

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**EFEITO DA OCITOCINA E CLOPROSTENOL NOS
PARÂMETROS SEMINAIS DE VEADO-MATEIRO-DO-SUL
(*Mazama rufa*) AO LONGO DO PROCEDIMENTO DE
ELETROEJACULAÇÃO**

Cláudia Maria Herédias Ribas
Médica Veterinária

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**EFEITO DA OCITOCINA E CLOPROSTENOL NOS
PARÂMETROS SEMINAIS DE VEADO-MATEIRO-DO-SUL
(*Mazama rufa*) AO LONGO DO PROCEDIMENTO DE
ELETROEJACULAÇÃO**

Discente: Cláudia Maria Herédias Ribas

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 a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área Reprodução Animal.

2020

H542e	<p>Herédias-Ribas, Cláudia Maria</p> <p>Efeito da ocitocina e cloprostenol nos parâmetros seminais de veado-mateiro-do-sul (<i>Mazama rufa</i>) ao longo do procedimento de eletroejaculação / Cláudia Maria Herédias-Ribas. -- Jaboticabal, 2020 63 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: José Mauricio Barbanti Duarte</p> <p>1. Cervidae. 2. Veado-mateiro-do-sul. 3. Biotecnologias reprodutivas. 4. Colheita de sêmen. 5. Estimulação hormonal. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA OCITOCINA E CLOPROSTENOL NOS PARÂMETROS SEMINAIS DE VEADO-MATEIRO-DO-SUL (*Mazama rufa*) AO LONGO DO PROCEDIMENTO DE ELETROEJACULAÇÃO

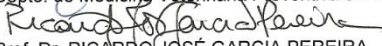
AUTORA: CLÁUDIA MARIA HEREDIAS RIBAS

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. RICARDO JOSÉ GARCIA PEREIRA
Departamento de Reprodução Animal-FMVZ/USP / São Paulo/SP

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CLÁUDIA MARIA HERÉDIAS RIBAS – Nascida no dia 22 de março de 1983 na cidade de São Caetano do Sul, SP. Filha de Maria Francisca Herédias Ribas e Afonso Sebastião Ribas. Em fevereiro de 2006 recebeu o título de bacharel e licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Metodista de São Paulo (UMESP) com a apresentação da monografia intitulada “Ecologia reprodutiva e dimorfismo sexual de *Phalotris mertensi* (Serpente: Colubridae)” realizada no Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, instituição essa que permaneceu vinculada até maio de 2008. Em maio de 2008 foi contratada como bióloga da empresa de consultoria Wildlife Management (WLM) para quem prestou serviços na área de levantamento, manejo, monitoramento e captura de fauna até dezembro de 2011. Em março de 2012 ingressou no curso de Medicina Veterinária, modalidade bacharelado da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal. Em julho de 2013 participou do Programa de Treinamento Técnico do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) onde realizou a iniciação científica “Validação Fisiológica de Ensaio Imunoenzimáticos para dosagem de cortisol e seus metabólitos fecais em Cervídeos Neotropicais”, sendo bolsista FAPESP sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte com parte das atividades realizadas na University of Veterinary Medicine, Vienna – Áustria, pelo programa de Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (BEPE) sob supervisão do Prof. Dr. Rupert Palme. Em fevereiro de 2018 recebeu o título de bacharel em Medicina Veterinária e em março de 2018 ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área Reprodução Animal, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e vice representante discente no Conselho do Programa de Pós-graduação nas gestões 2018-2019 e 2019-2020. Em outubro de 2018 realizou apresentação oral do trabalho “Efeito de ocitocina e cloprostenol sobre a qualidade seminal do veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*)” durante o XXVIII Encontro e XXII Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens (ABRAVAS) pela qual recebeu o prêmio “Alcides Picinatti” de melhor trabalho na categoria profissional.

“Não é o erro; é a correção do erro que ensina.”

Mario Sérgio Cortela

Dedico

Aos meus pais Afonso e Maria Francisca e aos meus irmãos Celso e Bruno pelo carinho, esforço e dedicação para que meus sonhos sejam realizados.

Aos animais submetidos ao cativeiro e à pesquisa em nome da conservação dos cervídeos, em especial ao Chico, Hulk, Marquinhos e Temer, animais utilizados nesse estudo. À vocês o meu respeito e agradecimento.

AGRADECIMENTOS

As pessoas aqui citadas são aquelas a quem eu agradeço por acreditarem em mim, por todo apoio e companhia durante todos esses anos.

A Deus, por iluminar meus passos durante essa jornada.

Aos meus pais, Afonso e Maria Francisca por nunca pouparem esforços para que meus sonhos fossem realizados. Vocês fizeram a pessoa que sou hoje e por vocês e para vocês tento todos os dias ser uma pessoa melhor. Amo vocês.

Aos meus irmãos Celso Henrique e Bruno Daniel por simplesmente serem vocês e tornarem tudo mais divertido.

À minha cunhada Alcilene por entender a dedicação do meu irmão comigo, por todos os encontros no “sushi” e por me dar meus sobrinhos queridos. Malu e Artur, titia ama vocês.

Aos meus avôs (*in memoriam*) Luiz, João, Catarina e Francisca. Vocês sempre foram exemplos para mim. Queria poder compartilhar com vocês a realização desse sonho, pois vocês sempre me incentivaram para que ele fosse realizado e sempre me inspiraram a ser uma pessoa melhor. Amo vocês e sinto falta de vocês todos os dias.

À Família Ribas. Aos meus tios (*in memoriam*), tias e primos. Obrigada por todos os momentos e por serem minhas lembranças mais queridas.

Ao Prof. José Maurício Barbanti Duarte pela orientação, dedicação e paciência. O senhor é um exemplo pela paixão e dedicação a conservação de cervídeos.

À Profa. Lindsay Gimenes Unos, Profa. Maria Emília Franco Oliveira, Prof. Marcelo Roncoleta, Prof. Joaquim Mansano Garcia e Prof. Ricardo José Garcia Pereira pelas sugestões aos manuscritos de qualificação e na dissertação. Tenho certeza que a contribuição de vocês fez toda a diferença.

Ao Prof. Alan Rodrigo Panosso pela ajuda na análise estatística.

Aos meus amigos Nupeccianos de todas as “gerações”, obrigada por todas as risadas, cafés e aprendizados. Eu cresci e continuo crescendo com vocês. Vocês são exemplos de dedicação à uma causa maior que é a conservação dos cervídeos neotropicais. Me orgulho de ter feito parte dessa equipe. Hoje me despeço do convívio diário, mas vocês estarão sempre comigo. Tenho certeza que sentirei saudades.

À Fernanda, minha amiga que é um pouco de tudo, de irmã a orientadora. Você viu nascer meu sonho de ser veterinária e foi uma das minhas maiores incentivadoras, sempre me mostrando como ser uma pessoa melhor. Hoje estamos longe, mas nossa amizade não tem limites e nem fronteiras. Obrigada por tudo!

À minha amiga Thaís “Tieta” que sempre me apoio e ficou do meu lado quando tive que tomar grandes decisões acadêmicas. Você se tornou um grande exemplo de garra e superação. Nossa amizade também não tem fronteiras e nem limite de “aldos”.

À Dália que foi uma grande surpresa durante a realização desse mestrado. Nossa amizade foi crescendo a cada dia e hoje você é uma das minhas amigas mais queridas. Obrigada pela companhia durante os almoços e por me fazer rir até “doer a barriga”. Quero te levar para sempre comigo.

Aos meus amigos de “Rolês Aleatórios”, Ana Maria, Cinara, Jardel, Bel, Bal, Ponto, Fito, Tobias e Cléo. Vocês foram peça fundamental para minha saúde mental. Nossa amizade se fortaleceu e vocês se tornaram a minha família em Jaboticabal. É para vocês que eu corro quando preciso de ajuda e é com vocês que quero compartilhar minhas conquistas. Amo vocês. Agradeço em especial a Ana Maria por se tornado minha irmã colombiana e Cinara, *roommate* que me aguenta todos os dias apesar do meu mau humor matutino.

Aos meus amigos da Vet 12 e aos meus amigos da Bio. Podemos ter passado na vida de muitos, mas vocês estarão sempre na minha.

Agradeço em especial às “Flores” Mariana, Juliana, Fabiola, Priscila e minhas sobrinhas do coração Luna, Jana, Manuela, Cora e Maria. Vocês realmente são as flores mais perfumadas e preciosas do meu jardim!

A FCAV-Unesp e todos os professores que me acompanharam durante a graduação e pós-graduação. Vocês foram verdadeiros mestres e grande exemplo de profissionais. Tenho orgulho de ser aluna desta instituição, com certeza escolhi a melhor.

Ao Diego Mafra por toda a paciência!

À Priscila Fioresi por me escutar e me ajudar nos momentos mais difíceis.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

SUMÁRIO

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	iii
LISTA DE FIGURAS	v
EFEITO DA OCITOCINA E CLOPROSTENOL NOS PARAMETROS SEMINAIS DE VEADO-MATEIRO-DO-SUL (<i>Mazama rufa</i>) AO LONGO DO PROCEDIMENTO DE ELETROEJACULAÇÃO	7
RESUMO	7
Palavras-chaves	7
EFFECT OF OXYTOCIN AND CLOPROSTENOL IN SEMINAL PARAMETRES OF SOUTHERN RED BROCKET DEER (<i>Mazama rufa</i>) DURING ELETROEJACULATION PROCEDURE.....	8
ABSTRACT	8
Key Words	8
CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. O veado-mateiro-do-sul (<i>Mazama rufa</i>).....	13
2.2. Banco de germoplasma como ferramenta para a conservação de animais selvagens	18
2.2.1.Colheita de sêmen	23
2.3. Ocitocina.....	25
2.4. Prostaglandina	28
3. LITERATURA CITADA	31
CAPÍTULO 2 – “Efeito da Ocitocina e Cloprostenol nos parâmetros seminais de veado-mateiro-do-sul (<i>Mazama rufa</i>) ao longo do procedimento de eletroejaculação”	40
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1. Animais.....	43
2.2. Procedimentos gerais	43
2.3. Tratamento hormonal.....	44

2.4. Avaliação espermática	45
2.5. Análise dos dados	46
3. RESULTADOS	47
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÃO	52
6. AGRADECIMENTOS.....	52
7. LITERATURA CITADA.....	53

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Efeito de ocitocina e cloprostenol sobre o tempo para eletroejaculação, concentração de cortisol e qualidade seminal em veado-mateiro (*Mazama americana*)**", protocolo nº 004620/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de abril de 2018.

Vigência do Projeto	13/04/2018 a 05/05/2020
Espécie / Linhagem	Veado-mateiro / <i>Mazama americana</i>
Nº de animais	04
Peso / Idade	30 a 40Kg / 01 a 08 anos
Sexo	Machos
Origem	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE

Jaboticabal, 19 de abril de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "Efeito da ocitocina e cloprostenol sobre o tempo para eletroejaculação, concentração de cortisol e qualidade seminal em veado-mateiro (*Mazama americana*)", sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e Certificado CEUA protocolo nº 004620/18, aprovado em reunião extraordinária em 19 de abril de 2018, teve o título alterado para **"Efeito de ocitocina e cloprostenol sobre a qualidade seminal e concentração sérica de cortisol em veado-mateiro (*Mazama rufa*)"**, com aprovação na reunião extraordinária de 14 de fevereiro de 2019.

Jaboticabal, 14 de fevereiro de 2019.

Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Mapa da distribuição geográfica da espécie *Mazama americana* (veado-mateiro) segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN; 2019 modificado) contendo a informação de distribuição dos seis citótipos apresentados por Abril e colaboradores (2010) e com a localidade do neótipo de *M. rufa* coletado e descrito por Luduvério (2018; estrela branca). Sendo: quadrado azul escuro = citótipo Jarí; quadrado azul claro = citótipo Juína; quadrado verde = citótipo Rondônia; quadrado rosa = citótipo Carajás; quadrado vermelho = citótipo Paraná.15
- Figura 2.** Indivíduo macho da espécie *Mazama rufa* (vado-mateiro-de-sul) alojados no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE - UNESP/Jaboticabal). Fotos Bianca Ferrari.....17
- Figura 3.** Indivíduo fêmea com filhote de poucos dias da espécie *Mazama rufa* (vado-mateiro-de-sul) alojados no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE - UNESP/Jaboticabal). Fotos Bianca Ferrari.....18
- Figura 4.** Representação do desenvolvimento e aplicação de biotecnologia reprodutiva para uso de conservação de animais selvagens (BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998 modificado)20
- Figura 5.** Papel da criação de banco de germoplasma como estratégia de conservação ex situ de espécies ameaçadas (ZOMKUS; HASSAPAKIS; HOUCK, 2018 adaptado).21
- Figura 6.** Visão geral das funções parácrinas e autócrinas da ocitocina nos testículos, epidídimo e próstata (THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006; modificado).....27

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Representação gráfica da avaliação espermática média de diferentes ejaculados de veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*) colhido por meio de eletroejaculação sob efeito de cloprostenol (PGF2 α), ocitocina, associação de ocitocina e cloprostenol ou solução fisiológica (tratamento controle) Sendo: Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos quanto ao ejaculado como todo.....48
- Figura 2.** Representação gráfica da avaliação seminal de diferentes ejaculados de veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*) colhido por meio de eletroejaculação sob efeito de cloprostenol (PGF2 α), ocitocina, associação de ocitocina e cloprostenol ou solução

fisiológica (tratamento controle). Sendo: **T0**= ejaculado obtido antes dos procedimento de eletroejaculação; **C1**= ejaculado obtido depois do primeiro ciclo de eletroejaculação; **C2**= ejaculado obtido depois do segundo ciclo de eletroejaculação; **C3**= ejaculado obtido depois do terceiro ciclo de eletroejaculação. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos quanto ao ejaculado como todo ou individualmente e letras maiúsculas indicam diferenças entre os ejaculados dentro de um mesmo tratamento.....49

EFEITO DA OCITOCINA E CLOPROSTENOL NOS PARAMETROS SEMINAIS DE VEADO-MATEIRO-DO-SUL (*Mazama rufa*) AO LONGO DO PROCEDIMENTO DE ELETROEJACULAÇÃO

RESUMO – O veado-mateiro (*Mazama americana*) é uma espécie de cervídeo neotropical com ampla distribuição classificado como Dados Deficientes pela IUCN. Essa classificação se dá pelo fato da espécie possuir inconsistência taxonômica que inviabiliza a aplicação dos protocolos utilizados para categorizar as espécies em categorias de ameaça. Estudos morfológicos, moleculares e citogenéticos demonstraram que se trata de um complexo de espécies que possuem características morfológicas semelhante, demonstrando a existência de seis citótipos para a espécie. A partir de material coletado na localidade tipo da espécie (Caiena – Guiana Francesa) e de material coletado próximo localidade tipo de *M. rufa* (Foz do Iguaçu, PR) ficou comprovado que o citotipo “Paraná” é na verdade a espécie de veado-mateiro-do-sul (*M. rufa*) descrito por Illiger em 1811. O veado-mateiro-do-sul ainda não foi classificado devido a sua redescritção recente (2018), porém acredita-se que este esteja vulnerável. Sendo assim, se faz prioritário o estabelecimento de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* para a espécie, destacando a formação de banco de germoplasma. A colheita de sêmen pode ser feita por diferentes técnicas, porém para cervídeos as técnicas mais utilizadas são a colheita por vagina artificial e a eletroejaculação. Na colheita por eletroejaculação, o animal deve estar contido quimicamente e recebe estímulos elétricos nas glândulas acessórias que irão promover a ejaculação. A desvantagem da técnica sêmen colhido é mais diluído devido a maior secreção de plasma seminal, mas apresenta a vantagem de poder coletar material de animal cativo e de vida livre sem a necessidade que o mesmo apresente libido. Com a finalidade de se minimizar os efeitos deletérios da técnica, tem se associado o uso de protocolos hormonais utilizando ocitocina e cloprostenol (prostaglandina F₂α sintética) aumentando o volume e concentração seminal, além de diminuir o tempo e número de estímulos necessário para a eletroejaculação devido a sua ação favorecendo a contração de musculo liso dos túbulos seminíferos e epididimo. Assim, no presente trabalho o objetivo foi avaliar se protocolos utilizando ocitocina e cloprostenol (associados ou não) podem aumentar o volume e concentração hormonal de *M. rufa* ao longo do procedimento de eletroejaculação sem que houvesse a alteração de parâmetros de avaliação seminal. Ficou demonstrado que não houve aumento significativo no volume e concentração espermática entre os tratamentos realizados. O tratamento em que utilizou apenas cloprostenol apresentou os piores resultados, sendo este não indicado para a colheita de sêmen de *M. rufa*.

Palavras-chaves: Cervidae, veado-mateiro-do-sul, biotecnologias reprodutivas, colheita de sêmen, estimulação hormonal.

**EFFECT OF OXYTOCIN AND CLOPROSTENOL IN SEMINAL PARAMETRES OF
SOUTHERN RED BROCKET DEER (*Mazama rufa*) DURING
ELETROEJACULATION PROCEDURE**

ABSTRACT – The Red Brocket deer (*Mazama americana*) is a neotropical deer species with large distribution, and taxonomic inconsistency so is classified as Data Deficient by IUCN. Because of this, it is impossible to apply the protocols used to categorize the species into threat categories. Morphological, molecular and cytogenetic studies have shown that it is a complex of species that have similar morphological characteristics, demonstrating the existence of six cytotypes for the species. From material collected in the type locality of the species (Cayenne - French Guiana) and material collected near the type locality of *M. rufa* (Foz do Iguaçu, PR), it was proven that the cytotype “Paraná” is actually the species of Southern Red Brocket deer (*M. rufa*) described by Illiger in 1811. Southern Red Brocket deer has not yet been classified due to its recent redescription (2018), but it is believed to be vulnerable. Therefore, it is a priority to establish *in situ* and *ex situ* conservation strategies for the species, highlighting the formation of a germplasm bank. Semen collection can be done by different techniques, but for deer, the most used techniques are artificial vagina collection and electroejaculation. With electroejaculation, the animal must be chemically contained and receive electrical stimuli in the accessory glands that will promote ejaculation. The disadvantage of this technique is more diluted semen due to greater secretion of seminal plasma, but it is useful to collect material from captive and wild life animals without the need for it to show libido. In order to minimize the deleterious effects of the technique, the use of hormonal protocols using oxytocin and cloprostenol (synthetic prostaglandin F_{2α}) has been associated, increasing seminal volume and concentration, in addition to decreasing the time and number of stimuli required for electroejaculation. This is possible because the hormonal action favoring the contraction of smooth muscle of the seminiferous and epididymal tubules. Thus, in the present study, the objective was to evaluate whether protocols using oxytocin and cloprostenol (associated or not) can increase the volume and hormonal concentration of *M. rufa* throughout the electroejaculation procedure without changing seminal evaluation parameters. It was demonstrated that there was no significant increase in the volume and sperm concentration between the treatments performed. The treatment using only cloprostenol showed the worst results, which has not indicated for the collection of *M. rufa* semen.

Key Words: Cervidae, Southern red deer, reproductive biotechnologies, semen collection, hormonal stimulation.

CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

É notório que nos últimos anos a crescente preocupação com o ambiente, principalmente pela possibilidade de que muitas espécies entrem em processo de extinção por causas não naturais (WILDT, 1992; HOLT; PICKARD, 1999). Este processo tem acontecido em taxas cada vez mais elevadas devido as atividades humanas que provocam a fragmentação e destruição de *habitat*, caça e pesca predatória, introdução de espécies exóticas, entre outras ameaças (HOLT; PICKARD, 1999).

A reprodução é a base da sobrevivência de qualquer espécie sendo seu estudo fundamental para a conservação em diferentes níveis (indivíduo, espécie e população) podendo influenciar indiretamente a vitalidade de todo o ecossistema, uma vez que a sua falha pode ter consequências drásticas como a extinção (WILDT et al., 2003).

As biotécnicas reprodutivas, tais como colheita de células germinativas (espermatozóides e oócitos), inseminação artificial, fertilização in vitro e transferência de embriões, são ferramentas importantes que devem ser estudadas e aplicadas nos diferentes programas de conservação das espécies (WILDT, 1992; HOLT; PICKARD, 1999; WILDT; WEMMER, 1999; WILDT et al., 2003). O armazenamento de material genético a longo prazo em bancos de germoplasma é essencial para o desenvolvimento de estratégias de conservação a serem aplicadas para o reestabelecimento de populações de vida livre (WILDT, 1992; HOLT; PICKARD, 1999). A colheita e avaliação do sêmen é uma das primeiras etapas a serem realizadas, por determinar quais animais

estão aptos tanto à reprodução natural como artificial, fazendo uso de espermatozóides frescos, refrigerados ou criopreservados (MOREIRA, 2017).

A criopreservação de sêmen é de grande importância, sobretudo por proporcionar facilidades e vantagens como a transferência de material genético entre instituições e zoológicos, eliminando assim os problemas relacionados com o transporte de animais (custo e suscetibilidade ao estresse), incompatibilidade de indivíduos, disseminação de doenças e injúrias (PUKAZHENTHI, WILDT, 2004). A criopreservação proporciona ainda que a genética, tanto de animais em cativeiro como de vida livre, seja mantida e usada em programas de reprodução assistida de planos de manejo de espécies, permitindo a manutenção da diversidade genética (ZANETTI et al., 2010).

Em ruminantes a coleta de sêmen pode ser realizada utilizando diferentes métodos, sendo que, para cervídeos, os mais utilizados são a eletroejaculação e a vagina artificial (ZANETTI et al., 2010, ROLA; ZANETTI; DUARTE, 2012, 2013, ABRIL-SÁNCHEZ et al., 2017). Entretanto, o uso de eletroejaculador pode ser estressante e doloroso o que leva a preocupação do ponto de vista de bem-estar animal, uma vez que podem-se provocar alterações dos padrões fisiológicos como a concentração sérica de cortisol, frequência respiratória e cardíaca, assim como parâmetros hematológicos e bioquímicos (STAFFORD et al., 1996; MOSURE et al., 1998; ABRIL-SÁNCHEZ et al., 2017), sobretudo para cervídeos que são altamente susceptíveis aos estímulos estressores (DUARTE, 2010).

Estudos realizados com bovinos, carneiros, búfalos e coelhos demonstraram que há um aumento de volume seminal após a aplicação intravenosa de ocitocina cinco minutos antes da coleta de sêmen, assim como há o aumento da

concentração e a quantidade de espermatozoides das amostras (KNIGHT; LINDSAY, 1970; BERNDTSON; IGBOELI, 1988; ASSINDER et al., 2010). Isso ocorre, pois a ocitocina estimula a contratilidade de músculo liso do epidídimo aumentando, assim, o transporte de espermatozoides pelos ductos antes e durante a ejaculação (KNIGHT, 1974; BERNDTSON; IGBOELI, 1988). A prostaglandina F₂ α (PGF) também tem a capacidade de aumentar a contratilidade de musculatura lisa tanto em fêmeas como em machos, podendo favorecer o processo de ejaculação como já demonstrado em cães, garanhões búfalos e bovinos (CORNWELL; KOONCE; KREIDER, 1974; HESS, 2001; IBRAHIM, 1988; PALMER et al., 2004). Assim, o uso de ambos os fármacos pode fazer com que haja um aumento do volume e concentração seminal, associado a um menor número de estímulos elétricos para obtenção de sêmen por meio da eletroejaculação. Isso poderia diminuir os efeitos negativos associados a esta técnica, contribuindo para o bem-estar animal.

Na última década vem aumentando o número de estudos reprodutivos de cervídeos neotropicais (ZANETTI; POLEGATO; DUARTE, 2010; COSTA et al., 2011; FAVORETTO; ZANETTI; DUARTE, 2012; ROLA; ZANETTI; DUARTE, 2013; CURSINO et al., 2014; ZANETTI et al., 2014), porém estes estudos ainda se concentram em espécies como o veado-mateiro (*Mazama americana*) e veado-catingueiro (*M. gouazoubira*), principalmente devido ao número de animais mantidos em cativeiro e a facilidade de manejo. Isso faz com que tais espécies possam servir como modelo experimental para estudos reprodutivos que poderão ser aplicados futuramente em espécies com algum grau de ameaça e que não permitem um manejo tão intenso como é o caso do cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), por exemplo.

Entretanto, estudos utilizando análises citogenéticas, moleculares e morfológicas refutam o trabalho realizado por Rossi (2000) que utilizou apenas a morfologia e determinou que existe apenas uma espécie de veado-mateiro (*M. americana*) de ocorrência no Brasil (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; ABRIL et al, 2010). Segundo Duarte, González e Madonado (2008) sugerem existência de um complexo de espécies crípticas dentro de *M. americana*, informação corroborada por Abril e colaboradores (2010) que demonstraram a existência de seis citótipos com variação cromossômica entre eles, que possivelmente seriam unidades evolutivas significante (ESUs).

Com base nesta informação, Rincón (2016) analisou um indivíduo de *M. americana* capturado na localidade tipo da espécie (Caïenas, Guiana Francesa), propondo um neótipo, e demonstrando que a espécie descrita por Erxleben em 1777 é diferente de todos os citótipos propostos por Abril e colaboradores (2010). Frente a necessidade da resolução taxonômica das espécies de cervídeos que ocorrem no Brasil, foram iniciados diversos trabalhos incluindo o realizado por Luduvério (2018) que descreve um neótipo para o citótipo que ocorre na Bacia do Rio Paraná (Citótipo Paraná) e valida este citótipo como a espécie descrita por Illiger em 1811 como *Mazama rufa* (veado-mateiro-do-sul).

Pouco se sabe sobre a história natural dessa nova espécie, entretanto acredita-se que esteja restrito as florestas estacionais semidecíduais (DUARTE et al., 2012) e, que quando seu *status* de espécie for atualizado, poderá ser classificado em categorias de animais ameaçados de extinção segundo protocolos da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN; ABRIL et al., 2010).

Dessa forma, se faz necessária a realização de estudos aprofundados para a resolução taxonômica dos Cervídeos, assim como estudos sobre história natural e reprodução que sirvam de subsídios para planos de manejo das espécies e o uso de técnicas reprodutivas para conservação *in situ* ou *ex situ*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*)

Os Cervídeos verdadeiros tiveram origem no Mioceno e início do Plioceno à aproximadamente 20 milhões de anos na Eurásia, com grande quantidade de fósseis sendo registradas para o final do Plioceno (WEB, 2000; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008). A história evolutiva de como os Cervídeos chegaram na América do Norte ainda é incerta, entretanto, acredita-se que eles tenham chegado na América do Sul no final do Plioceno quando houve a elevação da ponte do Estreito do Panamá, permitindo grande intercâmbio de fauna entre as Américas (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008).

Ao menos oito formas ancestrais chegaram na América do Sul, obtiveram sucesso dando origem a toda diversidade e espécies encontradas atualmente, sobretudo pela grande disponibilidade de recurso e ausência de outros ruminantes (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008).

Os cervídeos neotropicais atuais se dividem em dois grupos de acordo com sua morfologia, no qual, o primeiro grupo, é formado por espécies de cervídeos que quando adultos possuem altura de cernelha de maior que 60cm, machos possuindo chifres ramificados e que ocupam áreas de florestas abertas, pastagens, pampas e pântanos, sendo eles pertencentes aos gêneros *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* e *Blastocerus* (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008). O outro grupo é formado por espécies dos gêneros

Mazama e *Pudu*, que possuem altura de cernelha até cerca de 60cm e machos possuem chifres simples e não ramificados. Tais características permitem que esses animais ocupem de forma eficiente áreas florestadas com vegetação densa e fechada (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008).

O veado-mateiro ou *Mazama americana* é a maior espécie de seu gênero podendo chegar a 40 kg e 65 cm de altura (DUARTE, 1996). Esta espécie é classificada como Dados Deficientes (DD) pela Lista Vermelha de espécies ameaçadas de extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) devido a sua inconsistência taxonômica que inviabiliza a aplicação dos protocolos utilizados para categorizar as espécies em categorias de ameaça (DUARTE et al., 2012).

Estudos realizados pelos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE – UNESP/Jaboticabal) vem demonstrando que a espécie apresenta inconsistências cromossômicas coerentes com a distribuição geográfica, sugerindo então a existência unidades evolutivamente estáveis distintas. Estas informações vão de encontro com o que foi relatado por Rossi (2000) que após análise com animais depositados em coleções científicas e museus, a partir de análises morfológicas, descreve a existência de uma única espécie de *M. americana* para o Brasil, incluindo como sinonímia a espécie *M. bororo* (veado-mateiro-pequeno) descrito como espécie distinta por Duarte e Jorge (2003).

Diferentemente de Rossi (2000), Abril e colaboradores (2010), a partir de amostras de sangue e pele de 18 indivíduos identificados como *M. americana* proveniente de diferentes regiões do Brasil, realizaram análises citogenéticas e moleculares demonstrando a existência de seis citótipos para a espécie (Figura

1). Tal informação corrobora com o apresentado por Duarte, González e Maldonado (2008) que apresentam *M. americana* como um complexo de espécies crípticas, ou seja, morfologicamente similares, mas cromossômica e molecularmente distintas.



Figura 1. Mapa da distribuição geográfica da espécie *Mazama americana* (veado-mateiro) segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN; 2019 modificado) contendo a informação de distribuição dos seis cariótipos apresentados por Abril e colaboradores (2010) e com a localização do neótipo de *M. rufa* coletado e descrito por Luduvério (2018; estrela branca). Sendo: quadrado azul escuro = citótipo Jarí; quadrado azul claro = citótipo Juína; quadrado verde = citótipo Rondônia; quadrado rosa = citótipo Carajás; quadrado vermelho = citótipo Paraná.

A existência do complexo *M. americana*, com diferentes espécies, é sustentada por estudos reprodutivos que demonstraram que quando produzidos machos e fêmeas a partir de diferentes linhagens cromossômicas (citótipos), estes indivíduos serão inférteis ou sub-férteis e que quanto maior a diferença cromossômica entre os progenitores maior a barreira reprodutiva (CURSINO et

al., 2014; SALVIANO et al.,2017). Quando essa análise é feita observando o comportamento reprodutivo tal barreira é inexistente, ou seja, machos e fêmeas reconhecem os comportamentos reprodutivos de outro citótipo como próprio, reconhecendo o estro e aceitando a cópula (CARRANZA; ROLDÁN; DUARTE, 2018).

Com base no exposto e na necessidade de resolução taxonômica da espécie, Rincón (2016) analisou um indivíduo macho da espécie coletado na localidade tipo (Caiena – Guiana Francesa, descrito por Erxleben em 1777) e propôs um neótipo para a espécie. A partir das análises citogenéticas, moleculares e morfológicas do indivíduo coletado, Rincón (2016) demonstrou que a espécie *M. americana* é diferente de todos os citótipos descritos para o Brasil, sugerindo que tais citótipos são de espécies distintas. Face ao exposto, novos trabalhos de descrição das espécies de cervídeos neotropicais do gênero *Mazama* foram realizados e outros estão em andamento com a finalidade de resolver as incertezas taxonômicas do gênero (MARAN, 2016, BORGES, 2017, SANDOVAL, 2019).

Um desses estudos foi realizado por Luduvério (2018) que analisou um indivíduo descrito como *M. americana* coletado nas proximidades do Parque Nacional do Iguaçu (Foz do Iguaçu – PR), cerca de 290 km de distância da localidade tipo (Assunção, Paraguai) da espécie *M. rufa* descrita por Illiger em 1811, segundo Azara (1802). Luduvério (2018), demonstrou com base nas análises morfológicas, citogenéticas e moleculares que o citótipo “Paraná” de *M. americana* na verdade é a espécie *M. rufa*, e assim valida a espécie descrita por Illiger.

Ludovérico (2018), descreve os indivíduos da espécie *M. rufa* (Figura 2 e 3) como indivíduos de coloração predominante castanho avermelhado, flancos acinzentados até o início do tórax. O pescoço é castanho claro na porção ventral, apresentando faixa de pelos antevertidos na nuca, salpicado de castanho, com presença de faixa rostral larga, castanha enegrecida em direção ao posterior e por toda a linha lombar. A lateral da cabeça é de coloração parda e a região gular pardo claro com mancha nasala presente, assim como mancha mentoniana branca. Possui faixas orbitais superiores e inferiores ausentes, assim como ausência de mancha superciliar. As orelhas são pequenas e angulares com a borda interna castanho, com pelagem branca na borda lateral inferior e nas pregas, com a parte externa da orelha castanho enegrecido semelhante a faixa rostral. A cor da região proximal é acinzentada como nos flancos e a região distal castanho escuro como na linha dorsal e área rostral, sendo presente tufo de pelo tarsal.



Figura 2. Indivíduo macho da espécie *Mazama rufa* (veado-mateiro-de-sul) alojado no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE - UNESP/Jaboticabal). Fotos Bianca Ferrari.



Figura 3. Indivíduo fêmea com filhote de poucos dias da espécie *Mazama rufa* (veado-mateiro-de-sul) alojado no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE - UNESP/Jaboticabal). Fotos Bianca Ferrari.

Ainda não há na literatura trabalhos específicos para *M. rufa* quanto a reprodução, ecologia e uso do ambiente, entretanto, acredita-se que sua distribuição esteja restrita as florestas estacional semidecidual e que os aspectos reprodutivos sejam semelhantes ao descrito para *M. americana* com ausência de sazonalidade reprodutiva tanto para fêmeas quanto para machos, no qual machos não apresentam troca anual dos chifres (DUARTE et al., 2012). Entretanto, como relatado, é emergencial que sejam realizados estudos de história natural e estudos reprodutivos voltados a conservação da espécie haja vista a provável classificação na categoria de ameaça vulnerável quando seu *status* taxonômico for atualizado (ABRIL et al., 2010; DUARTE et al., 2012).

2.2. Banco de germoplasma como ferramenta para a conservação de animais selvagens

A extinção é um processo evolutivo irreversível que ocorre naturalmente e de forma lenta, mantendo o equilíbrio entre as especiações, mutações e modificações em alelos para a geração de novas espécies (WILDT, 1992; HOLT; PICKARD, 1999; PRIMACK; RODRIGUES, 2002). Tais processos de extinção

são acelerados por ações antrópicas que interferem diretamente no sucesso reprodutivo, como a incapacidade de encontrar parceiros reprodutivos e endogamia, levando a diminuição artificial e crescente de populações, principalmente devido a agricultura em larga escala, caça e pesca predatórias, silvicultura, extração mineral e vegetal, desvio e armazenamento de água, construção de estradas e urbanização (WILDT, 1992; HOLT; PICKARD, 1999). Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento e aplicação de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* para as espécies silvestres com diferentes graus de ameaça.

As estratégias de conservação *in situ* são sem dúvidas a melhor forma de se conservar a biodiversidade, sobretudo, por manter os indivíduos em seu *habitat* natural, permitindo que estes sofram os processos evolucionários naturais das espécies (PRIMACK; RODRIGUES, 2002). Já as estratégias *ex situ* são aquelas em que a diversidade genética é mantida fora do seus habitats naturais tendo como o principal objetivo subsidiar e apoiar a conservação da diversidade genética em seu hábitat natural (MAUNDER; BYERS, 2004).

A Convenção da Diversidade Biológica (CBD) recomenda que programas de conservação *ex situ* somente sejam iniciados quando a espécie ou população ameaçada possua sua biologia conhecida e que a sua manutenção em cativeiro irá aprimorar de forma efetiva as estratégias de conservação *in situ* (MAUNDER; BYERS, 2004). Entretanto, a mesma instituição reconhece que quando a sua manutenção em cativeiro permitir o desenvolvimento de protocolos e o conhecimento mais aprofundado da espécie antes que essa seja ameaçada em vida livre, ele deverá ser feito (MAUNDER; BYERS, 2004).

Entre as estratégias de conservação *ex situ* de espécies podemos destacar a manutenção de espécies em coleções científicas (plantas ou animais), parques zoológicos, aquários e jardins botânicos, instituições de pesquisa e bancos de germoplasmas de espécies selvagens e domésticas (Figura 4; WILDT, 1992; HOLT; PICKARD, 1999, MAUNDER; BYERS, 2004).

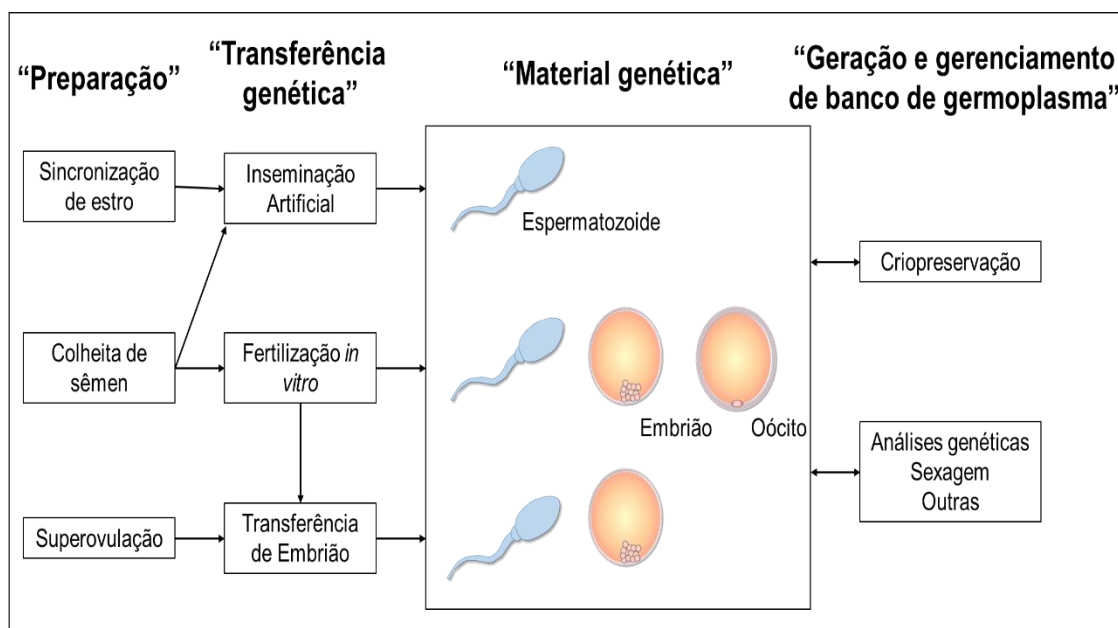


Figura 4. Representação do desenvolvimento e aplicação de biotecnologia reprodutiva para uso de conservação de animais selvagens (BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998 modificado)

O estudo de biotecnologias da reprodução como a inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), criopreservação de gametas (espermatozoides, oócitos e células germinativas) e embriões, colheita, maturação (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV), clonagem, injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), estudos de células-tronco e células-tronco pluripotentes induzidas (IPS), possuem potencial de solucionar ou prevenir a perda de diversidade genética das populações *ex situ* e *in situ* (LEIBO; SONGSASEN, 2002). Dentre as biotécnicas reprodutivas citadas, o banco de germoplasma permite (Figura 5; HOWARD et al., 2016, ZOMKUS; HASSAPAKIS; HOUCK, 2018):

- Salvar o material genético das espécies a um custo baixo, sendo necessário menos espaço para manutenção quando comparado com animais vivos;
- Estocar diversidade para uso futuro;
- Promover o intercâmbio de material genético entre instituições, entre populações cativas e de vida livre superando a incompatibilidade sexual e injúrias caudas durante o transporte;
- Estender ou reduzir o intervalo entre gerações.

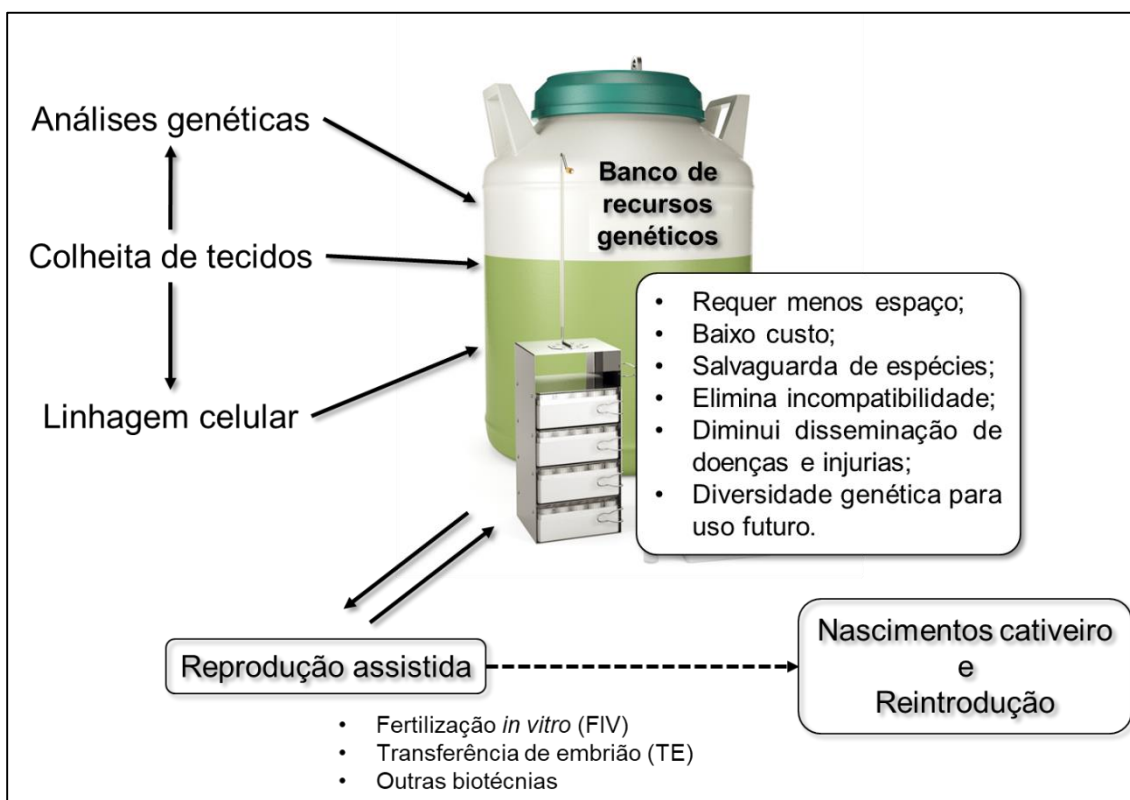


Figura 5. Papel da criação de banco de germoplasma como estratégia de conservação *ex situ* de espécies ameaçadas (ZOMKUS; HASSAPAKIS; HOUCK, 2018 adaptado).

O uso de material genético armazenado em bancos de germoplasma permitem, por exemplo, introduzir novo material genético em populações de vida livre através de inseminação artificial ou transferência de embriões em populações ameaçadas que estejam isoladas e/ou com problema de homozigose (SILVA et al., 2015). Além disso, o transporte do material é facilitado

e menos custoso do que se transportar um animal vivo, o que viabiliza trocas genéticas entre animais de vida livre e cativos em instituições de pesquisa, zoológicos e aquários localizados em mesma região geográfica ou países e continentes diferentes (JOHNSTON; LACY, 1995, SILVA et al., 2015, HOWARD et al., 2016, ZOMKUS; HASSAPAKIS; HOUCK, 2018).

É possível que sejam criopreservados diferentes tipos celulares de diferentes linhagens como: células somáticas de diferentes tecidos, células tronco embrionárias, soro, plasma, DNA e DNA mitocondrial, gametas masculinos e femininos e embriões (BENIRSCHKE, 1984, ZOMKUS; HASSAPAKIS; HOUCK, 2018). A colheita e preservação de gametas masculinos é mais eficiente e menos problemática que a colheita de gametas femininos (DURRANT, 1990), sendo possível criopreservar sêmen, espermatozoides coletados diretamente do epidídimo e espermatogonias coletadas diretamente do tecido testicular ou isoladas (BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998, SILVA; MORATO; SILVA, 2004, SILVA et al., 2015).

Cada tipo celular possuem exigências específicas durante o processo de criopreservação (SILVA et al., 2015). Espermatozoides retirados diretamente do epidídimo, por exemplo, não tiveram contato com o plasma seminal secretado pelas glândulas acessórias (YU; LEIBO, 2002). Algumas dessas células ainda não entraram em processo de maturação celular e por isso podem ter alterado a sensibilidade ao resfriamento e resistência ao congelamento inviabilizando o uso das células caso tais características não sejam levadas em consideração durante o procedimento de criopreservação (COOPER, 1998, YU; LEIBO, 2002, DACHEUX; GATTI; DACHEUX, 2003, SILVA et al., 2015).

Existem diferentes técnicas para a preservação das células, porém em bancos de germoplasma, as células passam pelo procedimento de preservação a frio em que os processos metabólicos e biodeteriorativos sofridos pelas células sejam desacelerados (RAWSON; MCGREGOR; LLOYD, 2011, SILVA et al, 2012). A criopreservação é um método de congelamento ultra-rápido em que o material é armazenado a temperaturas de -80°C ou -196°C, combinadas ou não a técnicas de refrigeração ou liofilização (RAWSON; MCGREGOR; LLOYD, 2011, SILVA et al, 2012).

Durante o processo de criopreservação, há uma queda nos níveis de energia cinéticas impedindo que haja o movimento celular, paralisando a atividade biológica da célula que levariam ao envelhecimento e morte celular (MAZUR, 1984, GROUT; MORRIS, MCLELLAN, 1990). Entretanto, apesar da preservação celular, a técnica precisa ser empregada com cuidados, pois as células poderão sofrer danos durante o procedimento de congelação por formação de cristais de gelo, sendo necessário associar à técnica crioprotetores (e. g., glicerol, DMSO) para que as lesões celulares sejam minimizadas (MAZUR, 1984, GROUT; MORRIS, MCLELLAN, 1990).

2.2.1. Colheita de sêmen

Como já citado, é possível criopreservar espermatozoides através de diferentes técnicas de colheita (DURRANT, 1990, BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998, SILVA; MORATO; SILVA, 2004, SILVA et al., 2015).

Entre os animais selvagens, a eletroejaculação é o método mais frequentemente empregado por permitir a colheita evitando o risco de injúrias para o animal e coletor, pois o animal estará imobilizado através de contenção química (SILVA et al., 2012).

A técnica de eletroejaculação baseia-se na indução do reflexo ejaculatório devido ao estímulo elétrico aplicando no assoalho da ampola retal (CASTELO; SILVA, 2014). Tal estímulo irá atuar nos nervos simpáticos lombares (nervo hipogástrico) provocando contração da musculatura lisa da região resultando na emissão e ejaculação do sêmen (CASTELO; SILVA, 2014). As diferentes espécies respondem de diferentes maneiras aos protocolos de estímulo elétrico da eletroejaculação, e por esse motivo, tais protocolos necessitam de adaptações baseados na resposta dos indivíduos (DURRANT, 1990, CASTELO; SILVA, 2014).

Entre as vantagens do uso da coleta de eletroejaculação estão a possibilidade de colheita de material de animal cativos e de vida livre, diminuição do risco para animal e operador, não necessidade de um manequim (fêmea no cio) para que ocorra a colheita, pois não necessita que o animal tenha libido (SPINDLER; WILDT, 2010). Entretanto, o uso de eletroejaculador pode ser estressante e doloroso o que leva a preocupação do ponto de vista de bem-estar animal, uma vez que podem-se provocar alterações dos padrões fisiológicos como a concentração sérica de cortisol, frequência respiratória e cardíaca, assim como parâmetros hematológicos e bioquímicos (STAFFORD et al., 1996; MOSURE et al., 1998; SPINDLER; WILDT, 2010, ABRIL-SÁNCHEZ et al., 2017). Além disso, devido ao estímulo das glândulas seminais, há um aumento do volume do ejaculado por aumentar a secreção de plasma seminal, sem alterar a qualidade dos parâmetros seminais (SPINDLER; WILDT, 2010).

Devido as vantagens da colheita de sêmen por eletroejaculação e com o objetivo minimizar os efeitos da técnica tem se utilizado a associação de outros métodos para colheita de sêmen como o uso de protocolos hormonais (KNIGHT;

LINDSAY, 1970; BERNDTSON; IGBOELI, 1988; ASSINDER *et al.*, 2010). Em animais domésticos, o uso de hormônios como ocitocina e prostaglandinas tem sido utilizado para diminuir o tempo e o número de estímulos elétricos da colheita de sêmen por eletroejaculação, aumentando o volume e a concentração seminal sem alterar os parâmetros de avaliação de qualidade seminal (KNIGHT; LINDSAY, 1970, CORNWELL; KOONCE; KREIDER, 1974, KNIGHT, 1974, BERNDTSON; IGBOELI, 1988, IBRAHIM, 1988, HESS, 2001, PALMER *et al.*, 2004, ASSINDER *et al.*, 2010).

2.3. Ocitocina

A ocitocina é constituída por um nonapeptídeo cíclico com uma ponte de dissulfeto entre os resíduos de cistina 1 e 6, leucina na posição 8 e isoleucina na posição 3, essa última necessária para a ligação aos receptores de ocitocina (THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006).

É um hormônio neuro-hipofisário de meia vida curta secretado pelos neurônios de hipotálamo e armazenados na hipófise posterior, junto com sua molécula transportadora (neurofisina, Npl) até o momento de sua secreção na corrente sanguínea (OT-Npl) (DEN HERTOOG; DE GROOT; VAN DONGEN; 2001, THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006). Npl é responsável por reconhecer, empacotar e armazenar a ocitocina em grânulos antes de sua secreção na corrente sanguínea (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001).

Conhecido tradicionalmente como um hormônio feminino com ação durante o processo fisiológico do parto e ejeção de leite na lactação, a ocitocina é usada clinicamente como indutor de parto (THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006). Estudos demonstraram que a ocitocina também possui

ação parácrina no trato reprodutor feminino provocando a regressão do corpo lúteo no ovário (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001).

Sua ação pode ser direta ativando a da cadeia leve de miosina (contração muscular) ou indireta estimulando a síntese de prostaglandina F_{2α} (FUCHS; HUSSLEIN; FUCHS, 1981, PHANEUF et al., 1993).

Em machos, a ocitocina está associada a ereção peniana e seu pulso hipotalâmico com a ejaculação (THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006). A primeira vez que foi demonstrado *in vitro* que a ocitocina age aumentando a contratibilidade dos túbulos seminíferos foi quando Niemi e Kormano (1965) adicionaram ocitocina ao meio de cultura, fato esse confirmado por Worley e colaboradores (1985). A ocitocina age contraindo as células mióides dos túbulos seminíferos favorecendo a espermição quando os espermatozoides ainda não possuem motilidade. (HARGROVE et al., 1977, THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006).

O mecanismo de ação de como a ocitocina atua na espermição através da contração dos túbulos seminíferos, e conseqüentemente a transferência de espermatozoides para o epidídimo, não está completamente elucidado (THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006). Era de se esperar que receptores de ocitocina fossem encontrados nas células dos túbulos seminíferos e epidídimo, fato ainda não demonstrado (THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006). Acredita-se que sua ligação não ocorra diretamente em receptores de ocitocina, mas sim em receptores de vasopressina que possui molécula semelhante a ocitocina e que estão presente nas células mióides dos túbulos seminíferos (HOWL et al., 1995, HARRIS; NICHOLSON, 1998, THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006). Outra explicação seria de

que a ocitocina tem ação mediada indiretamente por outras células (e. g. célula de Sertoli) que possuem receptores de ocitocina (Figura 6; EINSPANIER; IVELL, 1997, FRAYNE; NICHOLSON, 1998, THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006).

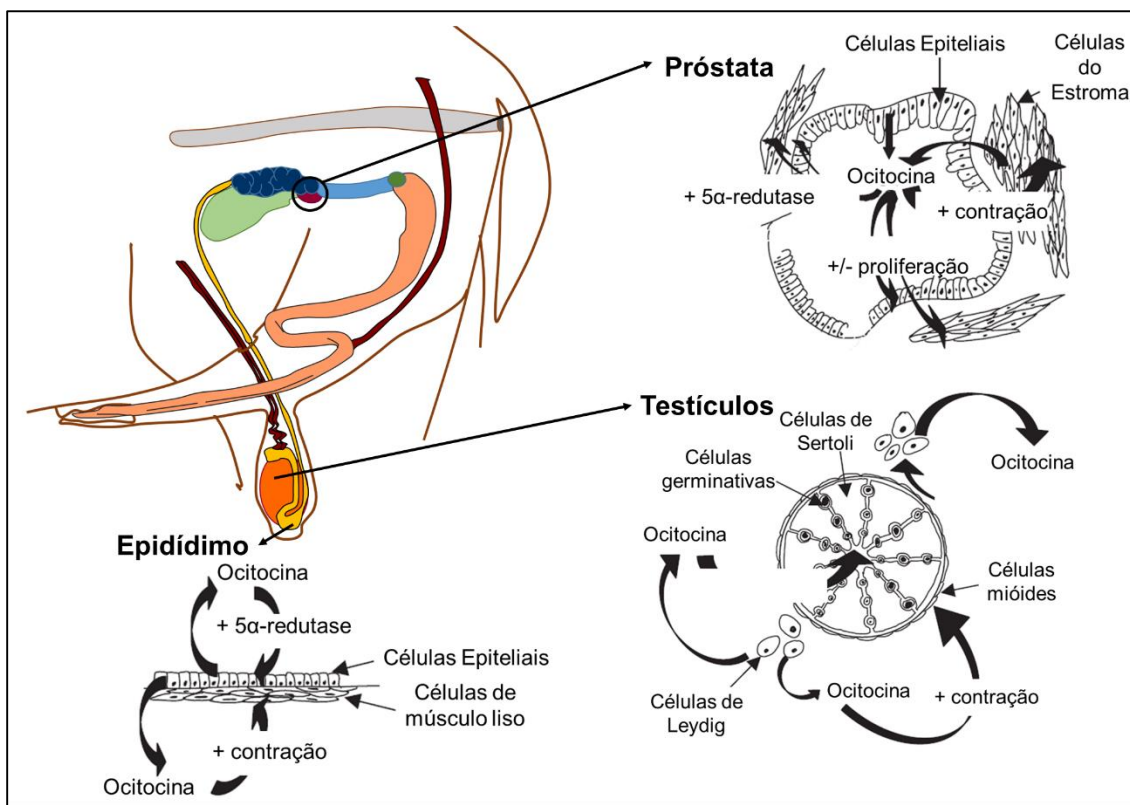


Figura 6. Visão geral das funções parácrinas e autócrinas da ocitocina nos testículos, epidídimo e próstata (THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006; modificado).

Ainda nos testículos, a ocitocina também teria um papel modulador da esteroidogênese, pois atuaria nos receptores presentes nas células de Leydig aumentando a secreção de testosterona (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001). Ang e colaboradores (1994) demonstraram que a super expressão do gene de ocitocina irá fazer como que a concentração de testosterona seja reduzida, mas que a concentração de di-hidrotestosterona seja aumentada por aumento da ação da enzima 5 α -redutase.

A ocitocina, juntamente com outras substâncias, também irá provocar a contratibilidade do epidídimo favorecendo o transporte e a maturação

espermática (THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006). No epidídimo, a ocitocina irá provocar movimentos contrateis, aumentando a amplitude e frequência das contrações, assim como o aumento do tônus (HIB, 1977, THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006).

Em animais domésticos, a administração de ocitocina antes do procedimento de colheita de sêmen aumentou a concentração espermática de diferentes espécies de mamíferos como ovinos, coelhos, bovinos, búfalos, garanhões e cães, favorecendo a eletroejaculação (FJELLSTRÖM; KIHLLSTRÖM; MELIN, 1968, CORNWELL; KOONCE; KREIDER, 1974, KNIGHT, 1974, BERNDTSON; IGBOELI, 1988, IBRAHIM, 1988, HESS, 2002, PALMER et al., 2004, BOZURT; TÜRK; GÜR, 2007).

Dessa forma, entender a secreção, mecanismos de ação da ocitocina e fatores que regulam a expressão de receptores de ocitocina no trato reprodutor permitirá o desenvolvimento de terapias estratégicas para tratamento de indivíduos com oligoespermia, com desordens ejaculatórias e impotência, além de tratamento de hiperplasia prostática benigna (THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006), além da otimização da colheita de espermatozoides de espécies de interesse da produção animal e conservação.

2.4. Prostaglandina

Prostaglandinas são eicosanoides que possuem 20 carbonos em sua molécula e são derivados do ácido araquidônico. (SQUIRES, 2010, KOBAYASHI; HORI; KAWAKAMI, 2013). São produzidas pela membrana plasmática de diferentes células e não por glândula específica como acontece com os hormônios (EDQVIST; STABENFELDT, 2008, SQUIRES, 2010). O ácido araquidônico, componente da membrana celular, é liberado pelas fosfolipases e

lipases e prontamente metabolizado por enzimas como a ciclooxigenase ou COX (ZAKAR; MITCHELL, 1998). O composto gerado pela ação da COX é chamado de prostaglandina G₂, que também sofrerá ação da COX dando origem a diferentes compostos de prostaglandinas e tromboxanos (ZAKAR; MITCHELL, 1998).

Os diferentes tipos de prostaglandinas serão determinados pela sua conformação molecular e sua ação determinada pelo tecido onde é encontrada (ZAKAR; MITCHELL, 1998), sendo sua meia vida muito curta justamente por não haver armazenamento (EDQVIST; STABENFELDT, 2008).

Como já citado, as prostaglandinas terão diferentes efeitos biológicos, sendo alguns deles bastante intensos (ZAKAR; MITCHELL, 1998). Está intimamente relacionada com processos biológicos como estímulo do processo inflamatório, tônus vascular com a regulação do fluxo sanguíneo e pressão sanguínea, função renal, termorregulação, proliferação celular, luteólise, implantação de embrião, entre outros (ZAKAR; MITCHELL, 1998. SQUIRES, 2010).

Assim como a ocitocina, é amplamente estudada e aplicada na reprodução de fêmeas, sendo os tipos E₂ e F₂ os encontrados no trato reprodutivo (SCHATTEN; CONSTANTINESCU, 2007). A descoberta de seu papel de luteólise do corpo lúteo e sua ação na contração uterina fez com que fosse empregada como principal ferramenta para manipulação do ciclo estral (SCHATTEN; CONSTANTINESCU, 2007).

Em machos, foram detectadas no plasma seminal e por esse motivo acreditava-se que elas eram produzidas pela próstata (SCHATTEN; CONSTANTINESCU, 2007), entretanto sugere-se que sua origem seja

majoritariamente da vesícula seminal devido a sua correlação com a frutose encontrada no ejaculado (KELLY, 1981).

Kelly (1981) sugere que são três as funções da prostaglandina encontrada no plasma seminal: participar do processo de ejaculação, estimular a contração do trato reprodutivo feminino e assim facilitar o transporte dos espermatozoides após a ejaculação, e ação nos próprios espermatozoides durante a ejaculação. As duas primeiras ações estão relacionadas ao fato de que as prostaglandinas controlarem a atividade vascular do musculo liso e agirem no retículo sarcoplasmático liberando os íons de cálcio do citoplasma, desencadeando o processo de contração muscular (KELLY, 1981, ZAKAR; MITCHELL, 1998, SCHATTEN; CONSTANTINESCU, 2007, SQUIRES, 2010).

Sua ação direta no espermatozoide também estaria relacionado com o fluxo de cálcio para dentro das células e através das membranas, pelos mesmos mecanismos sugeridos para o efeito luteolítico do corpo lúteo (VOGLMAYR, 1973, KELLY, 1981).

Devido seu efeito no procedimento de ejaculação, a prostaglandina F_{2α}, principalmente seu derivado sintético cloprostenol, vem sendo empregado nos procedimentos de coleta de sêmen (KREIDER; OGG; TURNER, 1981), pois aumenta o número de espermatozoides no primeiro ejaculado sem alterar os parâmetros seminais (HESS, 2002). Seu uso tem demonstrado que há aumento no número de células espermáticas no ejaculado de touros, coelhos, garanhões, porco e ovinos. Hemsworth e colaboradores (1977) observaram que quando usada antes da colheita de sêmen de porcos causa uma redistribuição das células espermáticas do ejaculando, sendo estas liberadas em maior quantidade

na fração rica do ejaculado aumentando também o volume de plasma seminal da fração.

Sendo assim, o uso de prostaglandina pode otimizar o procedimento colheita de sêmen aumentando o número de células espermáticas coletados devido a sua ação na musculatura lisa do epidídimo fazendo que os espermatozoides ali armazenados sejam transportados para o ducto deferente (HESS, 2002).

3. LITERATURA CITADA

ABRIL, V. V., CARNELOSSI, E. A. G., GONZÁLEZ, S., DUARTE, J. M. B. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 128, n. 1-3, p. 177-187, 2010.

ABRIL-SÁNCHEZ, S.; FREITAS-DE-MELO, A.; DAMIÁN, J. P.; GIRIBONI, J.; VILLAGRÁ-GARCÍA, A.; UNGERFELD, R. Ejaculation does not contribute to the stress response to electroejaculation in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**. 00:1-6. 2017.

ANG, H. L., IVELL, R., WALTHER, N., NICHOLSON, H., UNGEFROREN, H., MILLAR, M., CARTER, D., MURPHY, D. Over-expression of oxytocin in the testes of a transgenic mouse model. **Journal of endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 53-62, 1994.

ASSINDER, S. J., CAREY, M., PARKINSON, T., NICHOLSON, H. D. Oxytocin and vasopressin expression in the ovine testis and epididymis: changes with the onset of spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, 43: 448-456. 2000.

AZARA, F. **Apuntamientos para la historia natural de los cuadrupedos del Paraguay y Rio de la Plata**. En la, 1802.

BAINBRIDGE, D. R. J.; JABBOUR, H. N. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Veterinary record**, v. 143, n. 6, p. 159-168, 1998.

BERNDTSON, W., IGBOELI, G. Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of Holstein bulls electroejaculated after administration of oxytocin. **Journal of Reproduction and Fertility**, 82: 467-475. 1988.

BORGES, C. H. D. S. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla, Cervidae) a partir de um topótipo atual**. 2017. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2017.

BOZKURT, T.; TUERK, G.; GÜR, S. Effects of exogenous oxytocin on serologic and seminal steroids and semen characteristics in rams. **Turkish journal of veterinary and animal sciences**, v. 31, n. 5, p. 303-309, 2007.

CARRANZA, J., ROLDÁN, M., DUARTE, J. M. B. Lack of mate selectivity for genetic compatibility within the red brocket deer *Mazama americana* complex. **Mammalian Biology**, v. 88, p. 168-175, 2018.

CASTELO, T. S.; SILVA, A. R. Eletroejaculação em mamíferos silvestres: principais fatores que afetam sua eficiência. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 38, n. 4, p. 208-213, 2014.

COOPER, T. G. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 53, p. 119-136, 1998.

CORNWELL, J., KOONCE, K., KREIDER, J., Effect of prostaglandin F₂ α on seminal characteristics of the stallion. **Journal of Animal Science**. 38: 226. 1974.

COSTA, K. L. C.; DA MATTA, S. L. P.; GOMES, M. D. L. M.; DE PAULA, T. A. R.; DE FREITAS, K. M.; CARVALHO, F. D. A. R.; SILVEIRA, J. A.; DOLDER, H.; MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. **Animal Reproduction Science**, 127(3), 202-212. 2011.

CURSINO, M. S.; SALVIANO, M. B.; ABRIL, V. V.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC evolutionary biology**, 14(1), 40. 2014.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy research and technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, 2003.

DEN HERTOOG, C. E. C.; DE GROOT, A. N. J. A.; VAN DONGEN, P. W. J. History and use of oxytocics. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 94, n. 1, p. 8-12, 2001.

DUARTE, J. M. B. Captive Management. In: DUARTE, J. M. B., GONZÁLEZ, S. (Eds). **Neotropical cerviology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal: Funep/IUCN. 2010.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. Funep, Jaboticabal, p. 1-8, 1996.

DUARTE, J. M. B., VOGLIOTTI, A., ZANETTI, E. S., DE OLIVEIRA, M. L., TIEPOLO, L. M., RODRIGUES, L. F., ALMEIDA, L. B. Avaliação do risco de extinção do veado-mateiro *Mazama americana* Erxleben, 1777, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 33-41, 2012.

DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49:17-22. 2008.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**, v. 67, n. 3, p. 403-410, 2003.

DURRANT, B. S. Semen collection, evaluation, and cryopreservation in exotic animal species: maximizing reproductive potential. **ILAR Journal**, v. 32, n. 1, p. 2-10, 1990.

EDQVIST, L. E., STABENFELDT, G. H. Reproductive Hormones. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press, 2008.

EINSPANIER, A.; IVELL, R. Oxytocin and oxytocin receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 2, p. 416-422, 1997.

FAVORETTO, S. M., ZANETTI, E. S., DUARTE, J. M. B. Cryopreservation of red brocket deer semen (*Mazama americana*): comparison between three extenders. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 43(4): 820-827. 2012.

FJELLSTRÖM, D.; KIHLLSTRÖM, J. E.; MELIN, P. The effect of synthetic oxytocin upon seminal characteristics and sexual behaviour in male rabbits. **Reproduction**, v. 17, n. 1, p. 207-209, 1968.

FRAYNE, J.; NICHOLSON, H. D. Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male. **Molecular human reproduction**, v. 4, n. 6, p. 527-532, 1998.

FUCHS, A. R., HUSSLEIN, P., FUCHS, F. Oxytocin and the initiation of human parturition: II. Stimulation of prostaglandin production in human decidua by

oxytocin. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 141, n. 5, p. 694-697, 1981.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiological reviews**, v. 81, n. 2, p. 629-683, 2001.

GROUT, B.; MORRIS, J.; MCLELLAN, M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. **Trends in biotechnology**, v. 8, p. 293-297, 1990.

HARGROVE, J. L.; MACINDOE, J. H.; ELLIS, LEGRANDE C. Testicular contractile cells and sperm transport. **Fertility and sterility**, v. 28, n. 11, p. 1146-1157, 1977.

HARRIS, G. C.; NICHOLSON, H. D. Stage-related differences in rat seminiferous tubule contractility *in vitro* and their response to oxytocin. **Journal of Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 251-257, 1998.

HEMSWORTH, P. H., DONNELLY, J., FINDLAY, J. K., GALLOWAY, D. B. The effects of prostaglandin F₂ α on sperm output in boars. **Prostaglandins**, v. 13, n. 5, p. 933-941, 1977.

HESS, M. The effects of prostaglandin-F₂ α , oxytocin and gonadotropin releasing hormone on ejaculate characteristics in the dog. **Theriogenology**, 15. 2001.

HESS, M. The effects of prostaglandin-F₂ α , oxytocin and gonadotropin releasing hormone on ejaculate characteristics in the dog. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2002.

HIB, J. The '*in vivo*' effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the rat epididymis. **International journal of fertility**, v. 22, n. 1, p. 63-64, 1977.

HOLT, W. V., PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**. 4: 143-150. 1999.

HOWARD, J. G., LYNCH, C., SANTYMIRE, R. M., MARINARI, P. E., WILDT, D. E. Recovery of gene diversity using long-term cryopreserved spermatozoa and artificial insemination in the endangered black-footed ferret. **Animal Conservation**, v. 19, n. 2, p. 102-111, 2016

HOWL, J. O. H. N., RUDGE, S. A., LAVIS, R. A., DAVIES, A. R., PARSLOW, R. A., HUGHES, P. J., KIRK, C. J., MICHELL, R. H., WHEATLEY, M. A. R. K. Rat testicular myoid cells express vasopressin receptors: receptor structure, signal transduction, and developmental regulation. **Endocrinology**, v. 136, n. 5, p. 2206-2213, 1995.

IBRAHIM, M. Influence of oxytocin and prostaglandin on semen characteristics and process of ejaculation in buffalo bulls. **Acta Veterinaria Hungarica**. 82: 3–10. 1988.

JOHNSTON, L. A.; LACY, R. C. Genome resource banking for species conservation: selection of sperm donors. **Cryobiology**, v. 32, n. 1, p. 68-77, 1995.

KELLY, R. W. Prostaglandin synthesis in the male and female reproductive tract. **Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 293-304, 1981.

KNIGHT, T. W. A qualitative study of the factors affecting the contractions of the epididymis and ductus deferens of the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, 40: 19-29. 1974.

KNIGHT, T. W., LINDSAY, D. R. Short and long-term effects of oxytocin on quality and quantity of semen from rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, 21: 523-529. 1970.

KOBAYASHI, M.; HORI, T.; KAWAKAMI, E. Changes in prostaglandin E2 levels in seminal plasma during ejaculation and the effect of exogenous prostaglandin E2 on semen volume in the dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 13-0053, 2013.

KREIDER, J. L.; OGG, W. L.; TURNER, J. W. Influence of prostaglandin F2 α on sperm production and seminal characteristics of the stallion. **Prostaglandins**, v. 22, n. 6, p. 903-913, 1981.

LEIBO, S. P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 303-326, 2002.

LUDUVÉRIO, D. J. **O status taxonômico de *Cervus rufus* Illiger, 1811 e sua caracterização genética e morfológica**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2018.

MARAN, L. H. M. M. **Filogenia molecular de *Mazama americana* (*Artiodactyla: Cervidae*) como auxílio na resolução das incertezas taxonômicas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

MAUNDER, M.; BYERS, O. Technical guidelines on the management of *ex situ* populations for conservation. **Oryx**, v. 38, p. 342-346, 2004.

MAZUR, P. Principles of Cryobiology. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Ed.). **Life in the frozen state**. CRC press, 2004.

MOREIRA, N. Exame andrológico e criopreservação de sêmen em felídeos selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 41 (1): 312-315.2017.

MOSURE, W. L., MEYER, R. A., GUDMUNDSON, J.; BARTH, A. D. Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, 39: 504–506. 1998.

NIEMI, M.; KORMANO, M. Histochemical demonstration of a C-esterase activity in the seminiferous tubules of the rat testis. **Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 49-54, 1965.

PALMER, C. W., AMUNDSON, S. D., BRITO, L. F. C., WALDNER, C. L., BARTH, A. D. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. **Animal reproduction science**, v. 80, n. 3-4, p. 213-223, 2004.

PHANEUF, S., EUROPE-FINNER, G. N., VARNEY, M., MACKENZIE, I. Z., WATSON, S. P., BERNAL, A. L. Oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in human myometrial cells: involvement of pertussis toxin-sensitive and-insensitive G-proteins. **Journal of Endocrinology**, v. 136, n. 3, p. 497-NP, 1993.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2002.

PUKAZHENTHI, B. S., WILDT, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, 16: 22-46. 2004.

RAWSON, D. M.; MCGREGOR REID, G.; LLOYD, R. E. Conservation rationale, research applications and techniques in the cryopreservation of lower vertebrate biodiversity from marine and freshwater environments. **International zoo yearbook**, v. 45, n. 1, p. 108-123, 2011.

RINCÓN, A. C. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama americana* (Artiodactyla: Cervidae) a partir de um topótipo atual**. 2016. 118f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

ROLA, L. D.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Assessment of two methods for conditioning and semen collection in four species of *Mazama* genus. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 658-662, 2012.

ROLA, L. D.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Evaluation of semen characteristics of the species *Mazama americana* in captivity. **Animal Production Science**, 53(5), 472-477. 2013.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de *Mazama* Ranfinesque, 1817 do Brasil (*Artyodactyla*, *Cervidae*)**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SALVIANO, M. B., CURSINO, M. S., ZANETTI, E. D. S., ABRIL, V. V., DUARTE, J. M. B. Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (*Mazama americana*). **Biology of reproduction**, v. 96, n. 6, p. 1279-1287, 2017.

SANDOVAL, E. D. P. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama temama* (Kerr, 1792): proposição de um neótipo para a espécie**. 2019. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2019.

SCHATTEN, H.; CONSTANTINESCU, G. M. (Ed.). **Comparative reproductive biology**. Ames, IO: Blackwell, 2007.

SILVA, A. R., LIMA, G. L., PEIXOTO, G. C. X., SOUZA, A. L. P. Cryopreservation in mammalian conservation biology: current applications and potential utility. **Research and Reports in Biodiversity Studies**, v. 4, p. 1-8, 2015.

SILVA, A. R., SOUZA, A. L. P., SANTOS, E. A. A. D., LIMA, G. L., PEIXOTO, G. C. X., SOUZA, P. C., CASTELO, T. S. Formação de Bancos de Germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 219-234, 2012.

SILVA, A. R.; MORATO, R. G.; SILVA, L. D. M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal reproduction science**, v. 81, n. 1-2, p. 159-175, 2004.

SPINDLER, R. E., WILDT, D. E. Male Reproduction: Assesment, Management, assisted Breeding, and Fertility Control. In: KLEIMAN, Devra G.; THOMPSON, Katerina V.; BAER, Charlotte Kirk (Ed.). **Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management**. University of Chicago Press, 2010.

SQUIRES, E. J. **Applied animal endocrinology**. Cabi, 2010.

STAFFORD, K. J.; SPOORENBERG, J.; WEST, D. M.; VERMUNT, J. J.; PETRIE, N.; LAWOKO, C. R. The effect of electro-ejaculation on aversive behaviour and plasma cortisol concentration in rams. **New Zealand Veterinary Journal**, 44: 95–98. 1996.

THACKARE, H.; NICHOLSON, H. D.; WHITTINGTON, K. Oxytocin—its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 4, p. 437-448, 2006.

VOGLMAYR, J. K. Prostaglandin F₂ α concentration in genital tract secretions of dairy bulls. **Prostaglandins**, v. 4, n. 5, p. 673-678, 1973.

WEBB, S. D. Evolutionary history of new World cervidae. In: SCHALLER, E. S. V. G. B. **Antelopes, deer, and relatives: Fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation**, p. 38-64, 2000.

WILDT, D. E. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. **Animal Reproduction Science**, 28(1-4): 247-257, 1992.

WILDT, D. E.; ELLIS, S.; JANSSEN, D.; BUFF, J. Toward more effective reproductive science for conservation. In: HOLT, W. V. (Ed.). **Reproductive Science and Integrated Conservation**. Cambridge University Press. 2003.

WILDT, D. E.; WEMMER, C. Sex and wildlife: the role reproductive science in conservation. **Biodiversity and Conservation**. 8, 965-976. 1999.

WORLEY, R. T. S.; NICHOLSON, H. D.; PICKERING, B. T. Testicular oxytocin: an initiator of seminiferous tubule movement. In: COURTENS, J. L. **Recent progress in cellular endocrinology of the testis**. Inserm Paris, p. 205-212. 1985.

YU, I.; LEIBO, S. P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 C. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1179-1190, 2002.

ZAKAR, T.; MITCHELL, B. F. The endocrinology of late pregnancy and parturition. In: BILEZIKIAN, J. P., RAISZ, L. G., MARTIN, T. J. (Eds.) **Principles of Medical Biology**. Elsevier, 1998. p. 167-182.

ZANETTI, E. S.; MUNERATO, M. S.; CURSINO, M. S.; DUARTE, J. M. B. Comparing two different superovulation protocols on ovarian activity and fecal glucocorticoid levels in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Reproductive Biology and Endocrinology**, 12(1), 24. 2014.

ZANETTI, E. S.; POLEGATO, B. F.; DUARTE, J. M. B. Comparison of two methods of synchronization of estrus in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Animal Reproduction Science**, 117(3), 266-274. 2010.

ZANETTI, E.S., DUARTE, J.M.B., POLEGATO, B.F., GARCIA, J.M., CANOLA, J.C. Assisted Reproductive Technology. In: Duarte, J.M. B., Gonzalez, S. (Eds.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, pp. 255-270. 2010.

ZOMKUS, B. M.; HASSAPAKIS, C. L.; HOUCK, M. L. Integrating current methods for the preservation of amphibian genetic resources and viable tissues to achieve

best practices for species conservation. **Amphibian & Reptile Conservation**, v. 12, n. 2, p. 1-27, 2018.

CAPÍTULO 2 – “Efeito da Ocitocina e Cloprostenol nos parâmetros seminais de veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*) ao longo do procedimento de eletroejaculação”

Cláudia Maria Herédias-Ribas*, José Maurício Barbanti Duarte

Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp/Jaboticabal)

***Autor correspondente:** herediasribas@gmail.com

ABSTRACT

A formação de bancos de germoplasma é uma das estratégias de conservação *ex situ* no qual podem ser criopreservados diferentes tipos celulares. Procedimentos de criopreservação de gametas permite que a genética seja preservada e usada em programas de reprodução assistida. Entre os gametas, a célula espermática pode ser coletada por diferentes técnicas, incluindo a eletroejaculação, que é utilizada em animais selvagens devido à possibilidade de coletar animais em vida selvagem e em cativeiro. Para minimizar os efeitos deletérios da técnica, o uso de protocolos hormonais com ocitocina e cloprostenol (prostaglandina sintética F2 α) tem sido associado. Esses protocolos demonstraram aumentar o volume e a concentração seminais, além de reduzir o tempo e o número de estímulos necessários para a eletroejaculação para ações que favoreçam a contração da musculatura lisa dos túbulos seminíferos e epidídimo. Assim, no presente estudo, o objetivo foi avaliar se protocolos utilizando ocitocina e cloprostenol (associados ou não) podem aumentar o volume e a concentração hormonal de *Mazama rufa* durante o procedimento de eletroejaculação sem alterar os parâmetros de avaliação seminal. Foi demonstrado que não houve aumento significativo no volume e na concentração espermática entre

os tratamentos realizados. O tratamento utilizando apenas cloprostenol apresentou os piores resultados, o que não foi indicado para a coleta de sêmen de *M. rufa*.

Keywords: Cervidae, veado-mateiro-do-sul, biotecnologias reprodutivas, colheita de sêmen, estimulação hormonal.

1. INTRODUÇÃO

É notório que nos últimos anos tem sido crescente a preocupação global com o bem-estar do ambiente principalmente pela possibilidade de que muitas espécies estejam entrando em processo de extinção por causas não naturais e não por processos evolutivos lentos como esperado (WILDT, 1992; HOLT; PICKARD, 1999). Tais processos de extinção são acelerados por ações que interferem diretamente no sucesso reprodutivo, como a incapacidade de encontrar parceiros reprodutivos e endogamia, levando a diminuição artificial e crescente de populações, principalmente devido à agricultura em larga escala, caça e pesca predatórias, silvicultura, extração mineral e vegetal, desvio e armazenamento de água, construção de estradas e urbanização (WILDT, 1992; HOLT; PICKARD, 1999). Assim sendo, se faz necessário o desenvolvimento e aplicação de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* para as espécies silvestres com diferentes graus de ameaça.

Um dos desafios para a implementação de programas de conservação, seja *in situ* ou *ex situ*, é a falta de disponibilidade de material biológico que possa ser utilizado em técnicas reprodutivas (eg. Inseminação artificial) com a finalidade de maximizar a eficiência reprodutiva e assim aumentar populações de espécies criticamente ameaçadas. Entre as estratégias utilizadas está a criação de bancos de germoplasma onde são criopreservados gametas, embriões e células somáticas, proporcionando que a genética, tanto de animais em cativeiro como de vida livre, seja preservada e

usada em programas de reprodução assistida de planos de manejo de espécies, permitindo a manutenção da diversidade genética (ZANETTI *et al.*, 2010).

A criopreservação de sêmen é de grande importância, sobretudo por proporcionar facilidades e vantagens como a transferência de material genético entre instituições e zoológicos, eliminando assim os problemas relacionados com o transporte de animais, custo, suscetibilidade ao estresse, incompatibilidade de indivíduos, disseminação de doenças e injúrias (PUKAZHENTHI, WILDT, 2004). A colheita de sêmen pode ser realizada por diferentes técnicas como a vagina artificial, eletroejaculação, colheita de sêmen do epidídimo e biopsia testicular (BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998, SILVA; MORATO; SILVA, 2004, SPINDLER; WILDT, 2010, SILVA *et al.*, 2012, SILVA *et al.*, 2015). Para animais selvagens, a técnica de escolha tem sido a eletroejaculação principalmente pelo fato de se permitir a coleta de animais de vida livre e cativos, sem a necessidade de que o animal apresente libido (SPINDLER; WILDT, 2010).

Estudos realizados com animais domésticos demonstraram que há aumento de volume seminal e na quantidade de células espermáticas após a aplicação intravenosa de ocitocina cinco minutos antes da colheita de sêmen (KNIGHT; LINDSAY, 1970; BERNDTSON; IGBOELI, 1988; ASSINDER *et al.*, 2010). Isso ocorre, pois a ocitocina estimula a contratilidade de músculo liso do epidídimo aumentando, assim, o transporte de espermatozoides pelos ductos antes e durante a ejaculação (KNIGHT, 1974; BERNDTSON; IGBOELI, 1988). A prostaglandina F₂ α (PGF) também tem a capacidade de aumentar a contratilidade de musculatura lisa tanto em fêmeas como em machos, podendo favorecer o processo de ejaculação como já

demonstrado em cães, garanhões, búfalos e bovinos (CORNWELL; KOONCE; KREIDER, 1974; HESS, 2002; IBRAHIM, 1988; PALMER *et al.*,2004).

Dessa forma, no presente trabalho o objetivo foi avaliar se o uso de fármacos como ocitocina e cloprostenol (análogo sintético da prostaglandina F2 α) aumenta a concentração espermática e o volume seminal de veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*) sem alteração dos parâmetros indicadores de qualidade seminal ao longo do procedimento de eletroejaculação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Para esse estudo foram utilizados quatro machos adultos da espécie *Mazama rufa* (veado-mateiro-do-sul) alojados em baias individuais de 12m² no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV – Unesp/Jaboticabal. Diariamente foram oferecidos água *ad libitum* e dieta constituída por ração equina (15% proteína bruta, 10% fibra bruta, 5% de extrato etéreo; Purina Co., Paulínia, Brasil) e aproximadamente 1kg/animal/dia de soja perene (*Neonotonia wigthii*), rami (*Bohemea livia*) ou ramos de amoreira (*Morus alba*) frescos.

Todos os procedimentos realizados neste experimento foram avaliados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da unidade de Ensino (processo nº 4620/2018) que aprovou e certificou sua conformidade com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

2.2. Procedimentos gerais

Para a colheita de sêmen, os animais foram contidos quimicamente com a associação de 1mg/kg de xilazina e 7mg/kg de cetamina, por via intramuscular (IM).

Após decúbito lateral, os animais tiveram o reto esvaziado para que não houvesse interferência das fezes sobre a condução dos estímulos elétricos e tiveram ainda o prepúcio lavado com solução fisiológica a 0,9%.

As colheitas foram realizadas a cada 35 dias por eletroejaculação utilizando a metodologia descrita por Favoretto, Zanetti e Duarte (2012) modificada. O eletroejaculador (P-T Eletronics®; Boring, OR; USA) consiste em um aparelho gerador de estímulos elétricos e uma probe com 2,0cm de diâmetro e 28,0 cm de comprimento com três eletrodos longitudinais ao longo de sua superfície e com distância de 1,5cm entre cada eletrodo. Durante a colheita de sêmen, cada macho recebeu 10 estímulos (eletrochoques) com intensidade variando de 250mA a 750mA, com duração de 3 segundos cada e com 3 segundos de descanso entre estímulos. Foram realizados três ciclos de 10 estímulos com intervalo de 5 minutos entre ciclos para colheita de sêmen em tubo cônico previamente aquecido em banho-maria (37°C). O tubo de colheita de sêmen foi trocado a cada ciclo de eletro estímulos, sendo mantido em banho-maria (37°C) até o momento da avaliação que era realizada independentemente com a finalidade de avaliar se haveriam alterações dos parâmetros seminais nos diferentes tempos de um mesmo procedimento de eletroejaculação.

2.3. Tratamento hormonal

Cada animal foi submetido a cinco colheitas de sêmen, sendo a primeira colheita realizada para esvaziamento do trato reprodutor (PALMER et al., 2003) e nas colheitas seguintes submetido a um tratamento diferente (Figura 07). Os tratamentos foram administrados via intramuscular (IM) 10 minutos antes do início do estímulo de eletroejaculação, sendo eles: 1) 0,5 ml de solução salina (Tratamento Controle), 2) 20

UI de ocitocina (Ocitocina Forte, UCBVet Saúde Animal, Jaboticabal, SP, Brasil; Tratamento Ocitocina), 3) 0,25 mg de cloprostenol (prostaglandina sintética, Ciosin®, MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil; Tratamento Cloprostenol), 4) 20 UI de ocitocina + 0,25 mg de cloprostenol (Tratamento Associação). A sequência de tratamentos seguindo o delineamento experimental de quadrado latino de forma que a sequência de tratamentos nunca se repetiu para dois animais, eliminando assim, o efeito da sequência dos tratamentos e do efeito individual.

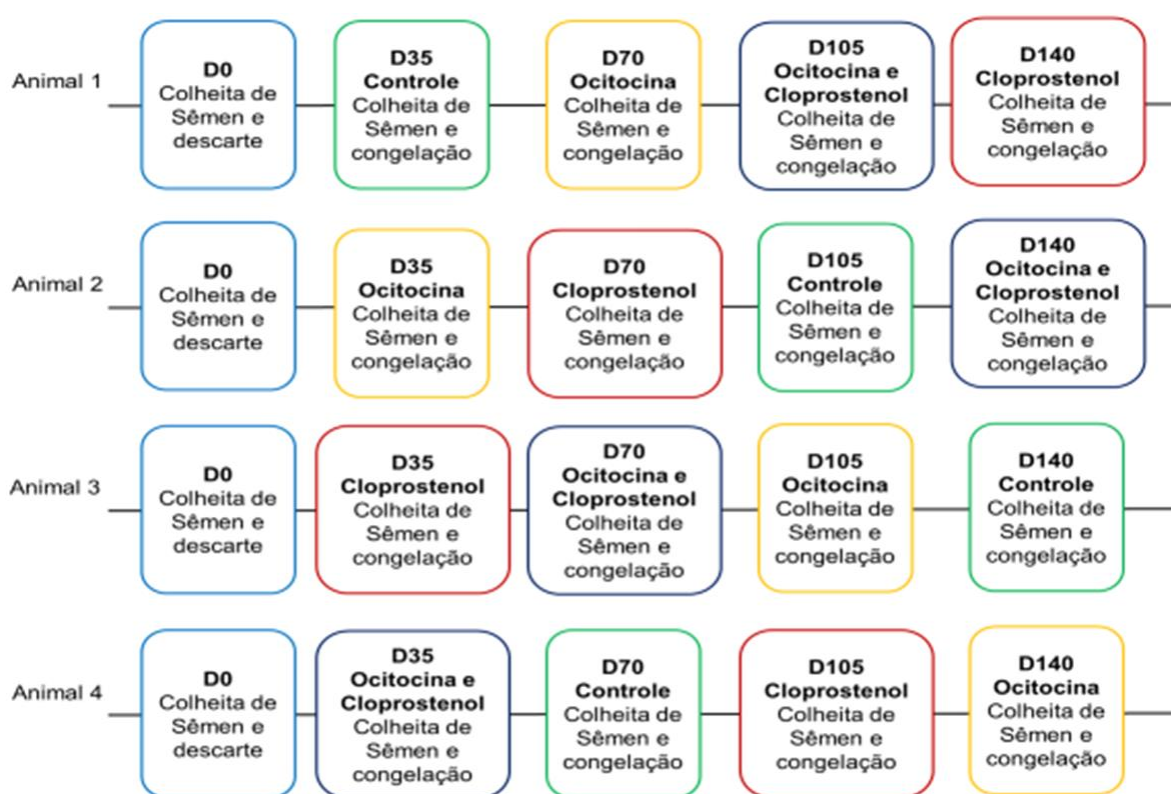


Figura 7. Esquema de colheita de sêmen em veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*) com a sequência entre tratamentos distribuídos através de quadrado latino no qual os tratamentos nunca se repetem entre os animais e colheitas.

2.4. Avaliação espermática

O sêmen foi avaliado quanto às características físicas e morfológica conforme sugere o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), sendo realizadas por um único avaliador que não sabia qual o tratamento aplicado para eliminar o efeito

avaliador (duplo cego). Cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume (micropipeta automática, μl), cor (esbranquiçada, branca, marfim, amarela ou outra), aspecto (cremoso, leite ou aquoso), pH (fita reagente Merck, Darmstadt, Alemanha), turbilhonamento (movimento em massa dos espermatozoides, 0 a 5) utilizando sêmen fresco sem diluição. Devido à alta concentração de espermatozóides no ejaculado de cervídeos do gênero *Mazama* ($1.100 - 3.995 \times 10^6$ espermatozóides/ml para *M. americana*, FAVORETTO; ZANETTI; DUARTE, 2012), o sêmen recebeu uma diluição inicial (1:2) de Tris-Gema (tampão Tris, glicerol, ácido cítrico, glicose, água destilada e gema de ovo) para então ser avaliado quanto ao vigor (intensidade de movimento flagelar dos espermatozoides, 0 a 5), motilidade (proporção de espermatozoides móveis, %), além de ser avaliado quanto a integridade de acrossoma utilizando coloração simples para acrossoma (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991), integridade de membrana plasmática utilizando corante supra vital (eosina-nigrosina).

A concentração espermática foi realizada com uma alíquota de sêmen fresco, sem diluidor, fixado em formol salina (diluição 1:200) utilizando câmara hemocitométrica de Neubauer obtendo a concentração por mililitro de ejaculado (sptz $\times 10^9/\text{ml}$) e em seguida a concentração de espermatozoides em cada ejaculado. Após obtenção da concentração espermática do ejaculado, foi realizada a correção de quantidade de diluidor (TRIS-gema) necessária para o sêmen ser envasado em palhetas de 0,25ml com dose inseminante de 25×10^6 espermatozoides.

2.5. Análise dos dados

Os dados seminais foram apresentados e analisados por estatística descritiva (média e erro padrão) utilizando o software R (R Development Core Team, 2013). Para verificar se há diferença entre os tratamentos, entre os ejaculados dentro de um

mesmo tratamento e dos ejaculados entre os diferentes tratamentos, foi primeiramente realizado teste de normalidade de resíduos através do teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância e teste de homogeneidade de variância através do teste de Bartlett a 5% de significância. A partir dos resultados dos testes mencionados, foram realizados teste F para dados paramétricos e Tukey para não paramétricos também a 5% de significância.

3. RESULTADOS

Os ejaculados foram obtidos em praticamente todas as tentativas de colheita, sendo que quatro procedimentos de colheita de sêmen (dois tratamentos controles, um tratamento cloprostenol e um tratamento ocitocina) iniciaram a ejaculação antes do procedimento de eletroejaculação (T0), possivelmente devido ao relaxamento provocado pelos anestésicos administrados.

Todas as amostras foram classificadas com a cor branca e seu aspecto variando de cremoso, leitoso a aquoso indicando uma maior ou menor proporção de plasma seminal e células espermáticas na amostra. Os resultados da avaliação espermática obtidos sob o uso dos tratamentos hormonais são apresentados nas Figuras 1 e 2.

Os tratamentos foram comparados as diferenças significativas foram encontradas para pH ($p=0,004$), vigor ($p=0,0002$), motilidade ($p=0,003$), número de células espermáticas no ejaculado ($p=0,03$) e porcentagem de células com membrana plasmática íntegra ($p=0,006$).

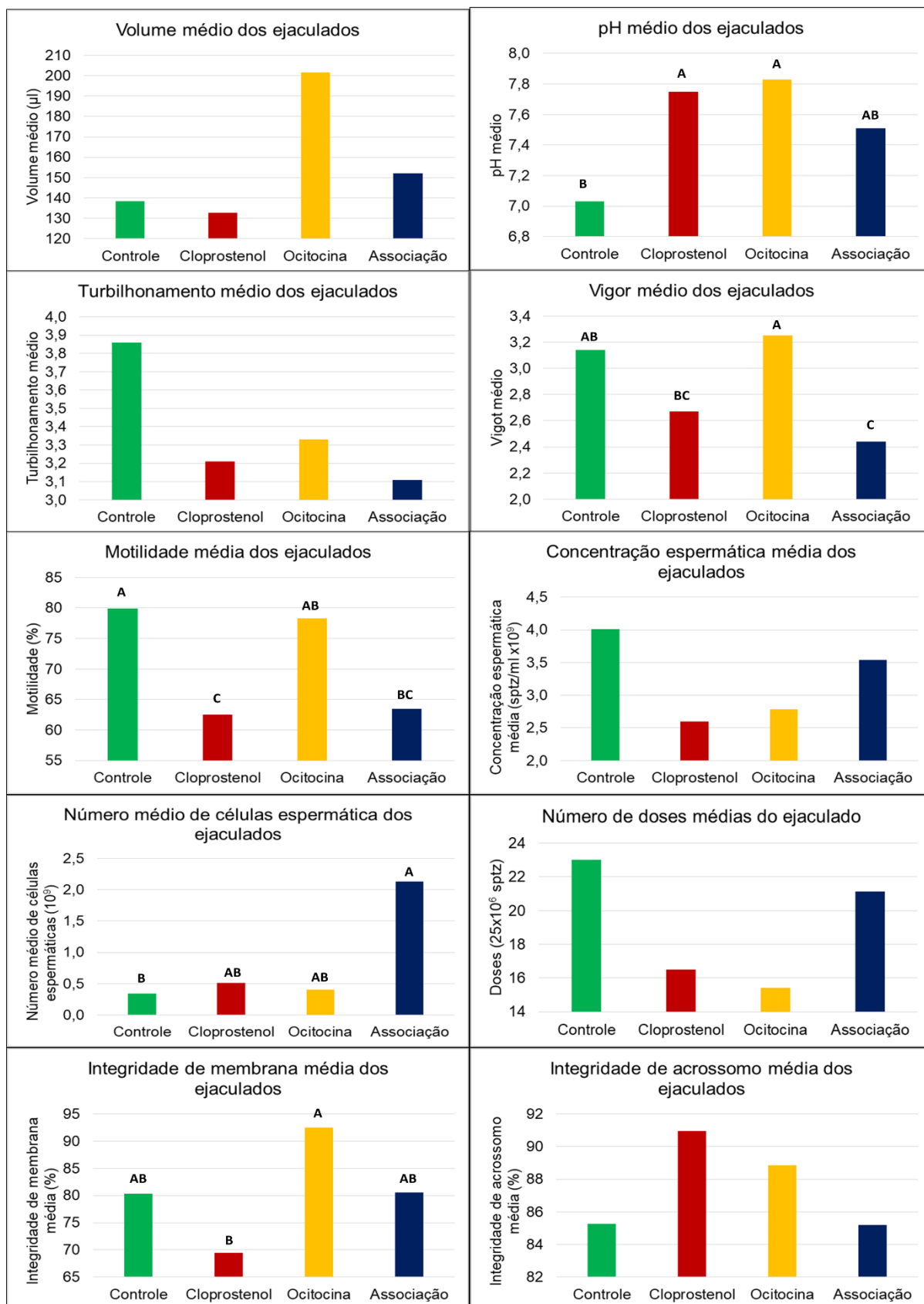


Figura 1. Representação gráfica da avaliação espermática média de diferentes ejaculados de veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*) colhido por meio de eletroejaculação sob efeito de cloprostenol (PGF₂α),

ocitocina, associação de ocitocina e cloprostenol ou solução fisiológica (tratamento controle) Sendo: Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos quanto ao ejaculado como todo.

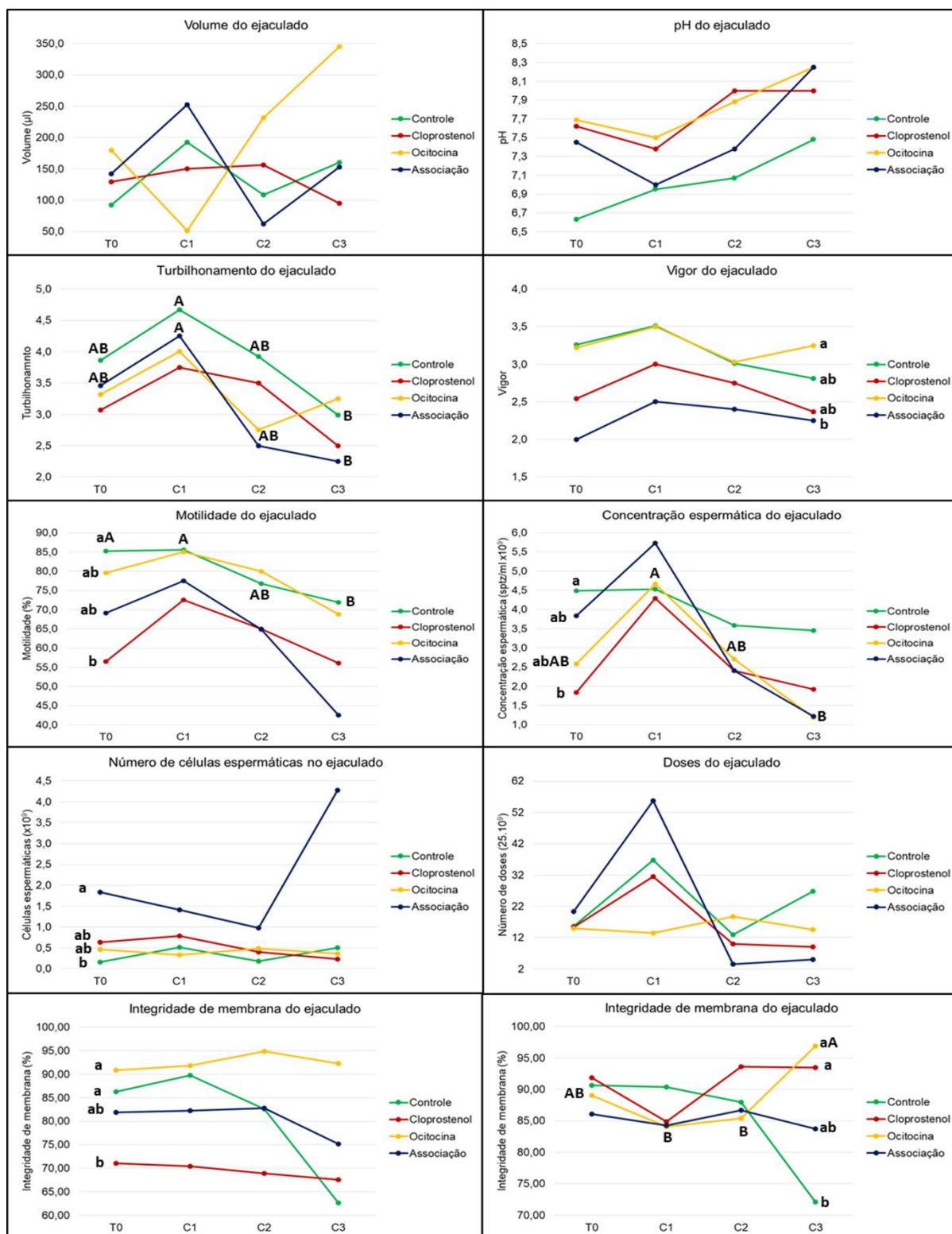


Figura 2. Representação gráfica da avaliação seminal de diferentes ejaculados de veado-mateiro-dosul (*Mazama rufa*) colhido por meio de eletroejaculação sob efeito de cloprostenol (PGF₂α), ocitocina, associação de ocitocina e cloprostenol ou solução fisiológica (tratamento controle). Sendo: **T0**= ejaculado obtido antes dos procedimento de eletroejaculação; **C1**= ejaculado obtido depois do primeiro ciclo de eletroejaculação; **C2**= ejaculado obtido depois do segundo ciclo de eletroejaculação; **C3**=

ejaculado obtido depois do terceiro ciclo de eletroejaculação. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos quanto ao ejaculado como todo ou individualmente e letras maiúsculas indicam diferenças entre os ejaculados dentro de um mesmo tratamento.

4. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro trabalho avaliando as características da espécie veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*) que foi recentemente descrito (LUDUVÉRIO, 2018), espécie até então considerada na sinonímia de veado-mateiro (*Mazama americana*).

Suas características seminais quanto ao volume médio o volume médio total, assim como as demais características seminais estão dentro do padrão encontrado para *Mazama americana*, espécie próxima filogeneticamente da espécie aqui estudada (ROLA; ZANETTI; DUARTE, 2013).

A ocitocina e a prostaglandina são tradicionalmente conhecidas como hormônios envolvidos na reprodução de fêmeas, facilitando a contração uterina e a ejeção de leite durante a lactação e mais recentemente estudos têm mostrado seu papel endócrino na reprodução de machos, principalmente no processo de ejaculação (EL-BADRY; GABAR; SHAKER, 2013). Ainda não se conhece totalmente os mecanismos de produção e ação da ocitocina no aparelho reprodutor masculino, porém Filippi et al. (2002) demonstraram a presença de receptores de ocitocina no epidídimo de humanos e ratos, sugerindo que este hormônio possui como função principal controlar algumas, se não todas, as funções do epidídimo. A ocitocina terá então ação na musculatura lisa do testículo e do epidídimo promovendo o transporte e a maturação dos espermatozoides (FILIPPI et al., 2002; EL-BADRY; GABAR; SHAKER, 2013).

Aplicações de ambos os hormônios podem promover o aumento do número de células no ejaculado em equinos, bovinos, coelhos e pequenos ruminantes (PALMER

et al., 2004, UNGERFELD et al., 2016). Para a espécie estudada este resultado foi encontrado apenas no tratamento associação que foi diferente significativamente do tratamento controle, porém semelhante ao tratamento ocitocina e cloprostenol.

Os protocolos que usaram prostaglandina foram os protocolos que tiveram as maiores taxas de espermatozoides com lesão de membrana plasmática possivelmente pelo fato da prostaglandina exercer papel no controle seletivo da membrana fosfolipídica do espermatozoide durante a capacitação espermática, processo importante na fecundação do oócito (VOGLMAYR, 1973, KELLY, 1981). A utilização de tal protocolo pode ter adiantando o processo de maturação e capacitação espermática deixando o espermatozoide susceptível a lesão de membrana plasmática.

Não foi encontrada na literatura trabalhos em que a colheita de sêmen foi avaliada durante o procedimento de eletro ejaculação como realizado neste trabalho. Oliveira et al. (2012), após colheitas de sêmen sucessivas de ovinos utilizando vagina artificial, observaram que há um declínio nos parâmetros indicadores de qualidade seminal. Para este estudo, houve um decaimento significativo de turbilhonamento (controle, tratamento ocitocina e tratamento associação), motilidade (tratamento controle) e concentração espermática (tratamento ocitocina), além do aumento da lesão acrossoma (tratamento ocitocina), sugerindo então que os primeiros ciclos de eletroejaculação podem fornecer sêmen com melhor qualidade de seus parâmetros.

A maioria dos estudos que administram esses hormônios antes do procedimento de colheita de sêmen tentam mostrar que seu uso diminui o tempo e estímulos necessários para a ejaculação (PALMER et al., 2004, UNGERFELD et al., 2016), mas este parâmetro não foi avaliado no presente estudo. Entretanto, os

protocolos hormonais utilizados nesse estudo aumentaram o número de células espermáticas do ejaculado sem alterar o tempo de contenção química para conclusão do procedimento, pois não foi necessária a aplicação de se elevar a dose ou repetir a aplicação de anestésicos.

5. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que não há o aumento volume do ejaculado e concentração de células espermáticas coletados por eletroejaculação associados a protocolos hormonais de ocitocina e/ou cloprostenol. Também foi observado que os primeiros ciclos de estímulos elétricos apresentam parâmetros indicadores de qualidade seminal melhores, sugerindo que o procedimento de eletroejaculação pode ser encerrado assim que houver a ejaculação sem comprometer o volume e característica seminal.

Assim, com base nos resultados apresentados, sugerimos que não seja utilizado protocolo de cloprostenol associado ao protocolo de eletro ejaculação para a espécie veado-mateiro-do-sul (*Mazama rufa*).

6. AGRADECIMENTOS

À Equipe do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) pela ajuda nas coletas e manejo dos animais. Ao Prof. Dr. Alan Rodrigo Panosso pela ajuda com a análise estatística.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

7. LITERATURA CITADA

ASSINDER, S. J., CAREY, M., PARKINSON, T., NICHOLSON, H. D. Oxytocin and vasopressin expression in the ovine testis and epididymis: changes with the onset of spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, 43: 448-456. 2000.

BAINBRIDGE, D. R. J.; JABBOUR, H. N. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Veterinary record**, v. 143, n. 6, p. 159-168, 1998.

BERNDTSON, W., IGBOELI, G. Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of Holstein bulls electroejaculated after administration of oxytocin. **Journal of Reproduction and Fertility**, 82: 467–475. 1988.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2013.

CORNWELL, J., KOONCE, K., KREIDER, J., Effect of prostaglandin F2 α on seminal characteristics of the stallion. **Journal of Animal Science**. 38: 226. 1974.

EL-BADRY, D. A., GABAR, F. I., SHAKER, M. H. The effect of oxytocin, prostaglandin F2 α or GnRH injection on fresh and frozen-thawed semen characteristics of Rams. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 59, p. 2014-229, 2013.

FAVORETTO, S. M., ZANETTI, E. S., DUARTE, J. M. B. Cryopreservation of red brocket deer semen (*Mazama americana*): comparison between three extenders. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 43(4): 820-827. 2012.

FILIPPI, S., VANNELLI, G. B., GRANCHI, S., LUCONI, M., CRESCIOLI, C., MANCINA, R., NATALI, A., BROCCHI, S., VIGNOZZI, L., BENCINI, E., NOCI, I., LEDDA, F., FORTI, G., MAGGI, M. Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 193, n. 1-2, p. 89-100, 2002.

HESS, M. The effects of prostaglandin-F2 α , oxytocin and gonadotropin releasing hormone on ejaculate characteristics in the dog. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2002.

HOLT, W. V., PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**. 4: 143-150. 1999.

IBRAHIM, M. Influence of oxytocin and prostaglandin on semen characteristics and process of ejaculation in buffalo bulls. **Acta Veterinaria Hungarica**. 82: 3–10. 1988.

KELLY, R. W. Prostaglandin synthesis in the male and female reproductive tract. **Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 293-304, 1981.

KNIGHT, T. W. A qualitative study of the factors affecting the contractions of the epididymis and ductus deferens of the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, 40: 19-29. 1974.

KNIGHT, T. W., LINDSAY, D. R. Short and long-term effects of oxytocin on quality and quantity of semen from rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, 21: 523-529. 1970.

LUDUVÉRIO, D. J. **O status taxonômico de *Cervus rufus* Illiger, 1811 e sua caracterização genética e morfológica**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2018

OLIVEIRA, M. E. F., ALMEIDA, O. M., PINHO, R. O., VICENTE, W. R., RODRIGUES, L. F. S. Behavioural and seminal characteristics of Santa Ines rams subjected to successive semen collections in the Amazonian region. **Italian Journal of Animal Science**, v. 11, n. 4, p. e67, 2012.

PALMER, C. W., AMUNDSON, S. D., BRITO, L. F. C., WALDNER, C. L., BARTH, A. D. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. **Animal reproduction science**, v. 80, n. 3-4, p. 213-223, 2004.

POPE, C. E., ZHANG, Y. Z., DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, 22: 87-95, 1991.

PUKAZHENTHI, B. S., WILDT, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, 16: 22-46. 2004.

ROLA, L. D., ZANETTI, E. S., DUARTE, J. M. B. Evaluation of semen characteristics of the species *Mazama americana* in captivity. **Animal production science**, v. 53, n. 5, p. 472-477, 2013.

SILVA, A. R., LIMA, G. L., PEIXOTO, G. C. X., SOUZA, A. L. P. Cryopreservation in mammalian conservation biology: current applications and potential utility. **Research and Reports in Biodiversity Studies**, v. 4, p. 1-8, 2015.

SILVA, A. R., SOUZA, A. L. P., SANTOS, E. A. A. D., LIMA, G. L., PEIXOTO, G. C. X., SOUZA, P. C., CASTELO, T. S. Formação de Bancos de Germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 219-234, 2012.

SILVA, A. R.; MORATO, R. G.; SILVA, L. D. M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal reproduction science**, v. 81, n. 1-2, p. 159-175, 2004.

SPINDLER, R. E., WILDT, D. E. Male Reproduction: Assesment, Management, assisted Breeding, and Fertility Control. In: KLEIMAN, Devra G.; THOMPSON, Katerina V.; BAER, Charlotte Kirk (Ed.). **Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management**. University of Chicago Press, 2010.

UNGERFELD, R., ABRIL-SÁNCHEZ, S., TOLEDANO-DÍAZ, A., BERACOCHEA, F., CASTAÑO, C., GIRIBONI, J., Santiago-Moreno, J. Oxytocin administration before sperm collection by transrectal ultrasonic-guided massage of the accessory sex glands in mouflons and bucks. **Animal reproduction science**, v. 173, p. 13-17, 2016.

VOGLMAYR, J. K. Prostaglandin F₂α concentration in genital tract secretions of dairy bulls. **Prostaglandins**, v. 4, n. 5, p. 673-678, 1973.

WILDT, D. E. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. **Animal Reproduction Science**, 28(1-4): 247-257, 1992.

ZANETTI, E.S., DUARTE, J.M.B., POLEGATO, B.F., GARCIA, J.M., CANOLA, J.C. Assisted Reproductive Technology. In: Duarte, J.M. B., Gonzalez, S. (Eds.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, pp. 255-270. 2010.