOSOME VARIANTS OF *MAZAMA AMERICANA*

ABSTRACT - The red brocket deer, *Mazama americana*, shows populations that are karyotypically different (cytotypes) distinct regions in Brasil. These karyotype differentiation led to two evolutionary lineages A and B. These lineages have a genetic distance between them greater than for other species of *Mazama*. Once to these differences culminate in a division of the taxon, need to require a study of reproductive isolation among lineages. For these, crossings were performed within and between cytotypes obtaining F1 hybrid (n = 6) and pure (n = 3) offspring. The F1 females were analyzed as to their reproductive parameters. It was possible to infer the reproductive capacity of these through the measurement of fecal progesterone metabolites, histology of ovary and embryo production *in vitro*. The pure females showed parameters similar to those described for females of *M. American*, but the parameters of the hybrid females were lower than those of the pure. Two hybrid presented sterility with absence of germ cells, negative response to the superovulation protocol, and absence of follicles for aspiration and subsequent production of embryos. The other hybrids showed subfertility. Once found the reproductive isolation between strains A and B, it was possible to identify at least two species within *Mazama americana*. We suggest that these cytotypes can be divided into subspecies strains, but other studies must be conducted so that this hypothesis is verified.

Keywords: female, *Mazama americana*, post-zygotic isolation

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Mazama americana*, conhecida popularmente como veado-mateiro, atualmente não possui subdivisões em sua taxonomia. Esta proposta foi aceita depois que ROSSI (2000) estudou a morfologia de animais existentes em museus brasileiros. Porém, uma dúvida em relação ao número de cromossomos desses animais ainda não foi esclarecida.

Os estudos cromossômicos realizados com a espécie descreveram variações cromossômicas (citótipos) sugerindo a sua divisão. DUARTE et al. (2008) sugerem a existência de um complexo de espécies crípticas, pois apesar da similaridade morfológica entre os indivíduos, estes apresentam altos níveis de diferenciação genética e diversificação de haplótipos em diferentes localidades geográficas.

ABRIL et al. (2010) também sugeriram a divisão da espécie em duas ou mais, ao revelarem a presença de duas linhagens no processo evolutivo dos citótipos de *M. americana* e a presença de dois clados, dentro da espécie, com grande distância e diferenciação genética entre eles, revelada através de análises do DNA mitocondrial.

Levantou-se então duas hipóteses: i) as duas linhagens evolutivas apresentadas por Abril et al. (2010) são duas espécies distintas e que os citótipos presentes dentro destas linhagens devem ser divididas em subespécies; ii) os diferentes citótipos, devem ser diferenciados em diferentes espécies.

Para esclarecer esta dúvida seria necessário identificar a existência de espécies distintas dentro desse taxa. O conceito de espécie mais aceito hoje é o conceito biológico que descreve espécies como grupos de populações naturais que intercruzam e estão reprodutivamente isoladas de outros grupos. Assim, informações que possam identificar uma barreira reprodutiva entre os diferentes citótipos são de extrema importância.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mazama americana: descrição e classificação taxonômica

A espécie *Mazama americana* é conhecida popularmente como veado-mateiro, veado-pardo, ou veado-vermelho (Figura 1). É considerada a maior espécie do gênero *Mazama* com peso variando de 30 a 40 kg e sua altura de cernelha de 58 a 60 cm de altura (VARELA ET AL., 2010). Sua coloração pode variar de castanho-avermelhada a castanho levemente escuro, com presença de manchas esbranquiçadas abaixo da cauda, face interna proximal dos membros, região submandibular, ponta da maxila superior e face interna da orelha (ROSSI, 2000).



Figura 1. Fêmea de *Mazama americana*, do citótipo Paraná 2N=52 e NF = 60, utilizada nos cruzamentos para produção F1 (híbrido e puro). Identificação do Animal T257.

A espécie ocorre desde o norte da América do Sul ao norte da Argentina (Misiones, Salta, Jujuy, Tucumán, Formosa, Chaco e Corrientes), Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago e Venezuela (IUCN, 2011) (Figura 2). Os indivíduos da espécie preferem habitar as grandes matas, à beira dos rios, quase sempre cobertas de vegetação densa (JUNQUEIRA, 1940). Na Argentina, OLROG & LUCERO (1981) relataram *M. americana* ocupando cerrados fechados, selvas e bosques em regiões de até 2.500 m de altitude. EISENBERG (1989) acredita que a espécie ocupa desde florestas semidecíduas até cerrado fechado, pois como EMMONS (1990) citou, eles são adaptados para a vida na floresta. Segundo BODMER (1997), esta espécie na Amazônia prefere as encostas das florestas úmidas de terra firme. Sua distribuição se sobrepõe à de outros veados do gênero, como *M. gouazoubira*, *M. nana* e possivelmente, *M. bororo* em uma variedade de ecossistemas (EMMONS 1990; VOGLIOTTI, 2004; RIVERO et al., 2005; FERRARI et al., 2005).

No Brasil podemos encontrá-los próximos a reservas, territórios indígenas e áreas protegidas na Amazônia. Também há relatos de ocupação de fragmentos de Mata Atlântica no sul e sudeste, habitats que se converteram em áreas de importância econômica para agropecuária, onde muitas populações possuem apenas fragmentos isolados de mata para habitarem, em especial a população presente na bacia do Rio Paraná, Brasil, que se mantém em uma região fragmentada com áreas de matas muito restritas, necessitando de um manejo adequado para conservação da espécie, o que não ocorre com a população da Amazônia (VARELA et al, 2010).



Figura 2. Mapa da distribuição geográfica da espécie *Mazama americana* (VARELA et al, 2010).

Em relação à taxonomia, no início do século XX, ALLEN (1915) considerava a existência de 5 espécies (*Mazama trinitatis*, *M. rufa*, *M. sartorii*, *M. gualea*, *M. fuscata* e *M. zamora*), as quais foram integradas por CABRERA (1960) como subespécies da espécie *Mazama americana* (*M. a. gualea*, *M. a. jucunda*, *M. a. rosii*, *M. a. rufa*, *M. a. sarae*, *M. a. sheila*, *M. a. whitelyi*, *M. a. zamora* e *M. a. zetta*). Mais tarde, em 1987, CZERNAY adicionou mais 6 subespécies além das descritas anteriormente (*M. a. temama*, *M. a. cerasina*, *M. a. reperticia*, *M. a. americana*, *M. a. trinitatis* e *M. a. carrikeri*). Somente em 2000 que ROSSI, utilizando informações morfológicas, propôs a existência de uma única espécie de *M. americana* no Brasil, sem a presença de subespécies.

Porém, apesar das semelhanças morfológicas das populações de *M. americana* descritas por ROSSI (2000), as análises citogenéticas geram dúvidas sobre esta classificação taxonômica, uma vez que apresentaram resultados conflitantes com $2n$ variando de 48 a 54 e NF variando de 54 a 70, o que deixou mais dúvidas sobre o padrão cariotípico da espécie (JORGE & BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987).

Em 1992, DUARTE encontrou estes mesmos conflitos no padrão cromossômico da espécie ao analisar quatro espécimes brasileiros. Segundo DUARTE & MERINO (1997), este polimorfismo pode indicar a existência de várias espécies dentro dos *M. americana*.

Para entender melhor estas variações, DUARTE & JORGE (1996) analisaram os cariótipos de 33 *M. americana* de várias localidades do Brasil, encontrando extenso polimorfismo, $2n= 42$ a 53 cromossomos e $NF= 48$ a 57 . Essa variação cromossômica apresentou coerência geográfica, ou seja, alguns cariótipos eram característicos de algumas regiões. A partir desses resultados, os autores descreveram sete citótipos distintos: Rio Negro, Manaus, Jarí, Acre, Rondônia, Carajás e Rio Paraná. Cada um desses citótipos seriam potencialmente espécies distintas.

Ao comparar as particularidades cariotípicas dos citótipos Carajás ($2N=48-51$), Paraná ($2N=51-53$) e Rondônia ($2N=42-45$), SARRIA-PEREA (2004) observou uma maior semelhança entre os citótipos Carajás e Paraná, diferenciados apenas por uma fusão em tandem, do que o entre os citótipos Rondônia e Carajás, geograficamente mais próximos porém, diferenciados por quatro fusões em tandem e uma translocação Robertsoniana. Estas mesmas diferenças foram encontradas na comparação entre os citótipos Rondônia e Paraná. Levantou-se então, a possibilidade do citótipo Rondônia ser distinto dos demais. Neste mesmo trabalho foi descrita pela primeira vez uma fusão X-autossômica que ocorreu no ancestral dos *M. americana* sul americanos, originando um sistema sexual complexo do tipo $XX/XY1Y2$.

Em um estudo recente que associou análises citogenéticas e moleculares de 18 indivíduos de *M. americana*, foi possível identificar 6 citótipos distintos (Rondônia, Juína, Jari, Carajás, Santarém e Paraná). O citótipo Paraná por possuir o maior número diplóide e número fundamental, foi utilizado como base para comparações entre os cariótipos. A partir da relação encontrada entre os cariótipos foi criada a hipótese de que os citótipos identificados diferenciaram-se a partir de um ancestral comum em duas linhagens evolutivas distintas: por meio de uma inversão pericêntrica e fusões centricas e em tandem surgiram os citótipos Paraná, Carajás, Santarém e Jari; e, a partir de fusões cêntricas e em tandem originaram os citótipos Juína e Rondônia. Corroborando

com os resultados citogenéticos, as análises moleculares do DNA mitocondrial identificaram dois clados independentes (A e B), onde o clado A é composto pelos citótipos Rondônia, Juína, Jarí e Santarém e, o clado B, composto pelos citótipos Paraná, Carajás e Santarém. Foi observado um alto valor de diferenciação e de distância genética entre os dois clados e, o clado A aparece geneticamente mais próximo das espécies *Mazama bororo* e *Mazama nana* do que do clado B, sugerindo que *Mazama americana* possa ser na verdade duas ou mais espécies distintas (ABRIL *et al.*, 2010).

Em 2008, DUARTE e colaboradores já haviam descrito os altos níveis de diferenciação molecular e citogenética dos *M. americana*, relatando este como um dos casos mais surpreendentes de evolução morfológica convergente e de espécies crípticas em mamíferos. Os autores também sugeriram que as relações filogenéticas de cervídeos, baseadas nos caracteres morfológicos externos são problemáticas, pois há extensões causadas de homoplasia associadas a este tipo de prova.

Devido a toda esta incerteza em relação ao taxa, a espécie *M. americana* é classificada como Dados Insuficientes segundo a IUCN (2011). A justificativa é de que a sistemática do taxa seja melhor compreendida, é impossível avaliá-lo nas categorias e critérios da Lista Vermelha da IUCN. Somente após definir a distribuição e o tamanho da população é que será possível estimar sua redução. Além disso, não há evidências de que a espécie se mantenha fora de áreas florestadas, dessa forma, algumas populações (que podem ser espécies ou subespécies) podem estar ameaçadas, enquanto outras não o são, e até que seja esclarecida a taxonomia, não se tem informações suficientes para avaliar a espécie contra as ameaças.

2.2. Especiação e Isolamento Reprodutivo

Dentre os mamíferos, a família Cervidae é marcada por uma grande diversificação cromossômica e, a diferenciação entre as linhagens envolve tipos específicos de rearranjos cromossômicos, sendo o padrão cariotípico do gênero *Mazama* considerado como o mais complexo (FONTANA & RUBINI, 1990).

Para DUARTE & JORGE (1996), a complexidade do padrão cromossômico do gênero vai além da variação cariotípica insterespecífica, havendo polimorfismos cromossômicos intraespecíficos surgidos a partir de rearranjos, como no caso dos *M. americana*, e a presença de cromossomos supranumerários. Os principais rearranjos cromossômicos encontrados na variação cariotípica dos *M. americana* são fusões centricas e em tandem (ABRIL et al., 2010).

Enquanto a subfamília Cervinae divergiu seu cariótipo exclusivamente por translocações Robertsonianas, nos gêneros *Mazama* e *Muntiacus* predominaram as fusões em tandem, mesmo sendo este tipo de rearranjo, promotor de altas frequências de desbalanço cromossômico em heterozigotos e podendo levar a baixas taxas de fertilidade na população (NEITZEL, 1987). A diferenciação cromossômica das linhagens da família Cervidae seguiu o princípio da ortosseleção cariotípica (FONTANA & RUBINI, 1990), onde um tipo de alteração apresenta uma tendência de ocorrer repetidamente em uma determinada linhagem evolutiva resultando em uma uniformidade nos cariótipos dos organismos, uma tendência para que todos os cromossomos de uma espécie sejam semelhantes em tamanho e forma WHITE (1977).

Para NEITZEL (1987) as frequências de mutações cromossômicas na evolução da família Cervidae foram mais altas que em outras taxa. As transmissões destes rearranjos cromossômicos dependeram principalmente da estrutura das populações e se fixam apenas naquelas que apresentaram alto grau de “*inbreeding*” (cruzamentos entre espécies relacionadas). Somente os cruzamentos que causaram pequenos danos foram os que promoveram a fixação homozigota dos rearranjos cromossômicos, como no caso dos gêneros *Muntiacus* e *Mazama*, os quais apresentaram alta taxa de evolução cariotípica dentro da família Cervidae. A fixação destes rearranjos pode ter agido como um mecanismo de isolamento e por sua vez, permitido o acúmulo de outros fatores de isolamento, promovendo assim, a divergência anatômica (NEITZEL, 1987).

Segundo WHITE (1977), a existência quase universal, se não universal, de diferenças entre os cariótipos de espécies próximas sugere fortemente que os rearranjos cromossômicos devam ter desempenhado um papel direto, ou indireto, na especiação.

A definição de espécie mais aceita atualmente é o Conceito Biológico em que, espécies não são tipos morfológicos, mas sim, populações variáveis que são isoladas reprodutivamente de outras populações (FUTUYMA, 2002). Segundo SENE (2009), existe dois tipos de isolamento que podem caracterizar uma população, o isolamento geográfico (não há contato entre os indivíduos de duas populações, alopatria, impedindo assim, que ocorra fluxo gênico entre elas), e o isolamento reprodutivo (presença de barreiras biológicas que impedem o fluxo gênico entre populações simpátricas).

Podemos classificar o isolamento reprodutivo como, mecanismos pré-zigóticos, que são barreiras que atuam antes do cruzamento e/ou fertilização dos gametas podendo ser descritos como: mecânico (diferenças morfológicas); comportamental (indivíduo de uma espécie rejeita o indivíduo de outra espécie); temporal (onde espécies apresentam período de puberdade em períodos distintos, assim como diferentes épocas reprodutivas); e morte dos gametas (quando há cópula porém o gameta masculino morre por causas fisiológicas dentro do trato reprodutivo da fêmea) (SENE, 2009); e mecanismos pós-zigóticos, que são as barreiras que atuam após a fertilização dos gametas sendo descritos como inviabilidade do híbrido (zigoto inviável, ou com viabilidade reduzida), esterilidade do híbrido (onde a prole F1 não produz gametas viáveis em um ou ambos os sexos) e desmoronamento do híbrido (onde a prole F2 ou híbridos retrocruzados tem a viabilidade ou fertilidade reduzida) (DOBZHANSKY, 1970).

Para RIDLEY (2006), “*especiação significa a evolução do isolamento reprodutivo entre duas populações*”.

Estudos de especiação por diferenças cromossômicas já foi descrita em outras espécies de mamíferos. Como os gerbils do gênero *Taterillus*, do oeste da África. Apesar da similaridade morfológica foram identificados dois cariótipos distintos, os quais após um estudo minucioso apresentaram grandes diferenças (translocações Robertsonianas e em tandem), sugerindo até figuras polivalentes de arcos ou correntes como provável resultado do pareamento meiótico de um híbrido (DOBIGNY et al. 2002).

Um estudo recente, com roedores da espécie *Ctenomys minutus*, do sul do Brasil, apresentou diferentes padrões cariotípicos separados por barreiras geográficas. Foram observadas zonas de hibridização entre estas populações e discuti-se a importancia deste fluxo gênico entre as populações, aumentando a variabilidade genética destas e levando a uma subsequente evolução (GAVA & FREITAS, 2003).

2.3. Aptidão de fêmeas híbridas

A dúvida ainda se mantém quanto às variações cariotípicas da espécie *M. americana*. Será que os citotipos desta espécie, que possuem distribuição geográfica distinta, também poderiam ser diferenciados em espécies?

Segundo SENE (2009), para que diferentes populações, alopátricas e de uma mesma espécie, sejam caracterizadas como espécies distintas seria necessário realizar um teste de simpatria com estas. Uma vez observada a presença de isolamento reprodutivo entre elas, seria possível separá-las em mais de uma espécie.

Para observamos a presença de isolamento reprodutivo devemos então cruzar as populações e observar se é possível ou não produzir um indivíduo. Uma vez que duas populações distintas conseguem produzir híbridos, frequentemente a prole tem baixa aptidão. Os híbridos podem ser estéreis, ou ter viabilidade reduzida. A aptidão reduzida dos híbridos é um exemplo do isolamento pós-zigótico pois, os híbridos podem apresentar uma forma intermediária entre as duas espécies parentais e serem mal-adaptados porque há poucos recursos para essa forma e/ou, ter baixa aptidão porque as duas espécies parentais contém genes que não funcionam bem quando em uma mesma prole (RIDLEY, 2006).

Três causas genéticas podem levar a problemas de aptidão em um híbrido: diferentes arranjos cromossômicos, diferentes níveis de ploidia, ou diferentes alelos que não funcionam propriamente quando colocados juntos em um indivíduo (COYNE & ORR, 1998).

KING (1993) acredita que rearranjos cromossômicos que causam uma heterose potencialmente negativa, como fusões em tandem, translocações e inversões, podem

estar relacionados com o processo de isolamento reprodutivo. Em contrapartida, COYNE & ORR (1998) acreditam que o isolamento reprodutivo é causado por diferenças na bagagem genética e não por grandes rearranjos cromossômicos. RIESEBERG (2001), apresenta uma razão não tradicional para os modelos de especiação cromossômica sugerindo que, os rearranjos cromossômicos causam efeito na redução do fluxo gênico, através da supressão da recombinação e/ou isolamento de genes no híbrido, e não no valor adaptativo deste.

Para SWITONSKI & STRANZINGER (1998) a presença de rearranjos cromossômicos em heterozigose pode causar pareamentos anômalos durante a meiose, o que resulta em falhas na gametogênese e produção de gametas desbalanceados, causando uma diminuição da fertilidade ou esterilidade do indivíduo.

A presença de rearranjos cromossômicos pode afetar a fertilidade de uma fêmea, porém com menores danos do que quando presentes em machos. SETTERFIELD e colaboradores (1988) encontraram falhas no pareamento meiótico de fêmeas de camundongo com translocação Robertsoniana 5¹², com redução de tecido ovariano e no número de oócitos em relação às fêmeas sem translocação. Apesar dessa redução, a taxa de ovulação e a foliculogênese não foi afetada, uma vez que as fêmeas com translocação ainda apresentavam um pool de oócitos, mesmo que reduzido.

Em 1922, HALDANE observou que “*em uma prole de dois animais diferentes de raças distintas, um sexo é ausente, raro ou estéril, sendo este o sexo heterozigoto (heterogamético ou XY)*”. Segundo ORR (1997), a Regra de Haldane pode ser explicada através da Teoria de Dominância, criada a partir do Modelo de especiação Dobzhansky-Muller, que considera a existência de genes de especiação ligados ao X, que quando em dominância podem causar a inviabilidade e/ou esterilidade do híbrido.

Por outro lado, MALONE & MICHALAK (2008), acreditam que a explicação para fertilidade de fêmeas híbridas (neste caso do gênero *Xenopus*) está relacionada com a *Teoria Faster-Male*, que considera (1) que a espermatogênese é sensível às perturbações que ocorrem no híbrido e/ou (2) que a seleção sexual nos genes específicos do macho os leva a uma evolução mais rápida em relação aos genes específicos das fêmeas, acarretando em defeitos nos machos híbridos. Após realizarem

estudos com modificação dos sexos fenotípicos e cromossômicos de machos e fêmeas *Xenopus*, levantaram a hipótese de que a gametogênese do macho apresentaria maior sensibilidade para expressão gênica, possivelmente por que foi identificado um maior número de genes nos testículos das espécies estudadas, do que nos ovários, e por isso a produção de gametas seria mais facilmente afetada em um híbrido macho do que em uma fêmea.

Realmente são comuns os casos de fêmeas híbridas que apresentam certo grau de fertilidade, como mulas adultas que apresentam atividade ovariana com presença de cistos foliculares, corpos lúteos em seus ovários (BENIRSCHKE & SULLIVAN, 1966), até mesmo casos de sucesso reprodutivo em que o cruzamento entre uma mula (*Equus caballus x Equus asinus*) e um jegue (*Equus asinus*) resultou em nascimento de filhote saudável (RONG et al., 1988).

Porém, ainda podemos observar casos de fêmeas híbridas com redução de tecido ovariano e ausência de estruturas foliculares e até mesmo de células germinativas (WEST et al., 1978). Talvez porque, como descrito por TAYLOR & SHORT (1973), parte das células germinativas presentes nas gônadas de híbridas neonatas não se desenvolvem e acabam morrendo durante a meiose, provavelmente por irregularidades no pareamento cromossômico.

2.4. Parâmetros Reprodutivos de fêmeas

Muitos trabalhos realizados com fêmeas híbridas procuram demonstrar a presença de esterilidade ou subfertilidade utilizando parâmetros reprodutivos como pareamentos meióticos em células germinativas de fetos (SETTERFIELD et al., 1988; AKHVERDYAN & FREDGA, 2001), cortes histológicos de ovário de indivíduos adultos (BENIRSCHKE & SULLIVAN, 1966; TAYLOR & SHORT, 1973; WEST et al., 1978) e sucesso reprodutivo com produção de filhotes viáveis (RONG et al., 1988; CLOSE & BELL, 1997). Porém outros parâmetros reprodutivos *in vitro* (realizados em laboratório), também podem ajudar a inferir a capacidade reprodutiva de uma fêmea.

A presença de células germinativas pode ser inferida através da presença de atividade ovariana, que por sua vez possui alta relação com a regulação de hormônios esteróides como a progesterona e o estrógeno. Sabe-se que a concentração periférica de metabólitos de progesterona está associada à atividade ovariana, pois quando o comportamento de estro se pronuncia a concentração de metabólitos apresenta-se baixa (PICKARD et al, 2001). SHIMIZU (2005) constatou que metabólitos fecais de hormônios esteróides de macacos refletem, com acurácia, os eventos ovarianos demonstrando um mesmo perfil de dosagens de hormônios esteróides plasmáticos. Um método muito utilizado para avaliação ovariana em animais silvestres é a dosagem de metabólitos fecais de progesterona (SCHWARTZ et al, 1995; WASSER et al, 1995; e SCHWAZENBERGER et al, 2000). Em cervídeos neotropicais, especificamente *M. gouazoubira*, as características dos eventos reprodutivos foram descritas através deste método de acompanhamento endócrino (PEREIRA et al, 2006).

O balanceamento genético das células germinativas das fêmeas híbridas também poderia ser inferido utilizando a técnica de produção de embriões *in vitro*, uma vez que, apenas os oócitos que possuem uma bagagem genética balanceada terão capacidade de ser fertilizados e posteriormente a competência de iniciar a embriogênese.

O segundo MATZUK et al (2002) a embriogênese só tem início se o oócito acumular alguns fatores maternos específicos em sua fase de desenvolvimento folicular, e para isso este deve estar geneticamente balanceado. O oócito de um mamífero em crescimento, mesmo bloqueado na prófase I da meiose, mantém transcrições ativas, produzindo um estoque de mRNA e proteínas para serem utilizados no início da fase de clivagem do embrião. A atividade transcricional embrionária só tem início após a ativação do seu genoma que ocorre depois que o embrião iniciou o processo de divisão celular e, por isso, seu desenvolvimento inicial é dependente dos mRNA e das proteínas sintetizadas anteriormente pelo oócito (BETTEGOWDA & SMITH, 2007). Essa passagem é chamada de transição materno-embriônica e para que ocorra de forma adequada com subsequente desenvolvimento embrionário normal, é necessário

que os gametas, em especial o oócito, estejam geneticamente balanceados (BETTEGOWDA *et al.*, 2008).

Utilizando técnicas laboratoriais como dosagem hormonal, histologia de ovário e produção *in vitro* de embriões, para inferir a capacidade reprodutiva de uma fêmea, poderíamos obter um resultado satisfatório em um tempo mais curto, principalmente quando nos referimos aos mamíferos de médio e grande porte, onde a estimativa do sucesso reprodutivo, que depende do nascimento de um filhote viável, levaria meses ou até mesmo anos para se obter o resultado. Isso porque teríamos que esperar a maturidade da fêmea e depois todo o período de gestação.

3. OBJETIVO

Visto o problema, o objetivo deste trabalho foi estudar a existência deste isolamento reprodutivo entre as diferentes populações (citótipos) de *M. americana*, e assim tentar elucidar esta dúvida que ainda existe sobre a taxonomia da espécie. Para tal, buscamos estudar parâmetros reprodutivos de fêmeas, como perfil hormonal de progesterona fecal, histologia de ovário e produção de embrião *in vitro*, que pudessem inferir as possíveis barreiras reprodutivas entre os citótipos da espécie *M. americana*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

As fêmeas utilizadas no experimento foram geradas pelo cruzamento de animais da espécie *M. americana* pertencem ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp/Jaboticabal. Os parentais foram cariotipados e identificados como integrantes de diferentes citótipos: Carajás (2N=50), Juína (2N=43-45), Paraná (2N=52-53), Rondônia (2N=42) (Figura 2).

Foram realizados cruzamentos entre indivíduos de mesmo citótipo e entre indivíduos de citótipos diferentes (Tabela 1). Para melhor visualizarmos as diferenças do número de cromossomos entre os citótipos, foram apresentados apenas os números de autossomos (2Na) dos indivíduos parentais, uma vez que os machos do gênero *Mazama* possuem sistema sexual múltiplo (XY₁Y₂). Dos parentais utilizados nos cruzamentos, duas fêmeas e um macho apresentaram fusão cromossômica 6:21 e 7:20, respectivamente. Para os produtos (F1) foi dada a diferença entre os autossomos parentais (DAP) tendo como base o cálculo do número de autossomos (2Na) do pai menos o número de autossomos (2Na) da mãe.

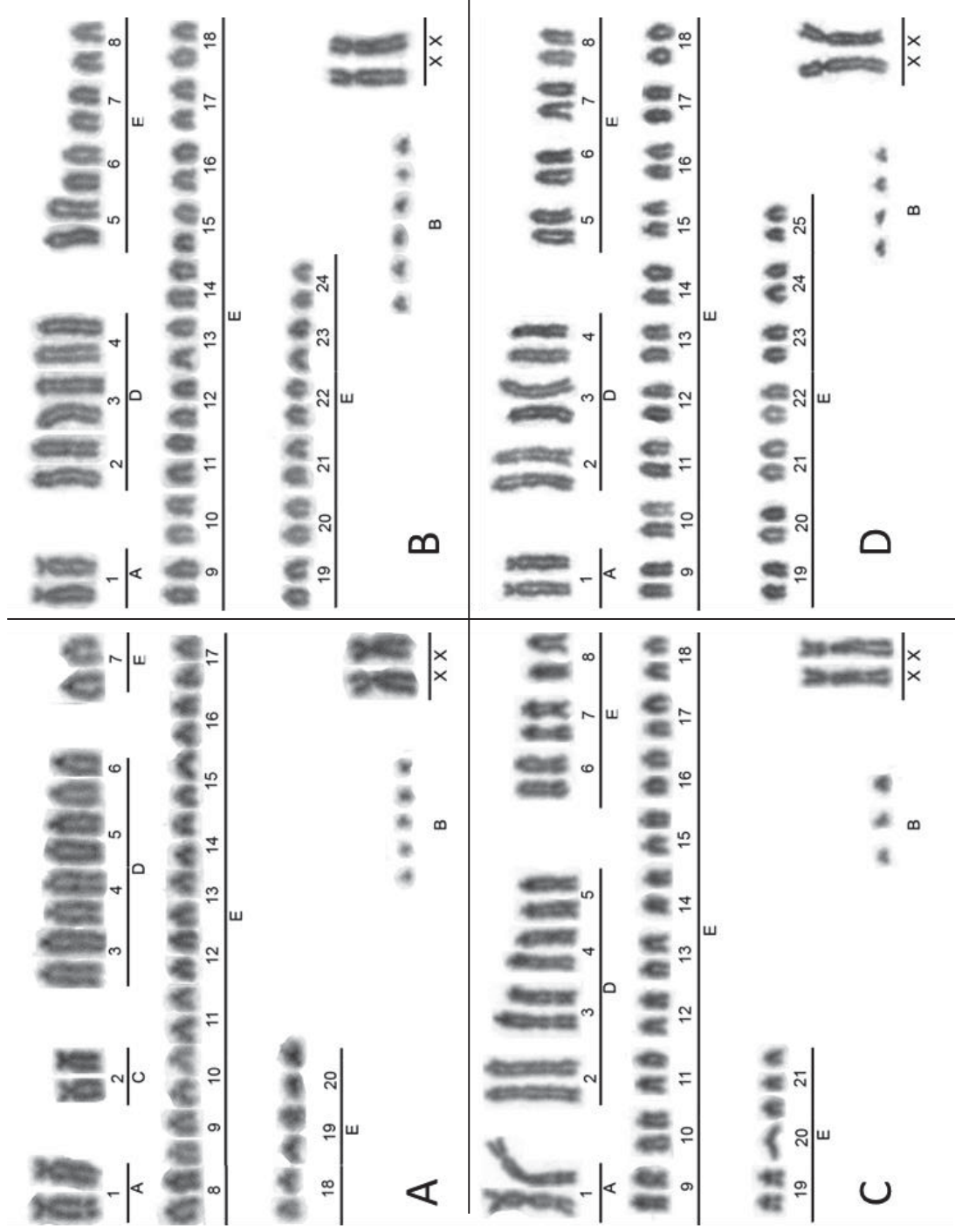


Figura 3. Cariótipos de quatro fêmeas dos diferentes citótipos utilizados para os cruzamentos. A - Citótipo Rondônia; B - Citótipo Carajás; C - Citótipo Juína; e D - Citótipo Paraná.

Tabela 1- Cruzamentos entre os animais dos diferentes citótipos da espécie *M. americana* (Carajás, Juína, Paraná e Rondônia) para a obtenção de animais puros – intracitótipos (P), e híbridos - intercitótipos (H).

Citótipos Parentais		Cruzamentos
Macho	Fêmea	F1
Juína (2Na=42)	Juína (2Na=42)	P1 (DAP= 0)
Juína (2Na= 42)	Juína (2Na= 41)	P2 (DAP=1)
Rondônia (2Na= 39)	Rondônia (2Na= 40)	P3 (DAP= -1)
Paraná (2Na=50)	Juína (2Na=41)	H1 (DAP= 9)
Juína (2Na=42)	Paraná (2Na=50)	H2 (DAP= -8)
Juína (2Na=42)	Carajás (2Na=48)	H3 (DAP= -6)
Paraná (2Na=50)	Juína (2Na=42)	H4 (DAP= 8)
Paraná (2Na=50)	Rondônia (2Na=40)	H5 (DAP= 10)*
Rondônia (2Na=39)	Juína (2Na=41)	H6 (DAP= -2)

2Na: número diploide de autossomos; DAP: diferença do número de autossomos dos parentais; *Óbito aos 11 meses de idade.

4.2. Manejo em cativeiro

4.2.1. Instalações

O projeto foi desenvolvido no Galpão de Manejo de *Mazama* do NUPECCE. Os animais foram mantidos isolados em baias de alvenaria de 12 m², dispostas em um galpão fechado, com corredor central. O Galpão de Manejo possui sistema para o correto manejo, contenção e manipulação dos animais, para que sejam evitados os acidentes, comuns nesse grupo taxonômico.

4.2.2. Alimentação

Os animais do plantel receberam em sua dieta uma ração para equino de alta palatabilidade (Purina; Omolene tradicional), perfazendo até 1 kg/animal/dia. Além de forragem, perfazendo até 2 kg/animal/dia. As forragens aceitas pelos animais são: soja (*Glycine max*), soja-perene (*Neonotonia white*), rami (*Boehmeria nivea*) e amora (*Morus alba*).

4.3. Dosagem de metabólitos fecais de progesterona

4.3.1. Colheita de fezes

A colheita das amostras fecais utilizadas para a dosagem hormonal das fêmeas foi realizada no período de um ano, com intervalos de 7 dias entre cada colheita, iniciando-se aos 6 meses de idade e finalizando aos 18 meses de idade de cada animal. A colheita só teve início após o desmame dos animais (6 meses), pois até este período o filhote permaneceu na mesma baia da fêmea, tornando difícil a individualização das fezes. As baias foram limpas na tarde do dia anterior à coleta e as fezes colhidas na manhã seguinte. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas a -20°C até o início da etapa de dosagem.

4.3.2. Processamento das amostras

a) Homogeneização

As amostras foram desidratadas em estufa a 56°C por aproximadamente 72 horas e trituradas com auxílio de um martelo. Este processamento diminui a influência da água nas dosagens hormonais e favorece a homogeneização destas nos casos de disfunções gastroentéricas, como diarreia e constipação (BROWN & WILDT, 1997).

b) Extração dos metabólitos fecais

Os metabólitos foram extraídos das amostras fecais assim como descrito por GRAHAM et al. (2001). Sucintamente, 0,5g da amostra processada adicionada a 5 mL de metanol 80% e agitada em vortex por 30 segundos, por 12 horas em agitador horizontal e novamente em vortex por 10 segundos. Então, após passar por uma centrifugação (377g por 20 minutos) o sobrenadante foi separado e diluído em tampão diluição (0.2M NaH₂PO₄, 0.2M Na₂HPO₄, NaCl, BSA e água destilada, pH 7,0) para posteriores análises.

4.3.3. Ensaio Imunoenzimático (EIA)

Para as dosagens através de EIA, foi utilizando o anticorpo monoclonal CL425 (Universidade da Califórnia – Davis – CA – USA) para progestágenos. A reatividade

cruzada do anticorpo CL425 foi descrita por GRAHAM et al. (2001) como: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona) 100,0%; 4-pregnen-3 α -ol-20-ona 188,0%; 4-pregnen-3 β -ol-20-ona 172,0%; 4-pregnen-11 α -ol-3,20-diona 147,0%; 5 α -pregnan-3 β -ol-20-ona 94,0%; 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona 64,0%; 5 α -pregnan-3,20-diona 55,0%; 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona 12,5%; 5 β -pregnan-3,20-diona 8,0%; 4-pregnen-11 β -ol-3,20-diona 2,7%; 5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona 2,5%; 5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol (pregnenediol) <0,1%; outros metabólitos <0,1%. Este anticorpo foi escolhido por apresentar alta reatividade cruzada com os metabólitos excretados nas fezes de *Mazama americana* - 5 α - e 5 β - pregnanes (POLEGATO, 2004). Todos os extratos fecais foram diluídos em tampão de diluição e dosados em duplicata. A validação das dosagens hormonais foi feita como descrito por BROWN et al. (2004), pela observação de uma disposição paralela entre a curva-padrão e a formada pelo pool de extratos fecais, preparados por diluição seriada.

4.3.4. Análise dos Resultados

Os resultados serão apresentados como ng de progestinas fecais/ g de fezes. Os perfis das fêmeas puras foram analisados individualmente. Por serem coletas semanais de amostras, não foi possível identificar corretamente os pontos da fase interluteal, e sim os picos de progesterona das fases luteais. Foram identificados os ciclos e obtidas médias individuais dos picos de progesterona das três fêmeas puras (Mp1; Mp2; Mp3). Uma vez obtidas estas médias, calculamos o valor mínimo da fase luteal (min lut_{p1}, min lut_{p2} e min lut_{p3}), para cada fêmea, como sendo a média (Mp) menos duas vezes o desvio padrão (DP) [Mp-(2*DP)]. Foi então obtida uma média geral de MIN LUT para das fêmeas puras (min lut_{p1} + min lut_{p2} + min lut_{p3} / 3 = MIN LUT) a qual foi utilizada para todas as fêmeas puras e híbridas do experimento. As concentrações acima do valor do MIN LUT, foram consideradas como fase luteal, e as concentrações abaixo do valor do MIN LUT, foram consideradas como fase interluteal. Os pontos *outlier* foram retirados para os cálculos.

O momento em que o valor ultrapassou duas vezes a concentração MIN LUT ou que se mantinham acima desta concentração por mais de uma semana e sua queda durou menos de duas semanas foi considerado como início do ciclo luteal e final da

fase de anesto. Por serem coletas semanais não foi possível identificar o início e o final dos períodos luteais e interluteais, porém foi considerado um ciclo completo cada pico da fase luteal.

4.4. Histologia do ovário

Aos 18 meses de idade, as fêmeas foram submetidas à ovariectomia unilateral para avaliação histológica e obtenção de oócitos para fertilização *in vitro*.

O preparo das lâminas histológicas foi realizado segundo o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP – Jaboticabal (Anexo I). Foram feitos cortes seriados de 5µm utilizando um micrótomo e as lâminas foram submetidas a dois tipos de coloração: Hematoxilina-Eosina (Anexo II) e Tricômico de Masson (Anexo III).

4.4.1. Análise dos Resultados

Os cortes foram observados em micriscópio óptico e a quantidade de estruturas ovarianas encontradas, descrição no Anexo X (BACHA & BACHA, 2003), foram anotadas. O resultado da presença de estruturas ovarianas está como média ± erro padrão da contagem de três cortes histológicos para cada animal. O resultado foi comparado entre as fêmeas híbridas e puras.

4.5. Superovulação, aspiração de oócitos “in vivo” e retirada do ovário

Para o procedimento de aspiração *in vivo* e retirada do ovário, o estro das fêmeas foi sincronizado utilizando um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®] - *Controlled Internal Drug Release*[®] - Pfizer[®] - EUA, contendo 0,33 gramas de progesterona, tipo-T, desenvolvido para ovinos e caprinos) por 8 dias (ZANETTI, 2006), seguido de aplicação intramuscular de 0,25 mL de benzoato de estradiol, no dia da colocação do implante (D0). No quarto dia (D4) de implantação do dispositivo de progesterona iniciou-se a administração de 130mg de FSH (Folltropin[®]-V - Tecnopec -

Canadá), dividido em 8 doses iguais, aplicado a cada 12 horas para estimular o desenvolvimento folicular.

Oito dias após o início do tratamento (D8) foi realizada a laparotomia para aspiração folicular *in vivo* de um dos ovários e ovariectomia do ovário contra-lateral. Para tal os animais foram anestesiados (após jejum sólido e hídrico de 24 horas) com associação de quetamina, xilazina e midazolam e mantidos em isoflurano durante o procedimento.

A aspiração *in vivo* foi realizada com um dispositivo de infusão intravenosa número 22 (BD[®]) acoplado a uma seringa de 20 mL (Figura 3). O ovário que apresentou maior número de folículos foi selecionado para aspiração. O fluido folicular aspirado foi mantido em solução PBS completo com heparina (10UI/ml) aquecido a 37°C, até o início da Produção *in vitro* (PIV). O ovário retirado também foi mantido no mesmo meio (até o encaminhamento para o laboratório). Posteriormente foi dividido em duas partes iguais: uma destinada à obtenção de oócitos através de fatiamento e a outra destinada ao exame histológico (conforme descrito anteriormente).

Após o término da cirurgia, o dispositivo intravaginal CIDR[®] foi retirado.



Figura 4. Aspiração folicular *in vivo* da fêmea P1, no oitavo dia do protocolo de superovulação, utilizando dispositivo de infusão intravenosa número 22 (BD[®]) acoplado a uma seringa de 20 mL.

4.6. Produção de embriões “in vitro”

A PIV foi realizada segundo o protocolo para ovinos utilizado no Laboratório do Departamento de Reprodução Animal da FCAV/UNESP – Jaboticabal (AnexoIV). A porção do ovário destinada à obtenção de oócitos foi fatiada em solução PBS completo com heparina (10UI/ml) aquecido a 37°C. Posteriormente, as soluções obtidas do fatiamento e da aspiração *in vivo* foram analisadas com auxílio de uma lupa para a colheita dos oócitos. A classificação realizada seguiu os parâmetros para bovinos (LEIBFRIED & FIRST, 1979). Aqueles classificados como de melhor qualidade foram encaminhados para a PIV.

4.6.1. Colheita de sêmen para fertilização “in vitro” (FIV)

Os doadores de sêmen foram os pais das fêmeas doadoras dos oócitos. A colheita de sêmen para a FIV foi realizada por eletroejaculação. O sêmen coletado foi pré-diluído em Tris-gema (DUARTE & GARCIA, 1997) e analisado quanto à motilidade, vigor e concentração. Em seguida a concentração foi ajustada para 50×10^6 espermatozoides/mL e o sêmen envasado em palhetas de 0,25mL e congelado em congelador portátil TK-3000[®], sendo mantido em botijão criogênico até a realização da FIV.

4.6.2. Coloração Nuclear Hoechst 33342

Após o décimo dia de cultivo *in vitro*, os embriões foram corados em Hoechst 33342 para avaliar a fertilização através da presença ou ausência de pronucleos. Para a coloração foi seguido o protocolo utilizado no Laboratório do Departamento de Reprodução Animal da FCAV/UNESP, Jaboticabal .

Em uma lâmina, foram colocadas uma gota de solução de bloqueio e uma gota de 10µL de Hoechst 33342, acrescido de glicerol. Os oócitos/embriões foram transferidos para a gota da lâmina e então cobertos com uma lamínula. As laterais da lamínula foram vedadas com esmalte. Após duas horas as análises foram realizadas

em microscópio de epifluorescência (filtro de excitação BP 330-385nm e filtro de barreira BA 420) e fotografadas com câmera digital (Olympus® C-5060 5.1megapixel).

4.6.3. *Análise dos Resultados*

A resposta à superovulação foi avaliada segundo a quantidade de oócitos obtidos da aspiração de folículos desenvolvidos das fêmeas híbridas (média \pm desvio padrão). A produção de embriões foi avaliada por observação da coloração nuclear Hoechst 33342 dos oócitos/embriões. Foram considerados não fecundados os oócitos que apresentassem núcleos em diferentes fases da meiose. Foram considerados fertilizados quando apresentassem pronucleos ou núcleos de blastômeros. Oócitos/embriões degenerados, fragmentados ou com presença de muitas células do *cumulus* impedindo a visualização dos núcleos foram considerados como não conclusivos.

5. RESULTADOS

5.1. Dosagem de metabólitos fecais de progesterona

5.1.1. Teste de Validação do Ensaio Imunoenzimático

Foi realizada a sobreposição da curva-padrão com diluições seriadas, de um pool das amostras contendo duas amostras aleatórias de cada fêmea, e obtivemos um paralelismo entre as curvas (Figura 4). A diluição 1:256 foi escolhida para ser utilizada em todas as amostras pois se situou na parte mais estável da curva, entre 30 e 70% de ligação.

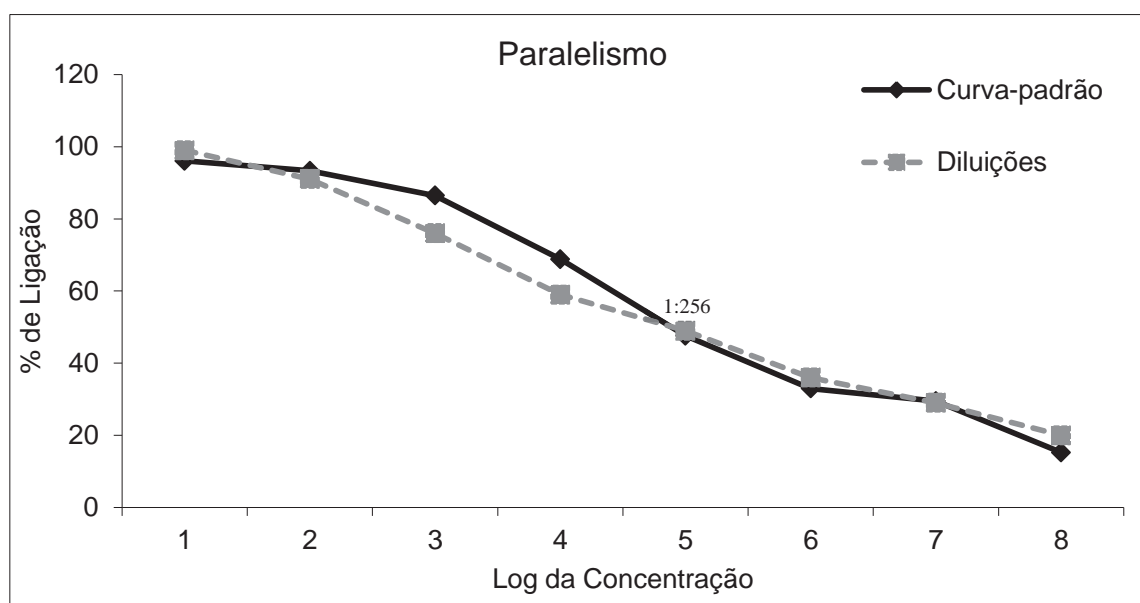


Figura 5. Resultado do Teste de validação do Ensaio Imunoenzimático. Presença de paralelismo entre as curvas padrão e diluição, e o ponto de diluição escolhido (1:256) por estar na parte mais estável da curva, entre 30 e 70% de ligação.

5.1.2. Perfis Hormonais

As fêmeas puras P1, P2 e P3 entraram em puberdade aos 8 e 13 meses de idade, respectivamente (Figura 5). Quatro das cinco fêmeas híbridas estudadas entraram em puberdade, sendo H1 aos 6 meses, H2 e H3 aos 9 meses e H6 aos 14 meses (Figura 6). A fêmea H4 não apresentou ciclo luteal mantendo-se em anestro por todo o período de coleta das amostras.

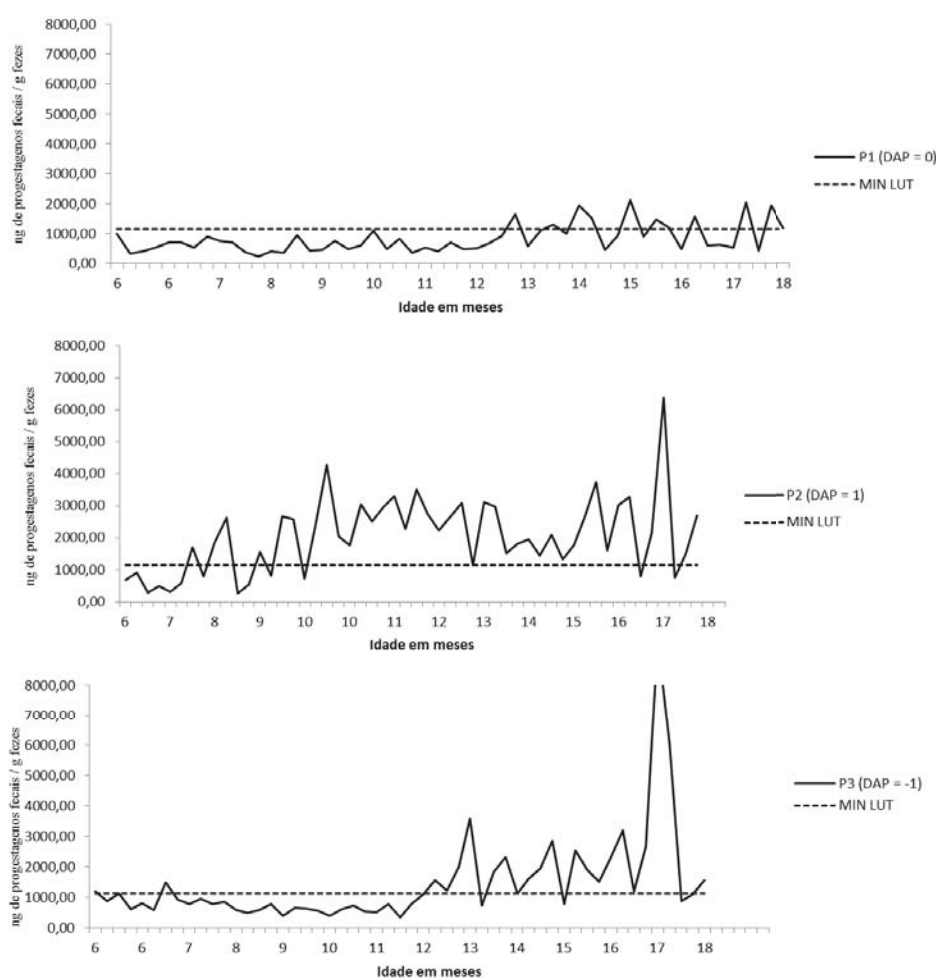


Figura 6. Perfil de progesterina fecal (ng de progesterina/g de fezes) das fêmeas Puras (P1, P2, P3) no período de 6 a 18 meses de idade. MIN LUT : Representação da concentração mínima de progesterina da fase luteal (linha pontilhada).

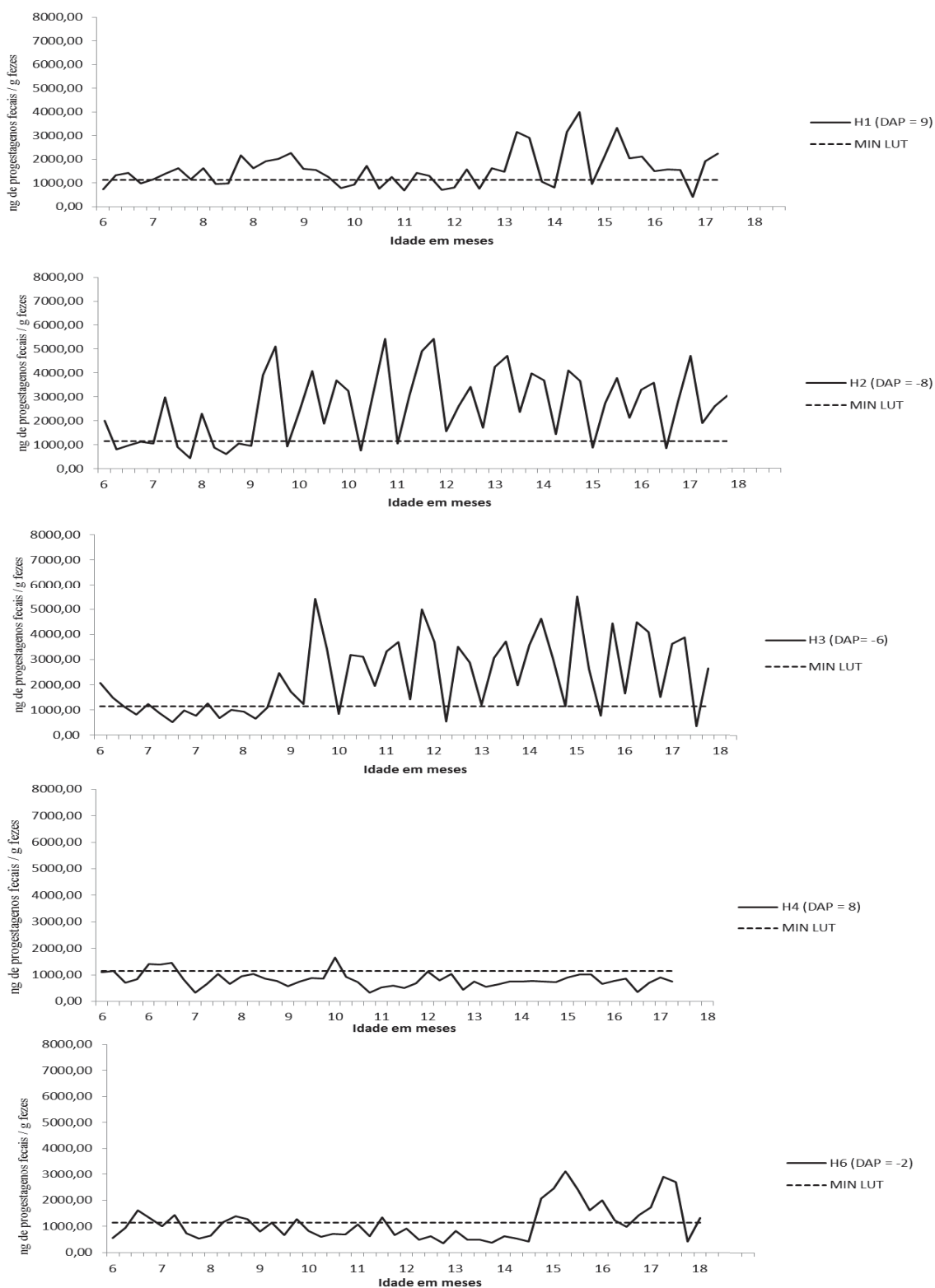


Figura 7. Perfil de progesterinas fecais (ng de progesterinas/g de fezes) das fêmeas Híbridas (H1, H2, H3, H4, H5 e H6) no período de 6 a 18 meses de idade. MIN LUT: Representação da concentração mínima de progesterinas da fase luteal (linha pontilhada).

Quanto aos ciclos luteais, as fêmeas puras apresentaram diferentes concentrações de progesteronas nos picos da fase luteal sendo P1 $1799,0 \pm 245,07$ ng de progesteronas fecais/g de fezes, P2 $3168,00 \pm 1156,72$ ng/g e P3 $2681,04 \pm 645,20$ ng/g. As híbridas H2 e H3 apresentaram maiores concentrações de progesteronas nos picos da fase luteal com uma média de $4239,72 \pm 739,80$ e $4035,46 \pm 929,83$ ng/g em relação às puras e as outras híbridas H1 e H6, que apresentaram concentrações mais baixas com média de $2163,05 \pm 765,57$ e $2667 \pm 490,26$ ng/g.

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos das fêmeas híbridas, separadas conforme as linhagens descritas por ABRIL et al. (2010).

Tabela 2 – Resultados obtidos dos perfis de progesteronas fecais das fêmeas híbridas e puras apresentados conforme os cruzamentos realizados.

Fêmeas	Cruzamento entre as linhagens	Cruzamentos entre os citótipos	Puberdade (mês)	Concentração média da fase luteal (média \pm DP)
H1 (DAP= 9)	BxA	PrxJu	6	$2163,05 \pm 765,57$
H4 (DAP= 8)	BxA	PrxJu	-	-
H2 (DAP= -8)	AxB	JuxPr	8	$4239,72 \pm 739,80$
H3 (DAP= -6)	AxB	JuxCa	9	$4035,46 \pm 929,83$
H6 (DAP= -2)	AxA	RoxJu	14	$2667,96 \pm 490,26$
P1 (DAP= 0)	AxA	JuxJu	13	$1799,00 \pm 245,07$
P2 (DAP= 1)	AxA	JuxJu	8	$3168,00 \pm 1156,72$
P3 (DAP= -1)	AxA	RoxRo	13	$2681,04 \pm 645,20$

5.2. Histologia do ovário

Tanto as fêmeas puras quanto as híbridas apresentaram folículo em desenvolvimento, folículo primordial, corpo lúteo, *corpus albicans* e folículo em atresia (Figura 7). A média da contagem das estruturas das fêmeas puras foi superior em relação às das fêmeas híbridas (Tabela 3). As fêmeas H1 e H4 apresentaram número muito reduzido de estruturas em relação às demais.

A histologia do ovário da fêmea H5 foi realizada no intuito de observar a presença ou não de folículos primordiais, uma vez que esta veio a óbito antes dos 18 meses de idade. Portanto, o ovário não estava superovulado, como no caso das outras fêmeas, mas foi possível observar estruturas como folículos terciários e corpo lúteo, indicando sua plena atividade aos 11 meses de idade (Figura 8).

Na Tabela 3 é possível observar que a fertilidade das fêmeas híbridas pode variar de estéril a subfertil conforme o tipo de cruzamento realizado entre as linhagens (Linhagem A: citótipos de Rondônia e Juína,; e Linhagem B: citótipos de Paraná e Carajás). Cruzamentos entre machos da linhagem B com fêmeas da linhagem A produzem fêmeas estéreis (H1 e H4) com ausência de estruturas foliculares. Já o cruzamento entre machos da linhagem A com fêmeas da linhagem B produzem fêmeas subférteis (H2 e H3) com presença de estruturas foliculares, porém em menor número que nas fêmeas puras. Nesta tabela foi excluída a fêmea H5 por não ter sido superovulada nem ter a mesma idade das demais.

Muito interessante foi o resultado da fêmea H6, que apesar de ser originada de um cruzamento entre dois citótipos da mesma linhagem (Linhagem A), apresentou valores muito baixos de estruturas foliculares similares as das fêmeas H1 e H4.

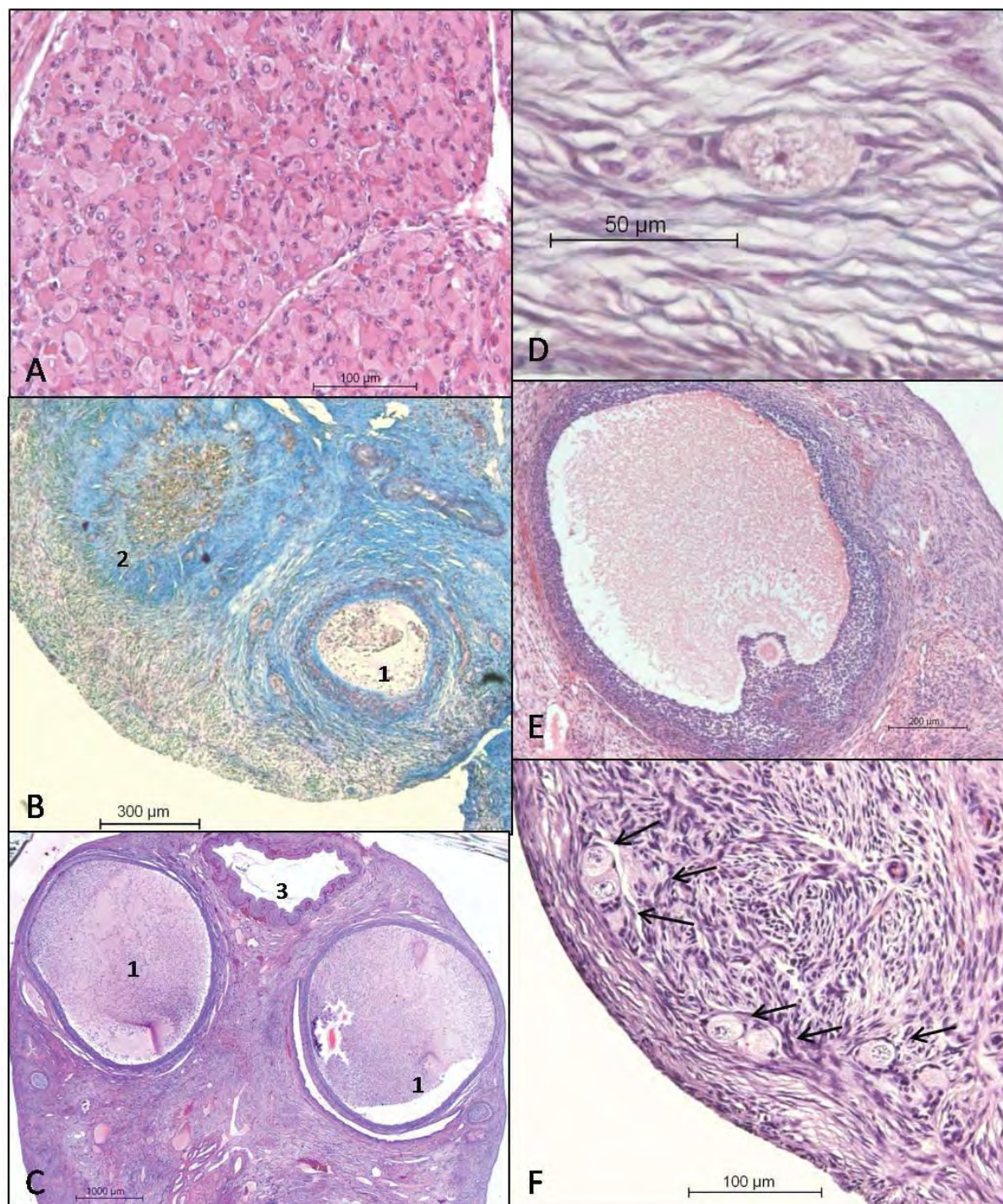


Figura 8. Imagens de cortes histológicos dos ovários: A) Fêmea H1: Células do corpo lúteo; B) Fêmea H3: 1- folículo em início de atresia, 2- Corpus albicans; C) Fêmea H2: 1- Folículo terciário, 3- Corpo lúteo; D) Fêmea P3: Folículo primordial; E) Fêmea P2: Folículo terciário; F) Fêmea P1: Folículos primordiais (setas).

Tabela 3 - Resultados da contagem de estruturas ovarianas (média \pm erro padrão) das fêmeas híbridas e puras. Ovários superovulados aos 18 meses de idade.

	Cruzamento entre as linhagens		Cruzamentos entre os citótipos		Folículo Primordial	Folículo Primário	Folículo Multilaminar Primário	Folículo Secundário	Folículo Terciário	Folículo Atrésico	Corpo Lúteo	Corpus albicans
H1 (2Na= 9)	BxA	PrxJu	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	1,0 (\pm 0,0)	1,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	1,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)
H2 (2Na= -8)	AxB	JuxPr	4,7(\pm 2,9)	5,3 (\pm 0,9)	4,0 (\pm 0,6)	1,3 (\pm 0,3)	1,3 (\pm 0,3)	5,0 (\pm 0,0)	7,3 (\pm 0,9)	7,3 (\pm 0,9)	3,0 (\pm 0,0)	1,0(\pm 0,6)
H3 (2Na= -6)	AxB	JuxCa	6,0 (\pm 1,0)	7,3 (\pm 1,2)	1,3 (\pm 0,3)	0,7 (\pm 0,3)	0,7 (\pm 0,3)	2,0 (\pm 0,0)	1,7 (\pm 0,3)	1,7 (\pm 0,3)	1,0 (\pm 0,0)	6,3 (\pm 0,3)
H4 (2Na= 8)	BxA	PrxJu	0,3 (\pm 0,3)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	1,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)
H5* (2Na= 10)	BxA	PrxRo	0,7 (\pm 0,7)	0,7 (\pm 0,7)	1,3 (\pm 0,9)	1,3 (\pm 0,3)	1,3 (\pm 0,3)	3,3 (\pm 0,3)	2,3 (\pm 0,3)	2,3 (\pm 0,3)	0,0 (\pm 0,0)	3,3 (\pm 0,9)
H6 (2Na= -2)	AxA	RoxJu	0,3 (\pm 0,3)	0,0 (\pm 0,0)	1,7 (\pm 0,3)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	2,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	1,0 (\pm 0,0)	1,0 (\pm 0,0)
P1 (2Na= 0)	AxA	JuxJu	18,7 (\pm 2,9)	13,0 (\pm 2,0)	0,0 (\pm 0,0)	0,3 (\pm 0,3)	0,3 (\pm 0,3)	7,7 (\pm 0,3)	5,0 (\pm 0,0)	5,0 (\pm 0,0)	3,0 (\pm 0,0)	6,3 (\pm 1,2)
P2 (2Na= 1)	AxA	JuxJu	87,3 (\pm 3,8)	54,7 (\pm 7,3)	3,7 (\pm 0,9)	1,3 (\pm 0,7)	1,3 (\pm 0,7)	10,7 (\pm 0,3)	5,7 (\pm 0,7)	5,7 (\pm 0,7)	6,7 (\pm 0,3)	2,3 (\pm 0,3)
P3 (2Na= -1)	AxA	RoxRo	38,0 (\pm 7,5)	11,0 (\pm 3,2)	5,7 (\pm 0,3)	2,0 (\pm 0,0)	2,0 (\pm 0,0)	14,0 (\pm 0,0)	2,7 (\pm 0,9)	2,7 (\pm 0,9)	1,0 (\pm 0,0)	6,3 (\pm 1,2)

*Ovário não superovulado (ovário de fêmea com 11 meses de idade).

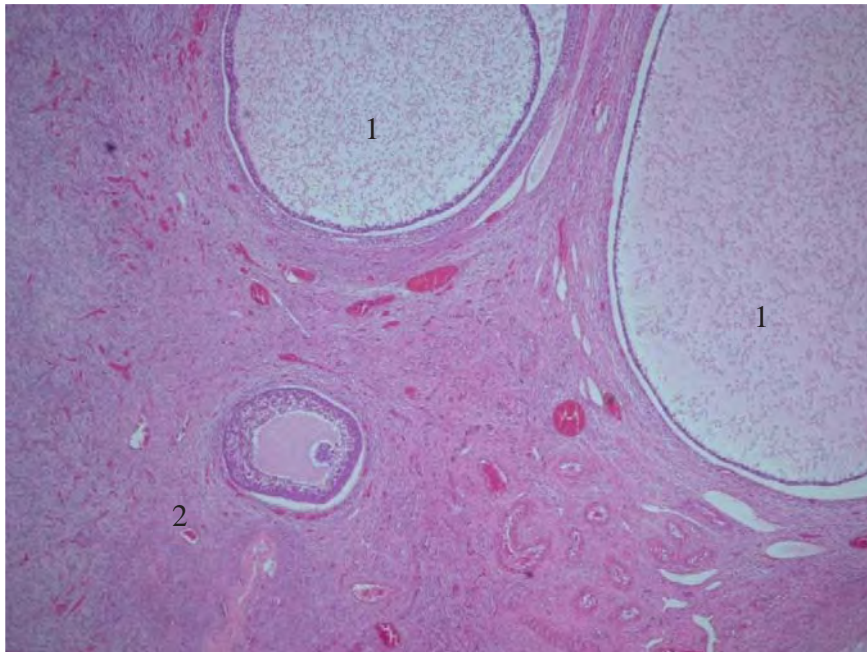


Figura 9. Presença de folículos em diversas fases de crescimento: 1) Folículo terciário e 2) Folículo secundário. H5 aos 11 meses de idade, sem a ação do protocolo de superestimulação. (amplificação 40x).

5.3. Superovulação, aspiração folicular e Produção de embriões “in vitro”

As fêmeas P1, P2 e P3 apresentaram uma boa resposta ao tratamento de superovulação, com desenvolvimento de folículos e uma média $8,67 \pm 3,06$ (total 26) oócitos aspirados de um ovário, por fêmea. O total de oócitos obtidos, das fêmeas puras, por fatiamento (de metade de um ovário) foi de 105 (35 ± 9 por fêmea). Todos os oócitos foram encaminhados para a maturação, fertilização e cultivo/desenvolvimento *in vitro*. Após a coloração em Hoechst, 32, 82% (43 de 131) embriões apresentaram clivagem celular e 36,64% (48 de 131) foram considerados oócitos não fertilizados, para os 30,53% (40 de 131) restantes a coloração não foi conclusiva (Tabela 4). Todos os embriões bloquearam antes do estágio de blastocisto, porém foi possível obter mórulas com mais de 20 células (Figura 10).



Figura 10. Mórula - embrião da fêmea P2 apresentando mais de 20 núcleos corados com Hoechst 33342 após o sétimo dia de desenvolvimento.

A fêmea H1 e H4 não responderam ao tratamento de superovulação, não apresentando desenvolvimento de folículos no momento da aspiração, diferente das H2, H3 e H6 que apresentaram folículos bem desenvolvidos (Figura 10). No total, foram obtidos 14 oócitos ($2,8 \pm 5,6$ por fêmea) por aspiração, e 36 oócitos ($7,2 \pm 11,57$ por fêmea) pela técnica de fatiamento de metade de um ovário (de cada fêmea). Desses, 37 oócitos foram encaminhados para maturação, e 36 para a fertilização e cultivo/desenvolvimento *in vitro* (Tabela 4). Após a coloração em Hoechst observamos uma taxa de 11,11% de fertilização, inclusive presença de poliespermia, e uma taxa muito baixa de clivagem de 5,55%. Desesseis de 37 (44,44%) foram considerados oócitos não fertilizados e 44,44% (16 de 37) não foram conclusivos. Todos os embriões bloquearam antes do estágio de mórula, com divisão de 4 a 6 células apenas, inclusive em estágio de prónucleo (Figura 11).

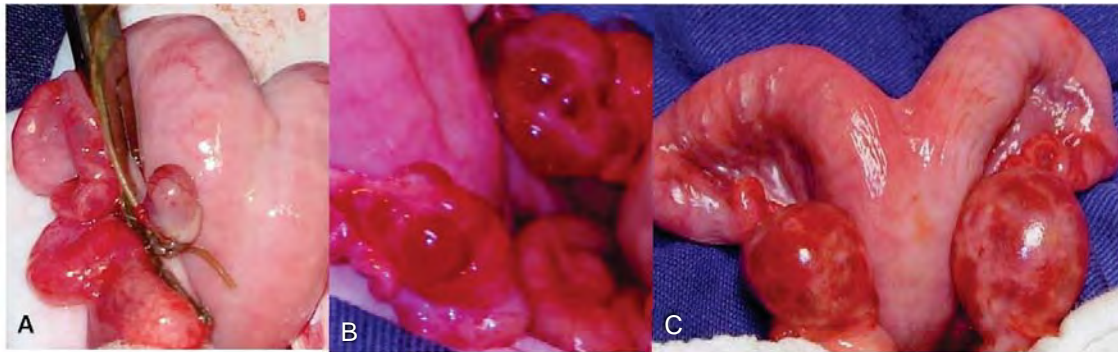


Figura 11. Ovário após tratamento de superovulação. A) Fêmea H1; B) Fêmea H3; C) Fêmea P3.

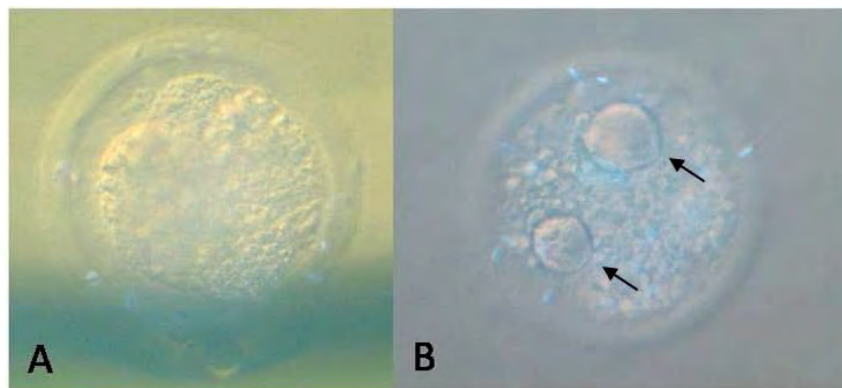


Figura 12. Embriões produzidos após 10 dias de cultivo: A- embrião clivado em quatro células da fêmea H3; B- presença de pronúcleo em embrião da fêmea H (setas).

Tabela 4 - Resultado da recuperação de oócitos e da PIV após as análises da coloração nuclear com Hoechst 33342 das fêmeas híbridas e puras.

	Oócitos Recuperados		MIV	FIV	CIV				Não Fertilizado		Não Conclusivos*	
	Aspiração	Fatiamento			Fertilizados		Clivados		nº	%	nº	%
					nº	%	nº	%				
H1	1	4	2	2	0	0,00	0	0,00	1	50,00	1	50,00
H2	6	12	12	12	2	16,67	1	8,33	5	41,67	5	41,67
H3	3	11	10	10	2	20,00	1	10,00	3	30,00	5	50,00
H4	0	0	0	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
H6	4	9	13	12	0	0,00	0	0,00	7	58,33	5	41,67
Total Híbridas	14	36	37	36	4	11,11	2	5,56	16	44,44	16	44,44
P1	12	26	38	38	6	15,79	6	15,79	20	52,63	12	31,58
P2	6	44	50	50	27	54,00	27	54,00	9	18,00	14	28,00
P3	8	35	43	43	10	23,26	10	23,26	19	44,19	14	32,56
Total Puras	26	105	131	131	43	32,82	43	32,82	48	36,64	40	30,53

MIV: Maturação *in vitro*; FIV: Fertilização *in vitro*; CIV: Cultivo *in vitro*; *Foram computados os oócitos/embriões degenerados, fragmentados e/ou com presença de muitas células do cumulus impedindo a visualização dos núcleos.

6. DISCUSSÃO

6.1. *Inferência da capacidade reprodutiva*

Os parâmetros reprodutivos utilizados neste trabalho (dosagem de metabólitos fecais de progesterona, histologia de ovário, resposta superovulatória e produção de embriões *in vitro*) possibilitou inferir a capacidade reprodutiva das fêmeas, uma vez que foram observados perfis de ciclos luteais, presença de estruturas ovarianas, resposta superovulatória positiva e embriões produzidos *in vitro*.

O perfil hormonal de progestágenos fecais das fêmeas puras nos indicou a presença de ciclos luteais, representativos de sua atividade ovariana (HIRATA & MORI, 1995; SCHWARZENBERGER et al. 1996; YAMAUCHI et al. 1997; GRAHAM et al. 2001; PEREIRA 2006), bem como ausência de sazonalidade destes animais (WEMMER, 1998; PEREIRA et al. 2010). A maioria das fêmeas das espécies de cervídeos apresenta sua primeira ovulação entorno de um ano de idade, sendo que as fêmeas de espécies menores podem apresentar a primeira ovulação antecipada (SADLEIR, 1987). Neste trabalho as fêmeas apresentaram idade à puberdade variável e muitas vezes distinta dos 11 meses citado para a espécie por WEMMER (1998).

As fêmeas H1, H2, H3 e P2, apresentaram a primeira ovulação variando entre 6 e 9 meses de idade. Uma hipótese para essa puberdade antecipada é a alimentação oferecida durante o experimento, forragem com altas concentrações de proteínas e fornecimento de ração de alta palatabilidade, que pode ter influenciado na precocidade dos animais em relação aos tempo de puberdade dos animais de vida livre (KENNEDY & MITRA, 1963; SADLEIR, 1987). A nutrição adequada promove um aumento dos níveis de leptina circulante, um peptídeo produzido pelos adipócitos brancos. Este peptídeo atua na regulação do apetite, controle do peso, e tem um papel no controle do eixo hipotálamo-hipofise-gônadas

promovendo o início da puberdade. Animais prestes a entrar em puberdade apresentam um aumento dos níveis de leptina no sangue. Acredita-se que a leptina esteja envolvida na regulação da liberação de LH pela adenohipófise via neurotransmissores (KIESS et al. 1998; GONZÁLEZ et al. 2000; CAPRIO et al. 2001; GARCIA et al. 2002).

Uma observação interessante é que as fêmeas que apresentaram puberdade mais tardia (P1 e P3 aos 13 meses de idade e H6 aos 14 meses de idade) eram mais ariscas e se estressavam mais com manejo semanal de coleta de fezes e limpeza das baias. Segundo MOBERG (1991), esteróides da adrenal influenciam na regulação do eixo gonadal. A foliculogênese e a ovulação são as fases da reprodução mais vulneráveis ao estresse por serem dependentes de uma ação recíproca entre hormônios hipofisários e esteróides ovarianos. O aumento do cortisol plasmático além de levar a uma supressão do aumento da frequência de liberação do LH pulsátil, que por sua vez irá comprometer o aumento de estradiol pré-ovulatório causando falhas na ovulação, também inibi outros eventos pré-ovulatórios como o comportamento sexual (DOBSON & SMITH, 2000; BREEN, et al. 2005).

A ausência de ciclo da fêmea H4, indica uma possível esterilidade. Isso ficou claro quando, na histologia, foram observados pouquíssimos folículos primordiais, $0,3 \pm 0,3$, e 1 corpo lúteo. A fêmea H1, apesar de apresentar ciclo luteal, também não apresentou estruturas ovarianas (1 folículo terciário; 1 corpo lúteo e ausência de outras estruturas). Esses parâmetros revelam uma baixa capacidade reprodutiva das fêmeas H1 e H4.

Não há descrição da morfologia de ovário de cervídeos, mas sabe-se que os folículos primordiais constituem em torno de 90% do ovário de mamíferos, sendo este um indicador do número de oócitos do animal (ARIYARATNA & GUNAWARDANA, 1997). O número observado de folículos primordiais das três fêmeas puras variou de $87,3 \pm 3,8$ para fêmea P2, $38,0 \pm 7,5$ para a fêmea P3, até $18,7 \pm 2,9$ para fêmea P1. Provavelmente esta diferença deve-se à metodologia utilizada, onde apenas a metade do ovário retirado foi encaminhada para produção das lâminas histológicas. Além disso, a contagem foi realizada apenas

em três cortes histológicos. Para se obter o valor real do número de folículos primordiais, o ovário inteiro deveria ser seccionado para fabricação das lâminas histológicas e 100 cortes deveriam ser analisados, além disso, deveria ser calculado o valor segundo a fórmula de Abercrombie (ARIYARATNA & GUNAWARDANA, 1997; CUI & YU, 1999).

Apesar das fêmeas híbridas apresentarem estruturas ovarianas em seus cortes histológicos, as médias dessas observações foram menores em relação às fêmeas puras (Tabela 3). Principalmente às médias de folículos primordiais, $2 \pm 2,4$ para híbridas e 48 ± 28 para puras. Por ser um número amostral pequeno, três fêmeas puras, o desvio padrão foi alto. Porém, mesmo comparando valores individuais entre os animais, podemos observar (Tabela 3) que a quantidade de folículos primordiais das fêmeas puras é maior que o das híbridas, sendo um indício de subfertilidade (H2, H3 e H6) e até mesmo esterilidade (H1 e H4) destas.

Importante ressaltar que a atividade ovariana observada nos cortes histológicos refere-se à resposta ao tratamento de superovulação realizado nas fêmeas. Muito provável que, por este motivo, foi obtido um grande número de folículos terciários, principalmente nas puras ($P1 = 7,7 \pm 0,3$, $P2 = 10,7 \pm 0,3$ e $P3 = 14,0 \pm 0,0$).

Como esperado, as taxas de recuperação de oócitos *in vivo*, mesmo após o tratamento com FSH, das fêmeas híbridas variou de um e zero para as fêmeas H1 e H4 respectivamente, até 6 para a fêmea H2, 3 para H3 e 4 para fêmea H6. Valores baixos quando comparado com a recuperação de oócitos das fêmeas puras de $8,67 \pm 3,06$ por fêmea, indicando uma resposta positiva de *M. americana* ao protocolo de superovulação utilizando a dose 130mg de FSH com aplicações repetidas.

Em pequenos ruminantes a taxa de recuperação após estímulo com FSH pode chegar até $14,8 \pm 3,7$ (erro padrão) em cabras e $14,4 \pm 2,0$ (erro padrão) em ovelhas, dependendo da concentração de FSH e da técnica de recuperação utilizadas (GRAFT et al., 1999; STENBAK, 2001). Em ruminantes selvagens, as taxas são menores, com $9,3 \pm 1,7$ em *Gazella dama mhor* (BERLINGUER, et al. 2008) e $3,21 \pm 0,51$ em *Cervus elaphus* (ASHER et al. 2000). Em *Mazama*

gouazoubira foi possível obter um estímulo folicular de $10,4 \pm 1,1$ (ZANETTI, 2010), utilizando doses repetidas de FSH, porém neste trabalho não foi realizada aspiração de oócitos, não apresentando taxa de recuperação.

Quanto aos resultados da produção de embrião *in vitro*, não houve produção de blastocistos, os embriões atingiram apenas o estágio de mórula (fêmeas puras). A taxa de embriões em fase de clivagem se manteve em 5,55% (2 de 37) para as fêmeas híbridas e 32,82% (43 de 131) para as puras. Interessante foi observar que as fêmeas puras não só obtiveram uma taxa maior de clivagem, como apresentaram embriões em estágio de mórula, diferente das fêmeas híbridas que apresentaram todos os embriões bloqueados em fases iniciais de clivagem (4 e 6 células). Altas taxas de bloqueio durante a clivagem e baixas taxas de produção de embriões são comuns nos estudos de PIV de ruminantes, principalmente selvagens. Em *Gazella dama mhor*, foram obtidos apenas 6 embriões de 20 oócitos maturados, onde dois embriões bloquearam em estágio de quatro células e dois em estágio de seis a oito células (BERLINGUER et al., 2008). A produção de embriões *in vitro* para *Sika deer* também apresentou bloqueio antes do estágio de blastocisto sendo 49% com bloqueio antes do estágio de mórula, e 3% bloqueados no estágio de mórula. Já para a espécie *Cervus elaphus*, o mesmo trabalho apresenta melhores resultados de PIV chegando a produzir 24% de blastocistos (COMIZZOLI et al., 2001). Diversos protocolos de meios utilizados durante a PIV, principalmente no desenvolvimento *in vitro*, ainda estão sendo estudados para obtenção de melhor taxa de produção de embriões (BAINBRIDGE et al. 1999; COMIZZOLI et al., 2001; BERG & ASHER, 2003; LOCATELLI et al. 2005).

Durante o desenvolvimento folicular, os oócitos acumulam fatores maternos necessários para sustentar o início da embriogênese (MATZUK et al., 2002). O oócito de um mamífero em crescimento, mesmo bloqueado na prófase I da meiose, tem as transcrições ativas, produzindo um estoque de mRNA e proteínas para serem utilizados no início da fase de clivagem do embrião. Caso o oócito não seja fertilizado, este mecanismo que inicia a clivagem pode ser ativado iniciando sua divisão mesmo na ausência da fertilização, e para que a clivagem continue é

necessário que ocorra a ativação do genoma do embrião. Em camundongos é descrito que esta ativação ocorre na segunda divisão celular (NOTHIAS et al., 1995), para bovinos a ativação do genoma embrionário ocorre mais tarde, no estágio de 8 a 16 células e para ovelhas e cabras a ativação ocorre no estágio de 4 a 8 células (revisado por MEMILI & FIRST, 2000). Não há estudos de ativação gênica de embriões em cervídeos, portanto, o bloqueio dos embriões antes do estágio de mórula (de 1 a 16 células), no presente estudo, podem ter diversas causas: a) divisão por ativação partenogenética; b) falha na ativação do genoma do embrião; c) uso de meio inadequado para o desenvolvimento embrionário. Esta última hipótese pode ser rejeitada pelo resultado na produção de mórulas pela PIV das fêmeas puras, pois o mesmo meio que possibilitou que os embriões chegassem a este estágio foi utilizado no protocolo da PIV das fêmeas híbridas. Portanto, as duas primeiras hipóteses (ativação partenogenética e falha na ativação do genoma embrionário) são possíveis para explicar o bloqueio dos embriões na fase inicial de clivagem.

A alta porcentagem de oócitos não fertilizados das fêmeas híbridas (44,44%) pode ser devido à uma falha durante a etapa de maturação. Oócitos incompetentes são deficientes em mRNA necessários para promoverem a maturação nuclear e citoplasmática, isso impede que haja a penetração do espermatozóide e por conseguinte o desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al., 2001). Um estudo do complexo sinaptonêmico em fetos de fêmeas híbridas de diferentes espécies de wallabies apresentou irregularidades no pareamento cromossômico da primeira fase da meiose onde foram encontradas regiões não pareadas, pareamentos de múltiplos eixos (polivalência), entre outras irregularidades (ELDRIDGE et al., 2001). Esse desenvolvimento anormal do oócito leva à produção de gametas geneticamente desbalanceados e incapacitados de seguir com a meiose e produzir mRNAs necessários para sua maturação e capacitação, por isso a falha na produção de embriões em fêmeas híbridas.

6.2. Presença de Isolamento Reprodutivo Pós-zigótico

Com os dados obtidos neste experimento foi possível inferir a capacidade reprodutiva das fêmeas puras e observar a presença de subfertilidade/esterilidade das híbridas. Organizando os principais parâmetros analisados de maneira a identificar as fêmeas híbridas pelo grau de diferenciação entre os parentais, temos como resultado a tabela 5.

Tabela 5 - Valores dos Parâmetros Reprodutivos (número de folículos primordiais, oócitos e embriões) das fêmeas organizados segundo as diferenças de autossomos parentais (DAP).

Fêmeas	Cruzamentos entre as Linhagens*	Cruzamentos entre os Citótipos	DAP	Folículo Primordial	Oócitos	Embriões
H2	A x B	Ju x Pa	-8	4,7	18	2
H3	A x B	Ju x Ca	-6	6	14	2
H6	A x A	Ro x Ju	-2	0,3	13	0
P3	A x A	Ro x Ro	-1	38	43	10
P1	A x A	Ju x Ju	0	18,7	38	6
P2	A x A	Ju x Ju	1	87,3	50	27
H4	B x A	Pr x Ju	8	0,3	0	0
H1	B x A	Pr x Ju	9	0	5	0

*Linhagens Cromossômicas descritas por ABRIL et al., (2010)

As fêmeas P2 e P3 apresentaram DAP diferente de zero porque a mãe e o pai, respectivamente, possuem uma fusão, rearranjo cromossômico que afeta pouco a reprodução quando presente no indivíduo (HANADA et al., 1995; MOLTENI et al., 1998; SCHMUTZ et al., 1997), isso ficou claro com os resultados obtidos, portanto podemos observá-las como se a DAP fosse igual à zero.

As híbridas com DAPs negativas apresentam subfertilidade, enquanto as que apresentam DAPs positivas são praticamente estéreis. Provavelmente pela diferença entre os tipos de cruzamentos realizados. Segundo ABRIL et al. (2010), cada citótipo possui tipos e números específicos de rearranjos cromossômicos

diferenciando-os de um possível ancestral comum. Essas diferenças são: i) Paraná: uma inversão pericêntrica; ii) Carajás: uma inversão pericêntrica e uma fusão em tandem; iii) Juína: uma fusão cêntrica e três fusões em tandem; iv) Rondônia: uma fusão cêntrica e três fusões em tandem (ABRIL et al., 2010).

As fêmeas H1 e H4, ambas apresentaram cruzamentos entre um macho do citótipo Paraná e uma fêmea do citótipo Juína. A diferença entre os parentais (DAP) foi de 8 e 9 cromossomos, e os rearranjos envolvidos na diferenciação entre os dois citótipos são, uma inversão pericêntrica, uma fusão centrada e três fusões em tandem. Ambas se mostraram estéreis. A fêmea H2, apesar das diferenças entre os seus parentais envolver os mesmos rearranjos cromossômicos das fêmeas anteriores, foi resultante de um cruzamento inverso, onde o macho pertence ao citótipo Juína e a fêmea ao citótipo Paraná, obtendo uma DAP negativa (-8). Diferentemente das fêmeas H1 e H4, este animal apresentou apenas subfertilidade.

Outras duas fêmeas que apresentaram subfertilidade foram H3, com DAP = -6, resultante do cruzamento entre um macho do citótipo Juína e uma fêmea do citótipo Carajás, e a fêmea H6 (DAP= - 2), resultante do cruzamento entre um Macho do citótipo Rondônia e uma fêmea do citótipo Juína. A fêmea H3 foi a que apresentou maior número de rearranjos cromossômicos envolvidos na diferença entre os citótipos parentais, uma inversão pericêntrica, uma fusão cêntrica e quatro fusões em tandem. Já a fêmea H6 apresentou menor número de rearranjos entre os parentais sendo composto apenas por uma fusão em tandem. Ainda sim, ambas apresentaram subfertilidade.

O acúmulo de rearranjos cromossômicos leva a infertilidade por morte das células germinativas devido a falhas no pareamento meiótico (BHATIA & SHANKER, 1996; RIESENBERG, 2001; VILLAGÓMEZ & PINTON, 2008), provavelmente o que ocorreu nas fêmeas híbridas. Os rearranjos cromossômicos presentes, inversões pericêntricas, fusões cêntricas e fusões em tandem, estão em heterozigose e podem causar desbalanceamento cromossômico que leva à subfertilidade e esterilidade (WALSH, 1982; RIESENBERG, 2001).

Como observado na tabela 5, os valores reprodutivos diminuem conforme aumenta a diferença cromossômica entre os parentais. A diferença é ainda maior, quando o macho possui número cromossômico maior que a fêmea, o que leva a uma DAP (diferença entre os autossomos parentais) positiva. Isso ocorreu nos cruzamentos dos machos da linhagem B com as fêmeas da linhagem A, que produziram fêmeas praticamente estéreis (H1 e H4). Os cruzamentos inversos, machos da linhagem A com fêmeas da linhagem B apresentaram prole subfértil. A diferença de fertilidade entre os híbridos depende de qual espécie é o macho e qual é a fêmea, porém as duas proles apresentam diminuição de sua capacidade reprodutiva em relação às espécies puras (KOOPMAN, 1950; CHANDLEY et al., 1974), como observado neste trabalho.

Os resultados apresentados neste trabalho nos indicam subfertilidade/esterilidade das fêmeas híbridas e aparente fertilidade das fêmeas puras. Não restam dúvidas da existência de um mecanismo de isolamento reprodutivo entre os citótipos. Segundo a regra de Haldane, indivíduos de sexo heterogamético resultantes de hibridação são estéreis ou inviáveis, enquanto os indivíduos do sexo homogamético podem ser férteis, subférteis ou estéreis (ORR, 1997).

Aparentemente, pelos citótipos estarem isolados geograficamente (DUARTE & JORGE, 1996), a diferenciação cromossômica entre as populações ocorreu de forma alopátrica, como a grande maioria das especiações já descritas (SENE, 2009).

Na evolução cariotípica de cervídeos as frequências de mutações cromossômicas foram mais altas que em outros taxa, e somente os cruzamentos que causaram pequenos danos foram os que promoveram a fixação homozigota dos rearranjos cromossômicos, como no caso dos gêneros *Muntiacus* e *Mazama*, os quais apresentaram alta taxa de evolução cariotípica dentro da família Cervidae (NEITZEL, 1987). Para VILLENA & SAPIENZA (2001) a evolução cariotípica dos mamíferos ocorreu principalmente pela segregação não-aleatória. Segundo os autores, fatores que regulam a meiose da fêmea tem um papel na fixação de certos rearranjos cromossômicos. No caso dos *Mazama* os principais rearranjos

foram aqueles que reduziram o número diploide das populações como no caso das fusões cêntricas e em tandem, presentes em grande quantidade na diferenciação entre os citótipos de *M. americana* (FONTANA & RUNBINI, 1990).

Em 2008, DUARTE e colaboradores já haviam descrito a presença de uma distância genética entre os citótipos de *M. americana*, em que a separação das variantes teria ocorrido no final do Plioceno com isolamento dos indivíduos e posterior diversificação genética. ABRIL e colaboradores (2010) identificaram esta distância genética entre os citótipos e descreveram dois clados dividindo a espécie. O Clado A onde estão presentes os citótipos Rondônia, Juína, Jari, e o Clado B onde estão presentes os citótipos Paraná, Carajás. Apesar destas diferenças cromossômicas e genéticas, as populações mantiveram o mesmo fenótipo, podendo ser descritas então como espécies cripticas, que apesar de apresentarem mesmo fenótipo possuem alguma barreira reprodutiva entre elas (RIDLEY, 2006)

Análises genéticas diretas, ao longo da última década, têm mostrado conclusivamente que o isolamento pós-zigótico em animais é tipicamente causado por genes, não por grandes rearranjos cromossômicos (COYNE & ORR, 1998). ORR & PRESGRAVES (2000) revisaram as causas de especiação por isolamento pós-zigótico e encontraram fatores que podem levar a este tipo de isolamento entre duas espécies, todos eles ligados a fatores genéticos.

Todos os cruzamentos realizados entre as linhagens A e B apresentaram isolamento reprodutivo, portanto devem ser diferenciadas em espécies distintas. Uma vez que obtivemos poucos cruzamentos dentro das linhagens cromossômicas (uma fêmea H6), porém, ainda sim, a fêmea apresentou subfertilidade, podemos levantar a hipótese de que os citótipos presentes dentro das linhagens também possam ser subespécies.

7. CONCLUSÃO

As linhagens cariotípicas A e B da espécie *Mazama americana* devem ser diferenciadas em espécies distintas por apresentarem isolamento reprodutivo pós-zigótico.

Para diferenciar os citótipos em espécies ou mesmo subespécies das linhagens A e B, mais estudos devem ser realizados, uma vez que este trabalho apresentou apenas um cruzamento entre citótipos de mesma linhagem cromossômica.

8. REFERÊNCIAS

ABRIL, V. V.; CARNELOSSI, E. A. G.; GONZALES, S.; DUARTE J. M. B. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (*Artiodactyla; Cervidae*). **Cytogenetic and Genome Research**, v.128, p.177-187, 2010.

AKHVERDYAN, M; FREDGA, K. EM Studies of Female in Wood Lemmings With Different Sex Chromosome Constitutions. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, p. 504-516, 2001.

ALLEN, J. A. Notes on american deer of the genus *Mazama*. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist**, v. 34, p. 521-553, 1915.

ARIYARATNA, H. B. S.; GUNAWARDANA, V. K. Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. **Small Ruminant Research**, v. 26, p. 123-129, 1997.

ASHER, G. W.; O'NEILL, K. T.; SCOTT, I. C.; MOCKETT, B. G.; PEARSE, A. J. Genetic influences on reproduction of female red deer (*Cervus elaphus*) (2) Seasonal and genetic effects on the superovulatory response to exogenous FSH. **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 61-70, 2000.

BACHA, W. J.; BACHA, L. M. Sistema reprodutor feminino. In: BACHA, W. J.; BACHA, L. M. (ed). **Atlas colorido de histologia veterinária**. Tradução 2ª ed. Rocca, São Paulo, 2003, p. 355-389.

BAINBRIDGE, D. R. J.; CATT, S. L.; EVANS, G.; JABBOUR, H. N. Successful in vitro fertilization on in vivo matured oocytes aspirated laparoscopically from red deer hinds (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, v. 51, p. 891-898, 1999.

BENIRSCHKE, K.; SULLIVAN, M. Corporea Lutea in Proven Mules. **Fertility and Sterility**, v. 17, n. 1, p. 24-33, 1966.

BERG, D. K.; ASHER, G. W. New developments reproductive technologies in deer. **Theriogenology**, v. 59, p. 189-205, 2003.

BERLINGUER, F.; GONZÁLEZ, R.; SUCCU, S.; DEL OLMO, A.; GARDE, J. J.; ESPESO, G.; GOMENDIO, M.; LEDDA, S.; ROLDAN, E. R. S. *In vitro* oocyte maturation, fertilization and culture after ovum pick-up in na endangered gazelle (*Gazella dama mhorr*). **Theriogenology**, v. 69, p. 349-359, 2008.

BETTEGOWDA, A.; SMITH, G. W. Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 3713-3726, 2007.

BETTEGOWDA, A.; LEE, K.; SMITH, G. W. Cytoplasmic and nuclear determinations of the maternal-to-embryonic transition. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 45-53, 2008.

BHATIA, S.; SHANKER, V. Chromosome abnormalities em reproductively inefficient goats. **Small Ruminants Research**, v. 19, p. 155-159, 1996.

BODMER, R. E. Ecologia e conservação dos veados mateiro e catingueiro na Amazônia. In: Duarte, J. M. B. (ed.) **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus, Ozotoceros e Mazama***. FUNEP, Jaboticabal, 1997, p. 70-77.

BREEN, K. M.; BILLINGS, H. J.; WAGENMAKER, E. R.; WESSINGER, E. W.; KARSCH, F. J. Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 2107-2115, 2005.

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

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species**. 2nd ed. Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Manual, 2004, 93p.

CABRERA, A. **Catalogo de los mamiferos de America del Sur**. Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia, v. 4, p. 309-732, 1960.

CAPRIO, M.; FABBRINI, E.; ISIDORI, A. M.; AVERSA, A.; FABBRI, A. Leptin in reproduction. **TRENDS in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n. 2, p. 65-72, 2001.

CHANDLEY, A. C.; JONES, R. C.; DORR, H. M.; ALLEN, W. R.; SHORT, R. V. Meiose in interspecific equine hybrids. **Cytogenetic cell Genetic**, v. 13, p. 330-341, 1974.

CLOSE, R. L. e BELL, J. N. Fertile Hybrids in Two Genera of Wallabies: *Petrogale* and *Thylogale*. **The Journal of Heredity**, v. 88, n. 5, p. 393-397, 1997.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; COGNIÉ, Y.; CHAI, N.; LEGENDRE, X.; MUGET, R. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and sika deer (*Cervus nippon*). **Theriogenology**, v. 55, p. 649-659, 2001.

COYNE, J. A.; ORR, H. A. The evolutionary genetics of speciation. **Phil.Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 353, p. 287-305, 1998.

CUI, Y.; YU, S. J. Ovarian Morphology and follicular Systems in Yaks of Different Ages, **The Veterinary Journal**, v. 157, p. 197-205, 1999.

CZERNAY, S. Spiesshirsche und Pudus. **Die Neue Brehm Bucherei**, v. 581, p. 1-84, 1987.

DOBIGNY, G.; ANISKIN, V.; VOLOBOUEV, V. Explosive chromosome evolution and speciation in gerbil genus *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): a case of two new cryptic species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 96, p. 117-124, 2002.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 743-752, 2000.

DOBZHANSKY, T. Genetics of the evolutionary process. 1970. In: RIDLEY, M. **Evolução**. 3ª edição, Porto Alegre: ATMED-RS, 2006, 752 p.

DUARTE, J. M. B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. 1992. Não paginado. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1992.

DUARTE, J. M. B.; GARCIA J. M. Tecnologia da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção In: Duarte J. M. B. (ed.) **Biologia e conservação de cervídeos sul americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Jaboticabal: Funep, 1997, p 228-238.

DUARTE, J. M. B. e JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several population of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 45, p. 281-287, 1996.

DUARTE, J. M. B. e MERINO, M. L. Taxonomia e Evolução. In: Duarte, J. M. B. (ed) **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. FUNEP, Jaboticabal, 1997, p. 1-21.

DUARTE, J. M. B.; SUSANA GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p.17–22, 2008.

EISEMBERG, J. F. **Mammals of the neotropics**. Vol. I. University of Chicago Press, Chicago, 1989, 449p.

ELDRIDGE, M. D. B.; WILSON, A. C. C.; METCALFE, C. J.; DOLLIN, A. E.; BELL, J. N.; JOHNSON, P. M.; JOHNSTON, P. G.; CLOSE, R. L. Taxonomy of rock-wallabies, *Petrogale* (Marsupialia: Macropodidae). III Molecular data confirms the species status of the purple-necked rock-wallaby (*Petrogale purpureicollis* Le Souef), **Australian Journal of Zoology**, v. 49, p. 323-343, 2001.

EMMONS, L. H. **Neotropical rainforest mammals, a field guide**. University of Chicago Press, Chicago, 1990, 281 p.

FERRARI, C. A.; PAVIOLO, A.; DI BLANCO, Y.; DE ANGELO, C.; DI BITETTI, M. S. Abundancia, uso del habitat y patrones de actividad del venado pardo (*Mazama americana*) y la poca (*Mazama nana*) em la selva Paranaence. **Proceeding of XX Jornadas Argentinas de Mastozoologia, SAREM**, Buenos Aires, 2005.

FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **Biosystems**, Amsterdam, v.34, p. 157-174, 1990.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2ªed, Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002, 631 p.

GAVA, A.; FREITAS, T. R. O. Inter and intra-specific hybridization in tuco-tuco (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). **Genetica**, Netherlands, v. 119, p. 11-17, 2003.

GARCIA, M. R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H.; NIZIELSKI, S. E.; WILLIAMS, G. L. Serum leptin and its adipose genes expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2158-2167, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L. MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F (ed). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Varela, São Paulo, p 195-226, 2001.

GONZÁLES, R. R.; SÍMON, C.; CABALLERO-CAMPO, P.; NORMAN, R.; CHARDONNENS, D.; DEVOTO L.; BISCHOF, P. Leptin and reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 3, p. 290-300, 2000.

GRAFT, K. J.; MEINTJES, M.; DYER, V. W.; PAUL, J. B.; DENNISTON, R. S.; ZIMOMEK, C.; GODKE, R. A. Transvaginal Ultrasound-guide Oocyte Retrieval Following FSH Stimulation of Domestical Goats. **Theriogenology**, v. 51, p.1099-1119, 1999.

GRAHAM, L. H.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestagens in feces and serum. **Zoo Biology**, New York, v. 20, p. 227-236, 2001.

HALDANE, J. B. S. 1922. IN: ORR, H. A. Haldane's Rule. **Annual Reviews Ecol. Syst.**, v. 28, p. 195-218, 1997.

HANADA, H.; GESHI, M.; SUZUKI, O. Additional evidence of the formation of unbalanced embryos in cattle with the 7/21 Robertsonian translocation. **Theriogenology**, v. 44, p. 499-505, 1995.

HIRATA, S.; MORI, Y. Monitoring reproductive status by fecal progesterone analysis in ruminants. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 5, p. 845-50, 1995.

IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 21 January 2011.

JORGE, W. e BENIRSCHKE, K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the Red Brocket Deer, *Mazama americana temama* (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable non-robertsonian translocation. **Cytologia**, v. 42, p. 711-721, 1977.

JUNQUEIRA, J. F. D. Veados do Brasil. **Chácaras e Quintais**, São Paulo, v. 62, p. 330-331, 1940.

KENNEDY, G. C.; MITRA, J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. **The Journal of Physiology**, v. 166, p. 408-418, 1963.

KIESS, W.; BLUM, W. F.; AUBERT, M. Leptin, puberty and reproductive function: lessons from animal studies and observations in humans. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, p. 26-29, 1998.

KING, M. **Species Evolution: The Role of Chromosome Changes**, Cambridge, Cambridge University Press, 1993.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro (1979). In: Gonçalves, P. B.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J.

F. (ed.) **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Varela, São Paulo, 2002, 340p.

KOOPMAN, K. F. Natural Selection for Reproductive Isolation Between *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. **Evolution**, v. 4, n. 2, p. 135-148, 1950.

LOCATELLI, Y.; COGNÉ, Y.; VALLET, J. C.; BARIL, G.; VERDIER, M.; POULIN, N.; LEGENDRE, X.; MERMILLOD, P. Successful use of oviduct epithelial cell coculture for in vitro production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos. **Theriogenology**, v. 64, p. 1729-1739, 2005.

MALONE, J. H. e MICHALAK, P. Physiological Sex Predicts Hybrid Sterility Regardless of Genotype. **Science**, v. 319, p. 59, 2008.

MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Intercellular Communication in the Mammalian Ovary: Oocytes Carry the Conversation. **Science**, v. 296, p. 2178-2180, 2002.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, p. 87-96, 2000.

MOBERG, G. P. How behavioral reproduction in stress disrupts the endocrine control of domestic Animals. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 1, p. 304-411, 1991.

MOLTENI, L.; MACCHI-GIOVANNI DE, A.; SUCCI, G.; CREMONESI, F.; STACCHEZZINI, S.; MEO DI, G. P.; IANNUZZI, L. A new centric fusion translocation in cattle: rob (13;19). **Hereditas**, v. 129; p. 177-180, 1998.

NEITZEL H. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In: Obe, G.; Basler, A. (Ed.). **Cytogenetics, Basic and applied aspects**. Springer Verlag, Berlin, 1987, p. 90-112.

NOTHIAS, J.; MAJUMDER, S.; KANEKO, K. J.; DEPAMPHILIS, M. L. Regulation of gene expression at the beginning of Mammalian development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 22, p. 22077-22080, 1995.

ORLOG, C. C.; LUCERO, M. M. **Guia de los Mamiferos Argentinos**. Tucuman, Argentina, 1981, 151p.

ORR, H. A. Haldane's Rule. **Annual Reviews Ecol. Syst.**, v. 28, p. 195-218, 1997.

ORR, H. A.; PRESGRAVES, D. C. Speciation by postzygotic isolation: forces, genes and molecules. **BioEssays**, v. 22, p. 1085-1094, 2000

PEREIRA, R. J. G.; POLEGATO, B. F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J. A.; DUARTE, J. M. B. Monitoring Ovarian Cycles and Pregnancy in Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*) by Measurement of Fecal Progesterone Metabolites. **Theriogenology**, v. 65, p. 387-399, 2006.

PEREIRA, R. J. G. Male Reproduction. IN: DUARTE, J. M. B. & GONZÁLES, S. (ed.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, Jaboticabal, FUNEP, 2010, p 39-50.

PICKARD, A. R.; ABÁIGAR, T.; GREEN, D. I.; HOLT, W. V.; CANO, M. Hormonal characterization of the reproductive cycle and pregnancy in the female Mohor gazelle (*Gazella dama mhorri*) **Reproduction** , v. 122, p. 571–580, 2001.

POLEGATO, B. F. **Validação de método endócrino não invasivo para monitoramento da fisiologia reprodutiva e da atividade dos glicocorticóides**

em cervídeos neotropicais. 2004. 43p. Trabalho de iniciação científica apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, para graduação em Medicina Veterinária, 2004.

RIDLEY, M. **Evolução.** 3ª edição, Porto Alegre: ATMED-RS, 2006, 752 p.

RIESEBERG, L. Chromosomal rearrangements and speciation. **TRENDS in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 7, p. 351-358, 2001.

RIVERO, K.; RUMIZ, D. I.; TABER, A. B. Diferencial habitat use by two sympatric brocket deer species (*Mazama americana* and *M. gouazoubira*) in a seasonal Chiquiato forest of Bolivia. **Mammalia**, Paris, v.69, p. 169-183, 2005.

RONG, R.; CHANDLEY, A. C.; SONG, J.; MCBEATH, S.; TAN, P. P.; BAI, Q. e SPEED, R. M. A fertile mule and hinny in China. **Cytogenetic cell Genetic**, v. 47, p. 134-139, 1988.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de *Mazama* Ranfinesque, 1817 do Brasil (*Artiodactyla*, *Cervidae*).** 2000. 147 p. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, 2000.

SARRIA-PEREA, J. A. **Comparação entre alguns citótipos de *Mazama americana* (*Artiodactyla*; *Cervidae*): quão grande é a diferença entre eles.** 2004. 41p. Dissertação de Mestrado. UNESP, Jaboticabal, 2004.

SCHWARTZ, C.C.; MONFORT, S. L.; DENNIS, P. H.; HUNDERTMARK, K. J. Fecal Progesterone Concentration as an Indicator of the Estrous Cycle and Pregnancy in Moose. **The Journal of Wildlife Management**, v. 59, n. 3, p. 580-583, 1995.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R.; BAMBERG, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 515-526, 1996.

SADLEIR, R. M. F. S. Reproduction of Female Cervids. IN: WEMME, C. M. (ed). **Biology and Management of the Cervidae**, Smithsonian Institution Press, Washington D.C., 1987, p. 123-144.

SCHMUTZ, S. M.; MOKER J. S.; PAWLYSHYN, V.; HAUGEN, B.; CLARK, E. G. Fertility effects of the 14;20 Robertsonian translocation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 815-823, 1997.

STENBAK, T. K.; REDMER, D. A.; BERGINSKI, H. R.; ERICKSON, A. S.; NAVANUKRAW, C.; TOUTGES, M. J.; BILSKI, J. J.; KIRSCH, J. D.; KRAFT, K. C.; REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T. Effects of follicles stimulating hormone (FSH) on follicular development, oocyte retrieval, and in vitro fertilization (IVF) in ewes during breeding seasonal anestrus. **Theriogenology**, v. 56, p. 51-61, 2001.

SCHWARZENBERGER, F.; RIETSCHER, W.; VAHALA, J.; HOLECKOVA, D.; THOMAS, P.; MALTZAN, J.; BAUMGARTNER, K.; SCHAFTENAAR, W. Fecal Progesterone, Estrogen, and Androgen Metabolites for Noninvasive Monitoring of Reproductive Function in the Female Indian Rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, p. 300-307, 2000.

SENE, F. M. **Cada Caso, Um Caso... Puro Acaso: Os processos de evolução biológica dos seres vivos**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 2009, 236 p.

SETTERFIELD, L. A.; MAHADEVIAH, S.; MITTWOCH, U. Chromosome pairing and germ cell loss in male and female Mice carrying a reciprocal translocation. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 82, p. 369-379, 1988.

SHIMIZU, K. Studies on Reproductive Endocrinology in Non-human Primates: Application of Non-invasive Methods. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 1-13, 2005.

SWITONSK M., STRANZINGER G. Studies of Synaptonemal Complexes in Farm Mammals – A Review. **The American Genetic Association**, v. 89, p. 473-480, 1998.

TAYLOR, M. J.; SHORT, R.V. Development of Germ Cells in the Ovary of the Mule and Hinny. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 32, p. 441-445, 1973.

VARELA, D. M.; TROVATI, R. G.; GUZMÁN, K. R.; ROSSI, R. V.; DUARTE, J. M. B. Red Brocket Deer *Mazama americana* (Erxleben 1777). In: DUARTE, J. M. B. & GONZÁLES, S. (ed.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, Jaboticabal, FUNEP, 2010, p 151-159.

VILLAGÓMEZ, D. A. F.; PINTON, A. Chromosomal Abnormalities, Meiotic Behavior and Fertility in Domestic Animals. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, p. 69-80, 2008.

VILLENA, F. P.; SAPIENZA, C. Female Meiosis Drives Karyotypic Evolution in Mammals. **Genetics**, v. 159, p. 1179-1189, 2001

VOGLIOTTI, A. **História natural de mazama bororo (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e radio-telemetria**. 2004. 99p. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

WEMME, C. M. (ed) **Biology and Management of the Cervidae**, Smithsonian Institution Press, Washington D.C., 1987, 577p.

WALSH, J. B. Rate of Accumulation of Reproductive Isolation by Chromosome Rearrangements. **The American Naturalist**, v. 120, n. 4, p. 510-532, 1982.

WASSER, S. K.; VELLOSO, A. L.; RODDEN, M. D. Using Fecal Steroids to Evaluate Reproductive Function in Female Maned Wolves. **The Journal of Wildlife Management**, v. 59, n. 4, p. 889-894, 1995.

WEST, J. D. FRELS, W. I.; CHAPMAN, V. M. *Mus musculus* x *Mus caroli* hybrids: mouse mules. **Journal of Heredity**, v. 69, p. 321-326, 1978.

WHITE, M. J. D. **Os Cromossomos**. Cia. Editora Nacional, São Paulo, 1977, 196p.

YAMAUCHI, K.; HAMASAKI, S.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Assessment of Reproductive Status of Sika Deer by Fecal Steroid Analysis. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, n. 3, p. 221-226, 1997.

ZANETTI, E. S. **Comparação de dois métodos para sincronização do ciclo estral em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)**, 2006, 54p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2006.

ZANETTI, E. S. **Protocolos De Superovulação Em Veado-Catingueiro (*Mazama gouazoubira*)**, 2010, 112p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2010.

ANEXOS

Anexo I. Tabela - Protocolo de Preparo de Lâminas Histológicas.

Procedimento	Soluções	Tempo
Fixação	Bouim.	24 horas
Lavagem	Álcool 70% + Hidróxido de Amônio (10 gotas / 100mL).	
Desidratação	Álcool 70% , Álcool 80%, Álcool 90% e Álcool 95%, Álcool absoluto I, Álcool absoluto II, Álcool absoluto III.	30 minutos em cada solução
Diafanização	Álcool absoluto + Xilol (1:1), Xilol I, Xilol II e Xilol III.	30 minutos em cada solução
Infiltração	Xilol + Histosec (1:3)	30 minutos
	Histosec I e Histosec II	1 hora em cada solução
Inclusão	Histosec	
Fixação dos cortes nas lâminas	Glicerina – albumina (1:1).	

Anexo II. Tabela - Protocolo para coloração Hematoxilina – Eosina.

Procedimento	Soluções	Tempo
Desparafinização	Xilol I e Xilol II	5 minutos em cada solução
Hidratação	Álcool absoluto I, Álcool absoluto II e Álcool 70%	5 minutos em cada solução
	Água corrente	5 minutos
	Água destilada	1 minuto
Coloração	Hematoxilina de Harris	1 minuto
	Água corrente	5 minutos
	Água destilada	1 minuto
	Eosina de Lyson	30 segundos
	Água destilada	Banho rápido
Desidratação	Álcool 70% - HE e Álcool 95% - HE	Banho rápido em cada solução
	Álcool absoluto I, Álcool absoluto II e Álcool absoluto III	5 minutos em cada solução
Diafanização	Xilol I, Xilol II e Xilol III	5 minutos em cada solução
Montagem da lâmina	Entelan	

Anexo III. Tabela - Protocolo para coloração Tricrômico de Masson.

Procedimento	Soluções	Tempo
Desparafinização	Xilol I e Xilol II	5 minutos em cada solução
Hidratação	Álcool absoluto I, Álcool absoluto II e Álcool 70%	5 minutos em cada solução
Coloração	Água corrente	5 minutos
	Água destilada	1 minuto
	Hematoxilina de Harris	1 minuto
	Água corrente	5 minutos
	Água destilada	1 minuto
	Fucsina Ponceau	1 minuto
Desidratação	Água destilada	Retirar excesso da solução anterior
	Ácido fosfomolibdico 1%	5 minutos
	Água destilada	Retirar excesso da solução anterior
	Álcool 95%	Banho rápido em cada solução
Diafanização	Álcool absoluto I, Álcool absoluto II e Álcool absoluto III	5 minutos em cada solução
	Xilol I, Xilol II e Xilol III	5 minutos em cada solução
Montagem da lâmina	Bálsamo do Canadá	

Anexo IV. Tabela- Protocolo de Produção in vitro de embriões.

Procedimentos	Meios	Culturas
Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	TCM-199 Bicarbonato + 10% Soro de ovelha em estro (SOE) + Sulfato de Amicacina 500mg + FSH + LH	24 horas em estufa úmida a 38°C e 5% de CO ₂ em ar atmosférico
Capacitação dos Espermatozoides	Gradiente Percol (TL-Sêmen + Percoll 90%+ Percoll 45%)	
Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	TL-Stock + Sulfato de Amicacina 500mg + Piruvato + PHE + Heparina (176UI/mg) + SOE	24 a 26 horas em estufa úmida a 38°C e 5% de CO ₂ em ar atmosférico
Desenvolvimento e Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	Meio SOF + SFB 2,5% + BSA 5 mg/mL Troca de 50% do meio a cada 2 dias	7 dias em estufa úmida a 38°C e 5% de CO ₂ em ar atmosférico

Anexo V. Tabela - Descrição das estruturas ovarianas observadas nos cortes histológicos

Estrutura Ovariana	Descrição das Características histológicas
Folículo primordial	oócito circundado por uma camada de células achatadas
Folículo primário	oócito circundado por uma camada de células cubóides
Folículo multilaminar primário	oócito circundado por mais de uma camada de células cubóides
Folículo secundário	início da formação do antro folicular
Folículo terciário	presença de antro folicular já desenvolvido
Folículo atrésico	zona pelúcida inchada e teca interna hipertrofiada – corada de azul pelo Tricrômico de Masson
Corpo lúteo	presença de células luteínicas
Corpo albicans	tecido cicatricial – corado em verde/azul pelo Tricrômico de Masson

(BACHA & BACHA, 2003)