

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE ISOLAMENTO REPRODUTIVO
ENTRE DISTINTOS CITÓTIPOS DE VEADO-MATEIRO
(*Mazama americana*) POR MEIO DE MACHOS HÍBRIDOS

Maurício Barbosa Salviano
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Fevereiro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE ISOLAMENTO REPRODUTIVO
ENTRE DISTINTOS CITÓTIPOS DE VEADO-MATEIRO
(*Mazama americana*) POR MEIO DE MACHOS HÍBRIDOS

Maurício Barbosa Salviano

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 (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2011

Salviano, Maurício Barbosa

S184a Avaliação da existência de isolamento reprodutivo entre distintos
cit[otipos de veado-mateiro (*Mazama americana*) por meio de machos
híbridos / Maurício Barbosa Salviano. – – Jaboticabal, 2011
xiii, 63 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

Banca examinadora: Luiz Renato de França, Vera Fernanda
Martins Hossepian de Lima

Bibliografia

1. Citótipos. 2. Reprodução. 3. *Mazama americana* I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:639.111.1

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAURÍCIO BARBOSA SALVIANO - Nasceu em Teresina no Estado do Piauí no dia 5 de Setembro de 1984, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Piauí, Campus do Socopo em 2003 e graduou-se em de 2007. Foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Piauí (PIBIC-UFPI) durante o ano de 2003 com projeto de envolvendo Patologia Clínica em ovinos; bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) nos anos de 2004, 2005 e 2006 com projetos de Reprodução Animal e bolsista-extensionista do Projeto Universidade no Campo pela Prefeitura Municipal de Teresina em 2007. Em 2009, ingressou no Programa de Mestrado em Medicina Veterinária e desde então é bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais (Adeodate e Margareth Salviano) por não medir esforços para fazer desta oportunidade um sonho concretizado. À minhas irmãs (Christine e Ivana) por todo o apoio, amizade, amor e carinho. Aos meus sobrinhos Wolner Neto e Ivna, por todo o carinho e diversão nos momentos que um simples sorriso de criança valia muito mais que uma bolsa FAPESP no bolso! Ao meu cunhado Woner Filho e meu amigo Tadeu Filho por tornarem animados meus dias de “férias” no Piauí.

O apoio e amor familiar é a maior dádiva que uma pessoa pode receber. Neste tópico tenho o orgulho de dizer que fui bem assistido por Deus. Logo, não há como não recordar meus avós paternos Luiz (*in memorian*) e Cotinha Salviano e maternos Xavier e Ivan. À todos os meus tios Chico Leal, Carlos Henrique, Xavier Filho, Jandira, Jacira, Núbia, Joseana, e, lembrando em especial meus tios e padrinhos Maurício e Jovenília. Aos primos Luiz Neto, Carlos Henrique Filho, Ulisses, Leonardo, Frederico, Bruno, Rômulo, Samuel, Daniele, Luciana, Viviane, Érika, Débora, Andréa, Gabriela, Beatriz e Fernanda (*in memorian*). Ao meus “primos-sobrinhos” Vitória, Fernanda, Matheus, Victor e Maria Luiza.

Agradecer à minha Banca de Qualificação (Professores Paulo Franceschini e Cézar Esper), à minha Banca de Defesa (Professores Vera Fernanda e Luiz França) e em especial ao meu orientador, Prof. Maurício Barbanti, pela oportunidade e confiança por me deixar conduzir este trabalho tão importante para o Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos e para mim.

Como falar em agradecimentos e não falar nos nupeccianos que transformaram momentos angustiosos pela distância da família em momentos de alegria. São eles o excepcional grupo da reprodução liderados pela Dra. Eveline, Janota, Nazira, Barrakera, Palomina às Gabrielas (Traçada e A_Outra), Chrissie, Titi-ti e Mimete. Ao povo companheiro da Citogenética, liderados pela Dra. Vanessa, Javier, Iara, Juliana e Xiro-Biru. Ao povo gastador da Molecular: Márcio, Pedro, Marina, Caju e Kokotinha. Ao povo *positive vibration* da Ecologia: Maumau,

Ana, Josi, Lumbriga, Leo, Larissa e Geléia. Aos técnicos do laboratório João Boer e Paulo Tosta.

É com imenso prazer que agradeço à minha grande amiga Marina Piçiroca todo o apoio ao nosso trabalho, pelas dicas no trabalho, pelas referências muitas vezes discutidas... Piçi, muito obrigado

Agradeço ao pessoal da República Xic Nu Último pela amizade, hospedagem e companherismo, afinal “República ensina a viver”, em especial: Xurraskero, Marca-Paço, Shrek, Castor, K-Marguinho, Berrei, Bitiuva, Môrróida, Pó, K-ba, Lakraia e Aminésia. Às repúblicas amigas: As Bardosas, Coyotes, Nostravamus, Nazarena, Madalena, Canekão, Chopp Yakuza e demais. À galera da Rep. Antro-do-HV em especial: Bozo, Beto, Márcio, Viçosa, Felipe, Dedo, Psico, Pedro Paulo, Evandro, Marguinho e Miguel.

Existem pessoas que chegam do nada na sua vida transformam tudo e lhe fazem enxergar as coisas de outro modo, por isso agradeço muito à minha grande amiga Estrelinha pelo apoio, carinho e pela nova visão que agora tenho dos animais a que sempre servimos!

Para finalizar gostaria de agradecer um dos principais responsáveis por essa conquista... Deus!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A espécie <i>Mazama americana</i>	3
2.2. Especiação e isolamento reprodutivo.....	5
2.3. Aspectos reprodutivos de híbridos machos.....	11
III. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Animais	17
3.2. Manejo de cativeiro	18
a) Instalações:	19
b) Alimentação:	19
3.3. Contenção e colheita de material	19
3.4. Avaliação reprodutiva.....	20
3.4.1. Avaliação do sêmen	20
3.4.2. Histologia.....	21
3.4.3. Dosagem hormonal	23
a) <i>Processamento inicial das amostras:</i>	23
b) <i>Extração dos metabólitos fecais:</i>	23
c) <i>Ensaio Imunoenzimático (EIA):</i>	23
3.4.4. Complexo sinaptonêmico	24
3.5. Análise estatística	25
IV. RESULTADOS	27

4.1. Avaliação do sêmen	27
4.2. Dosagens de metabólitos de testosterona e morfologia dos chifres	29
4.3. Avaliações histológicas	31
4.4. Avaliação dos complexos sinaptonêmicos	37
V. DISCUSSÃO	39
VI. CONCLUSÕES	47
VII. IMPLICAÇÕES	48
VIII. REFERÊNCIAS	49

ABREVIATURAS

2N = Número diplóide

A = Espermatogônia do tipo A

B = Espermatogônia do tipo B

DCAP = Diferença cromossômica autossômica entre os parentais

DMEM = Meio essencial mínimo modificado de Dulbecco

EIA = Ensaio imunoenzimático

H-LD = Cruzamento híbrido de linhagens evolutivas diferentes

H-ML = Cruzamento híbrido de mesma linhagem evolutiva

Id = Identificação do animal

LZ = Célula na fase de leptóteno ou zigóteno

NF = Número fundamental

NUPECCE = Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos

P = Cruzamento puro

Pq = Paquíteno

S = Célula de Sertoli

Ar = Espermátide arredondada

Sptz = Espermatozóides

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Espécimes machos de veado-mateiro (*Mazama americana*), à esquerda animal T251 oriundo do citótipo juína e seu cariótipo e à direita animal T205 oriundo do citótipo Paraná e seu cariótipo. 2
- Figura 2. Mapa do Brasil detalhado com as localizações de obtenção dos animais parentais. Fonte: ABRIL et al. (2010) 17
- Figura 3. Perfil dos metabólitos fecais de andrógenos (pg/g de fezes) de acordo com a idade (7 - 18 meses) da prole de veados-mateiro (*Mazama americana*) com as descrições do aspecto dos chifres aos seis, 12 e 18 meses..... 30
- Figura 4. Diâmetro (μm) dos túbulos seminíferos da prole veados-mateiros (*Mazama americana*) de acordo com o tipo de cruzamento. Colunas sobpostas à “ns” não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). 32
- Figura 5. Altura do epitélio seminífero da prole de veados-mateiro (*Mazama americana*) de acordo com o tipo de cruzamento. Colunas sobpostas à mesma letra não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($P>0,05$). 33
- Figura 6. Fotomicrografias de cortes histológicos do animal 2, mostrando a morfologia das células do epitélio seminífero de veados-mateiro (*Mazama americana*). Entende-se por A uma espermatogônia do tipo A, B – espermatogônia do tipo B, LZ – células Leptóteno/Zigóteno, Pq – célula em paquíteno, Ar - espermátide arredondada e S – células de Sertoli. 34

Figura 7. Fotomicrografia de um túbulo seminífero do animal 6 onde podem ser observadas vacuolizações (seta branca) do epitélio e células não identificáveis com núcleos condensados e picnóticos (seta negra). 35

Figura 8. Eletronmicrografia de espermatócito primário do animal 4. Onde: 1 – vista panorâmica da célula, 2 – detalhe do interior da célula apresentando uma configuração sugestiva de trivalente, indicada pelos cromossomos a, b e c, além de extremidades não pareadas (setas negras); 3 – esquema ilustrativo dos detalhes 2. 38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Animais experimentais e seus respectivos progenitores, distância cromossômica autossômica entre os parentais (DCAP) e *status* do cruzamento..... 22
- Tabela 2. Parâmetros seminais da prole de veados-mateiro (*Mazama americana*) produtos do cruzamento de vários citótipos aos 18 meses de idade ... 27
- Tabela 3. Porcentagem de anormalidades (patologias) espermáticas da prole de veados-mateiros (*Mazama americana*) aos 18 meses de idade 28
- Tabela 4. Médias (desvios padrão) da micromorfometria dos espermatozóides da prole de prole de veados-mateiro (*Mazama americana*) 28
- Tabela 5. Médias (desvios padrão) das porcentagens dos tipos celulares intratubo seminífero da prole de veados-mateiros (*Mazama americana*)..... 36

AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE ISOLAMENTO REPRODUTIVO ENTRE DISTINTOS CITÓTIPOS DE VEADO-MATEIRO (*MAZAMA AMERICANA*) POR MEIO DE MACHOS HÍBRIDOS

RESUMO - A espécie *Mazama americana* tem sido bastante estudada nas áreas de ecologia, genética e reprodução devido às recentes dúvidas quanto à validade de seu táxon. Estudos citogenéticos e moleculares demonstram que atualmente este táxon é composto de uma espécie que apresenta até seis citótipos diferentes. Instituições voltadas à conservação classificam este táxon como “Dados insuficientes”, devido às incertezas taxonômicas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a fertilidade dos animais resultantes de cruzamentos intra e intercitótipos para inferir sobre a existência de isolamento reprodutivo entre os citótipos e conclusões acerca da existência de espécies novas. Foram avaliados o sêmen, histologia testicular, perfil de metabólitos fecais de testosterona e a meiose de sete animais, sendo dois puros (cruzamento intracitótipo), três híbridos de mesma linhagem evolutiva e dois híbridos de linhagens evolutivas diferentes. Os resultados mostram que os animais puros tiveram melhores desempenhos reprodutivos seguidos pelos animais híbridos entre citótipos de mesmas linhagens evolutivas, que foram sugestivos de subfertilidade. Os animais de linhagens evolutivas diferentes apesar de apresentarem atividade estereidogênica foram azoospermicos o que nos permite concluir que dentro do táxon existem pelo menos duas espécies diferentes com possibilidade de duas subespécies dentro de cada ramo filogenético. Estes resultados implicam na necessidade de novas caracterizações taxonômicas, inclusive para que sejam estruturados planos de ação para conservação de espécies que pudessem estar correndo risco de extinção.

Palavras-Chave: Hibridação, Isolamento reprodutivo, Meiose, Veado-Mateiro

**EXISTENCE OF REPRODUCTIVE ISOLATION AMONG DIFFERENT
CYTOTYPES OF RED BROCKET DEER (*Mazama americana*) BY
EVALUATION OF HYBRIDS MALES**

ABSTRACT - *Mazama americana* (Mammalia, Cervidae), has been widely studied in ecologic, genetic and reproductive areas given recent doubts about its taxonomic validity. Cytogenetic and molecular studies showed that currently this taxon is composed by a species with up to six different cytotypes. The World Conservation Union IUCN classified this taxon as “data deficient” given the taxonomic uncertain of this species. This research aimed to evaluate the fertility of of intra and intercytotypic breeding products in order to conclude about the occurrence of novel species. Semen analysis, testicular histology, fecal testosterone metabolites and meiosis of seven breeding products, being two of them pure (intracytotypic breeding), three hybrids from the same evolutive lineage and two hybrids from different evolutive lineages. Results show that pure products have better reproductive performances, being the hybrids from the same evolutive lineage suggestive of subfertility. The hybrid products from different evolutive lineages were azoospermics, despite their steroid activity. These results show the occurrence of almost two different species and the possibility of almost four subspecies. It implies the necessity of new taxonomic review, which will aid in the design of action plans for the conservation of endangered species.

Keywords: Hibridization, reproductive Isolation, meiosis, red brocket deer

I. INTRODUÇÃO

O veado-mateiro (*Mazama americana*) é uma espécie de cervídeo de médio porte, poliétrico não sazonal que possui ampla distribuição geográfica, o que, facilitou a passagem destes animais por um complexo sistema evolutivo que tem gerado muita polêmica quanto à validade do *táxon*.

Evidências citogenéticas (JORGE & BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987; DUARTE, 1998; SARRIA-PEREA, 2004) e filogenéticas (DUARTE et al., 2008; ABRIL et al., 2010) apontam a existência de duas linhagens evolutivas, sugerindo que a espécie *M. americana* seja um complexo de espécies crípticas, pois apesar da similaridade morfológica (Figura 1) entre os indivíduos (THOMAS, 1913; ALLEN, 1915; CABRERA, 1960; ROSSI 2000), estes apresentam altos níveis de diferenciação genética e diversificação de haplótipos em diferentes localidades geográficas (ABRIL et al., 2010).

Atualmente, esta espécie está classificada como “dados deficientes” na Lista Vermelha da IUCN (2010), reflexo de toda a complexidade do *táxon* quanto à possibilidade de existência de outras espécies dentro do que hoje se acredita ser uma espécie só.

A esterilidade ou subfertilidade do híbrido é tida como uma importante regra na diferenciação e manutenção de espécies distintas (DOBZHANSKY, 1936). Complexos rearranjos cromossômicos na forma heterozigótica estão associados à diminuição na fertilidade e até esterilidade, provavelmente devido aos pareamentos cromossômicos defeituosos durante a fase de meiose I, mais especificamente durante o paquíteno, com a conseqüente segregação de gametas desbalanceados (BENIRSHCKE & KUMAMOTO, 1991; DOBIGNY et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a fertilidade de animais resultantes do cruzamento de vários citótipos de veados-mateiro (*Mazama americana*) a fim de inferir sobre a existência de isolamento reprodutivo, validade do *táxon* e sua atual sistemática.

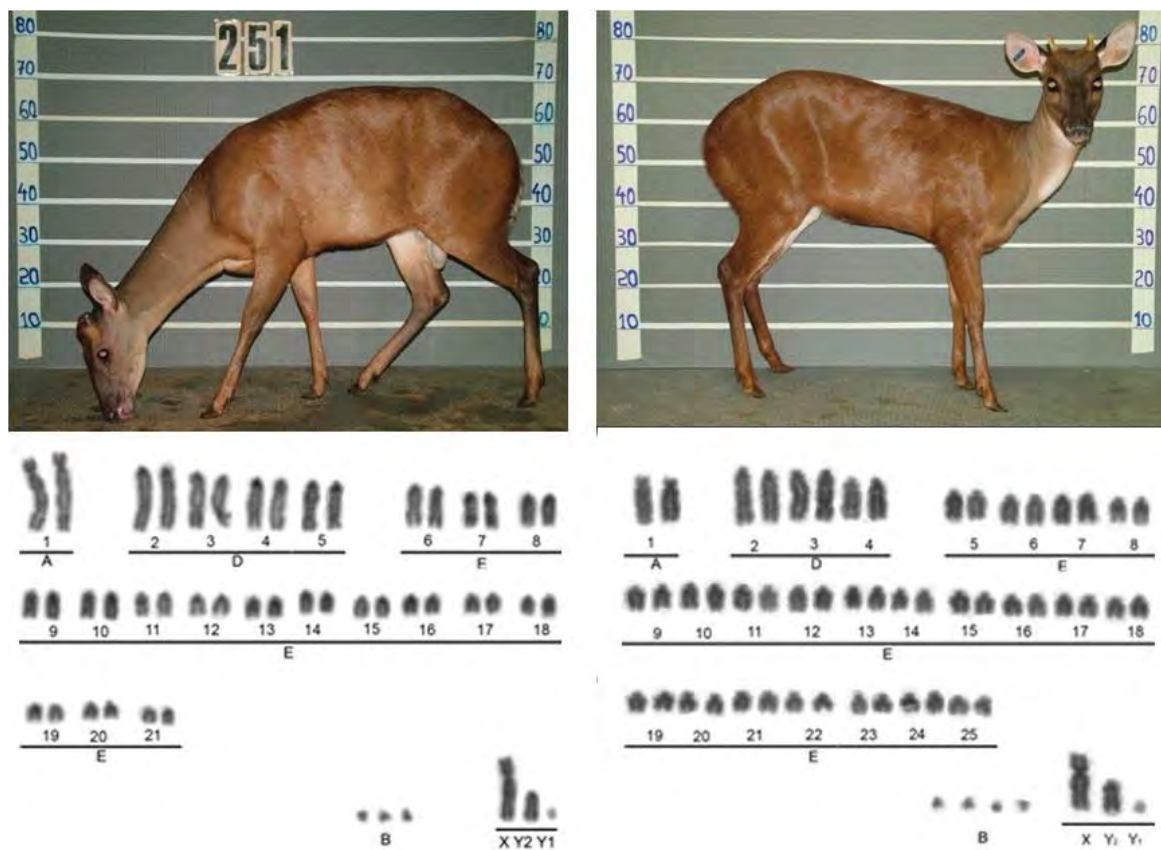


Figura 1. Espécimes machos de veado-mateiro (*Mazama americana*), à esquerda animal T251 oriundo do citótipo juína e seu cariótipo e à direita animal T205 oriundo do citótipo Paraná e seu cariótipo.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie *Mazama americana*

O veado-mateiro (*Mazama americana* Erxleben, 1777) é a maior espécie do gênero, apresentando um aspecto robusto com 30 a 40 Kg de peso vivo, dorso arqueado com altura de cernelha entre 58 a 80 cm e comprimento de 90 a 145 cm (DUARTE, 1998).

Evolutivamente, esta espécie deve ter surgido durante o Período Pleistocênico, provavelmente a partir de uma espécie de chifres em forma de galho (RIBEIRO, 1919; GROOVES & GRUBB, 1987), como demonstram alguns estudos moleculares e morfológicos (SMITH et al., 1986; CRONIN, 1991; DOUZERY & RANDI, 1997).

De acordo com WEBER & GONZALEZ (2003) o veado-mateiro é o cervídeo da América latina que possui maior distribuição geográfica, porém, sem uma conformidade taxonômica devida. Segundo estes autores a espécie possui uma distribuição que vai desde a América Central, ao sul do México, passando por quase toda a América do Sul, chegando até o norte da Argentina.

Esta espécie ao longo do tempo passou por diferentes divisões e classificações taxonômicas devido a estudos de comparações morfológicas. Em 1913, Thomas reconheceu uma subespécie de *M. americana* ao sul do Brasil (Paraná) e descreveu duas novas espécies: *M. zetta* e *M. sheila*, confirmado por ALLEN (1915) que, além destas, citou mais seis espécies e três subespécies, enquanto CABRERA, em 1960, realizou uma reclassificação citando nove subespécies.

Entretanto, em seu levantamento taxonômico do gênero *Mazama* no Brasil, ROSSI (2000) encontrou que *M. americana* tem, na realidade, uma grande variabilidade intra e interpopulacional de vários caracteres morfológicos externos,

e concluiu que existe uma única espécie, descartando assim a existência de subespécies. Neste estudo, ele concluiu ainda que a população litorânea (desde Santa Catarina até o sul de São Paulo) apresenta-se parcialmente diferenciada da população do interior do continente, podendo constituir outra espécie incapaz de ser discriminada por caracteres cranianos, de pelagem ou coloração (estudados por ele).

A primeira análise citogenética em *M. americana* foi feita por TAYLOR et al. (1969), que descreveram uma fêmea com número diplóide ($2n$) de 68 e número fundamental (NF) de 74, sendo seis cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 62 acrocêntricos, quatro deles muito pequenos. JORGE & BENIRSCHKE (1977) descreveram o cariótipo da subespécie *M. a. temama* de Tamaulipas, México, como tendo $2n=49/50$ e $NF=72$, sendo 20 autossomos meta ou submetacêntricos, e 28 acrocêntricos, quatro deles muito pequenos, sendo o cromossomo X um submetacêntrico de tamanho semelhante ao do par 6, e o Y metacêntrico e menor do lote. Também descreveram a fusão em tandem 4/24 em uma fêmea.

NEITZEL (1987) encontrou ainda outro padrão para a espécie, analisando uma fêmea procedente do Paraguai com $2n=52$, $NF=56$, acrescido de 4 a 5 cromossomos supranumerários (cromossomos B), sendo o X o maior do lote e de morfologia submetacêntrica e com uma banda C intersticial no braço longo, o que sugere uma fusão X:autossômica. Além disso, achou extensos blocos de heterocromatina C peri-centromérica.

Ao analisar 33 indivíduos de diferentes localidades do Brasil, DUARTE (1998) encontrou expressiva variação tanto no número diplóide de cromossomos (42 a 53), quanto no número fundamental de braços (48 a 57). A partir daí, notou-se que alguns cariótipos eram característicos de algumas regiões, permitindo distinguir sete diferentes citótipos: Rio Negro, Manaus, Jarí, Acre, Rondônia, Carajás e Rio Paraná.

DUARTE (1998) alertou ainda que, os distintos citótipos possuem potencial de serem espécies distintas e estarem em risco de extinção. Muitos problemas na conservação das espécies estão relacionados à vulnerabilidade de pequenas

populações e ao fato das florestas tropicais das Américas Central e do Sul estarem sendo fortemente transformadas pela agricultura e pecuária, causando a fragmentação e perda dos habitats ocupados pelo veado-mateiro (CARNELOSSI, 2008).

SARRIA-PEREA (2004) comparou citogeneticamente alguns citótipos da espécie *M. americana* e retratou uma diferença entre os citótipos Paraná e Carajás devido a uma fusão em tandem. Além disso, relatou que o citótipo Rondônia está consideravelmente mais distante evolutivamente dos citótipos do Paraná e Carajás, por diferir em quatro fusões em tandem e uma translocação Robertsoniana, além de vários caracteres polimórficos.

Ao estudar molecularmente a espécie, ABRIL et al. (2010) detectaram duas linhagens evolutivas, confirmando os achados citogenéticos, uma composta pelos citótipos Rondônia e Juína e outra pelos citótipos Paraná e Carajás. Afirmaram ainda que há um grau de diferenciação genética dentro da espécie maior do que entre diferentes espécies do gênero *Mazama*, o que reforça a hipótese de espécies distintas.

2.2. Especiação e isolamento reprodutivo

Desde o início da Era Darwiniana a especiação tem sido estudada e inúmeras vezes questionada para adequar-se aos novos conceitos de espécie e especiação. Existem vários conceitos aceitos para “espécie” dependendo da filogenia e/ou o grupo experimental estudado, por exemplo, conceito morfológico, filogenético e biológico.

O conceito morfológico, onde o fenótipo é o parâmetro determinante da especiação, nem sempre é aplicável às espécies de mamíferos, em especial quando se trata de espécies crípticas, como é o caso da suspeita dos veados-mateiro (DUARTE, 1998).

O conceito filogenético faz referência o quão distantes as espécies podem estar entre si, levando em consideração longos períodos de tempo. A vantagem

desta proposta é a possibilidade de avaliar fósseis além da história evolutiva com possibilidade de determinar ancestralidade (VELASCO, 2008).

De acordo com o conceito biológico de MAYR (1963), espécie são grupos de populações naturais que se entrecruzam e estão reprodutivamente isoladas de outros grupos. Atualmente, o que se generaliza e utiliza com maior frequência é o conceito biológico (genético-reprodutivo) de espécie (COYNE & ORR, 1998), apesar da grande desvantagem de não ser aplicável às espécies fósseis e populações semelhantes porém com descontinuidade geográfica.

Com isso, um importante fator que rege o conceito biológico são os mecanismos de isolamento reprodutivo, citados e classificados por MAYR (1963) como mecanismos pré-copulatórios ou pós-copulatórios.

Os mecanismos pré-copulatórios são aqueles onde as espécies estudadas não conseguem realizar a cópula sejam pelas diferenças de horários de atividade, por exemplo onde uma espécie tem hábitos diurnos e outra noturnos, ou pela não detecção do cio da fêmea da outra espécie.

Dentre os mecanismos pós-copulatórios estão: a mortalidade gamética (onde, há transferência de espermatozóide, mas o ócito não é fecundado); mortalidade zigótica (o oócito é fecundado, mas o zigoto morre); inviabilidade do híbrido (o zigoto gera um F1 híbrido com viabilidade reduzida); e por fim, a esterilidade do híbrido (onde o zigoto dá origem a um híbrido F1 viável, completamente ou parcialmente estéril podendo até produzir um F2, porém deficiente).

Para COYNE & ORR (1998), um fator importante no estudo de especiação é uma avaliação criteriosa da presença e evolução de um mecanismo de isolamento reprodutivo. Há necessidade de considerar a condição das “espécies” apresentadas, por exemplo, em espécies alopátricas, existem muitos mecanismos de isolamento agindo simultaneamente, já nas espécies simpátricas, esta discriminação torna-se mais difícil de ser demonstrada, devido aos vários fatores que normalmente estão presentes.

Assim, é notório que a determinação de espécies é bastante complexa, exige inúmeras ferramentas para auxiliar na tomada de decisão; em primeiro plano

seguem as avaliações ecológicas (habitat, ciclo circadiano, fenótipo, entre outros), avaliações genéticas (cariotipagem, filogenia, aloenzimática, genotipagem) e reprodutivas onde a decisão final deve ser conclusiva.

Teoricamente, o isolamento reprodutivo pós-zigótico tem sido bastante estudado em modelos laboratoriais como moscas do gênero *Drosophila* (COYNE & ORR, 1998; HOLLOCHER, 1998) e ratos domésticos (OKA et al., 2004; BRITTON-DAVIDIAN, 2005).

Estes modelos têm geralmente buscado responder uma das principais questões, ainda sem resultado plausível, a Teoria de Haldane. Esta teoria traz por definição que: “Quando há descendentes F1 de dois animais de espécies diferentes um gênero sexual é ausente, raro ou estéril, e este gênero é o heterozigoto” (HALDANE, 1922).

Para fundamentar sua teoria, HALDANE (1922) tabelou mais de 30 espécies de *Lepidoptera*, nove de aves e seis de mamíferos que foram cruzados com outras espécies dentro do mesmo gênero ou próximos destes e que seguiram sempre sua prerrogativa.

Um ponto de vista geralmente negligenciado pelos modelos laboratoriais é o impacto genético que as hibridações podem causar em populações de vida livre. De acordo com o ponto de vista de BARTON (2001) a hibridação interespecífica próxima pode ocasionar a adaptação de espécies pela introgressão de alelos ou pela estabilização de uma recombinação gênica. Por outro lado, a hibridação pode decretar o fim de uma população, visto que com a produção de híbridos estéreis de animais sazonais, por exemplo, declinam a população efetiva e aumentam a endogamia.

Um bom exemplo do papel danoso da hibridação é o caso dos ibex-dos-Alpes (*Capra ibex ibex*) e os da montanha de Tatra (Eslováquia). Quando estes animais entraram em vias de extinção, alguns indivíduos da Áustria foram translocados para aumentar o efetivo populacional. Com o sucesso da sobrevivência dos animais austríacos, alguns anos mais tarde indivíduos da Turquia (*C. i. aegagrus*) e da Núbia (*C. i. nubuana*) foram translocadas para conter a depressão endogâmica. No entanto, a prole desta segunda etapa efetuavam

seus cruzamentos no início do outono diferentemente da população original que era no inverno, com isso, os nascimentos ocorriam no mês de fevereiro, o mês mais frio do ano, incapacitando a sobrevivência dos F2 e findando assim a população Eslováquia (GRIEG, 1979).

Várias ferramentas podem ser utilizadas para apoiar cientificamente a validação de um *táxon*. Dentre elas, as análises citogenéticas, moleculares, aloenzimáticas, dentre outras.

BAKER & BRADLEY (2006) enumeraram nove espécies crípticas de mamíferos que foram descritas a partir de análises cariotípicas e aloenzimáticas, são elas: *Thomomys bottae-umbrinus*, *Sigmodon arizonae-hispidus-mascotensis*, *Macrotus californicus-waterhousii*, *Mus domesticus-musculus*, *Rhogeessa genowaysi-tumida*, *Lasiurus ega-xanthinus*, *Sorex araneus-coronatus-granaries* e *Peromyscus beatae-boylii-levipes*. De acordo com esses autores a grande maioria dos híbridos F1 tiveram diminuição da fertilidade.

Normalmente, os cariótipos são as primeiras evidências a sugerirem novas espécies. Os casos mais bem documentados na literatura sobre especiação e hibridação de animais fenotipicamente semelhantes que foram inicialmente descobertos por citogenética são os Musaranhos *Sorex* (KATARZYNA et al., 2006), os roedores *Taterillus* (DOBIGNY et al., 2002) e *Thrichomys* (BORODIN et al. 2006) e o roedor subterrâneo *Ctenomys* (GARCIA et al., 2000).

O musaranho, assim como o veado-mateiro, possui um variado padrão cariotípico com similaridade geográfica e os machos também possuem um padrão sexual cromossômico XY₁Y₂ (ABRIL et al., 2010). Contradizendo as expectativas, que sugeriam que nas zonas híbridas dos *Sorex sp.* seriam encontrados machos heterozigotos inférteis, houve apenas uma depleção da fertilidade, sugerindo sub-fertilidade (KATARZYNA et al., 2006).

DOBIGNY et al. (2002) estudaram um grupo de roedores do gênero *Taterillus* (Muridae, Gerbillinae) do oeste africano e descreveram cinco espécies crípticas com 5 a 20 rearranjos cromossômicos, dentre estes, o sistema XY₁Y₂. No entanto, os *Taterillus* do leste e centro africano, não apresentaram tal sistema sexual. Os autores sugeriram, portanto, que entre as espécies *Taterillus sp 1*,

Taterillus sp 2 e *T. pygargus*, cariotipicamente diferentes um do outro por 7 a 10 translocações robertsonianas metacêntricas e uma fusão em tandem, provocariam distúrbios gametogênicos nos possíveis híbridos pela formação de um anel cromossômico entre homólogos.

Durante muitos anos o gênero *Thrichomys* foi considerado monoespecífico, pois morfológicamente os animais não variavam, no entanto, através de análises geométricas multidimensional do crânio e citogenéticas em meados de 2002 foram sugeridos a divisão em *T. pachyurus*, *T. apereoides apereoides* e *T. apereoides laurentius*. No estudo de fertilidade, os híbridos entre as espécies e subespécies de *Thrichomys*, acima citadas, tiveram uma redução no número de espermatogônias, ausência de espermatozóides e menor massa testicular em relação aos parentais (puro em espécie) (BORODIN et al., 2006).

Os tuco-tucos (*Ctenomys* spp.) são roedores subterrâneos que estão amplamente distribuídos na América do Sul, e são os mamíferos de maior variação cariotípica dentro de um único gênero, com relatos de $2n=10$ chegando à 70 e o NF variando de 16 à 84 (GARCIA et al., 2000). Para estes animais, existem relatos de cinco espécies (*C. mendocinus*, *C. azarae*, *C. australis*, *C. chasiquensis* e *C. porteousi*) com o mesmo cariótipo (MASSARINI et al., 1991), contrariando por exemplo a espécie *C. flamarioni* que apresenta uma ampla variação cromossômica com relatados de translocações Robertsonianas (FREITAS, 1994). Este tipo de mutação tem sido descrita como um rápido e eficiente mecanismo de isolamento reprodutivo entre populações mutadas e não conservadas (CORTI et al., 1986; BRITTON-DAVIDIAN et al., 2000; e revisado por SEARLE (1993).

Alguns trabalhos têm demonstrado que nos casos em que este rearranjo ocorre, as diferenças genéticas e/ou morfológicas não são suficientemente diferentes para identificar facilmente as duas espécies, porém, estas tornam-se reprodutivamente isoladas (VIÉ et al., 1996; BRITTON-DAVIDIAN et al., 2000; TAYLOR, 2000; WANG & LAN, 2000). No entanto, acredita-se atualmente que apenas a ocorrência cumulativa de várias fusões cêntricas (Robertsonianas) são capazes de isolar reprodutivamente duas espécies (DOBIGNY et al. 2002).

Dentro da família Cervidae existem vários estudos de cruzamentos híbridos principalmente relacionando espécies com interesses zootécnicos, como por exemplo; entre o cervo-sambar (*Cervus unicolor*) e cervo-nobre (*C. elaphus*) (MUIR et al., 1997), entre cervo-sika (*Cervus nippon*) e cervo-axis (*Axis axis*) (ASHER et al., 1999), entre cervo-nobre (*C. elaphus*) e cervo Père David (*Elaphurus davidianus*) (TATE et al., 1997), entre cervo-dama europeu (*Dama dama dama*) e cervo-dama mesopotâmico (*D. d. mesopotamica*) (ASHER et al., 1996). No entanto, a hibridação mais bem estudada do ponto de vista genético-reprodutivo é o veado-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) e o veado-mula (*Odocoileus hemionus*) que ocorrem simpatricamente em alguns locais do oeste canadense e norte americano.

Estudos utilizando aloenzimas, nestes animais, demonstraram uma potencial hibridação nos Estados de Montana (CRONIN et al., 1988), Washington (GAVIN & MAY, 1988) e Texas (STUBBLEFIELD et al., 1986; BALLINGER, 1987; DERR, 1991). De acordo com CARR et al. (1986), BALLINGER (1987) e DERR (1990), as duas espécies dividem haplótipos de DNA mitocondrial em algumas áreas no sudoeste dos Estados Unidos. Porém, a ocorrência de hibridação nestas espécies não é uma característica tão evidente em todas as áreas de simpatria, pois, de acordo com DERR et al. (1991), a ocorrência de F1 híbridos é rara.

O estudo de fertilidade de F1 machos (*O. virginianus* x *O. hemionus*) não revelou evidências genéticas suficientes para reduzir a fertilidade dos mesmos, no entanto, o retrocruzamento não foi fértil (DERR et al. 1991).

ASHER et al. (1999) relataram o primeiro registro de um animal resultante do cruzamento entre um cervo-sika (*Cervus nippon*) e o cervo-axis (*Axis axis*). O híbrido era do sexo feminino e possuía um fenótipo mesclado entre os parentais: a região cervical semelhante ao axis com algumas marcas sugestivas do cervo-sika, a cauda enegrecida e o chanfro côncavo, por exemplo. Comportamentalmente, durante a corrida o híbrido assemelhava-se com o axis quanto à postura da cabeça e a cauda ereta do sika. O estudo cromossômico revelou que este híbrido possuía $2n=67$, valor intermediário aos de seus parentais ($2n=68$ e 66 , sika e axis

respectivamente). O híbrido era aparentemente sazonal, como o cervo-sika, no entanto, os autores não avaliaram a fertilidade.

De acordo com os dados de MUIR et al. (1997), a utilização da inseminação artificial de cervos-nobres (*Cervus elaphus*) com sêmen de cervos-sambar (*C. unicolor*) resultaram em 8% (n=31) de diagnósticos positivos de prenhes aos 40 dias (por ultrassonografia), 6% (n=24) aos 100 dias e apenas 1% (n=4) de nascimentos.

Quando o sambar foi inseminado artificialmente por cervo-nobre houve um total de 50% (n=5) de prenhez positivas somente aos 40 dias com quatro nascimentos, sendo todas fêmeas. As características fenotípicas destas fêmeas foram intermediárias aos parentais, com orelhas compridas como os nobres, porém não largas como, normalmente associada aos Sambar. Cariotipicamente o híbrido entre os cervos-nobre e sambar tem o número diplóide intermediário (2n=62) entre os parentais (MUIR et al., 1997).

2.3. Aspectos reprodutivos de híbridos machos

A hibridação entre espécies é comumente associada ao decréscimo da fertilidade chegando à esterilidade ou inviabilidade da prole. Esta perda de fertilidade ou viabilidade é importante para a manutenção, diferenciação e/ou adaptação das espécies (ANDERSON, 1948; BARTON, 2001).

Já em 1936 DOBZHANSKY afirmava que existiam dois tipos de sistemas de esterilidade em híbridos: um cariotípico, decorrente da grande diferença cromossômica dos parentais ocasionando falhas meióticas e desbalanços cromossômicos; e outro gênico, onde os parentais não são suficientemente diferentes quanto ao cariótipo, no entanto, geneticamente são muito divergentes, o que pode provocar uma epistasia deletéria no controle gênico da gametogênese.

Ao estudar a expressão do gene da esterilidade híbrida (epistasia entre *Hst-1* e *Hst^w*) em ratos através do cruzamento entre *Mus musculus domesticus* x *M.m. musculus*, CHUBB & NOLAN (1987) encontraram que com a hibridação ocorreu

um decréscimo na capacidade estereoidogênica das células de Leydig e observaram ainda o bloqueio da progressão da espermatogênese durante a fase de espermatócito primário, mais especificamente no paquíteno.

Vários trabalhos têm sido realizados, corroborando a idéia de que aberrações durante o pareamento cromossômico geram configurações cromossômicas desbalanceadas nos gametas, o que provocaria morte celular ou falhas genéticas após a fertilização (BOER & JONG, 1989; BORODIN et al., 1998).

Para KATARZYNA et al. (2006), o formato e o tamanho das multivalentes cromossômicas formadas durante o pareamento meiótico da primeira divisão estão diretamente relacionadas ao grau de fertilidade do animal híbrido. Sendo que configurações em anel são mais danosas às configurações lineares com pareamentos trans ou cis.

DOBIGNY et al. (2002), por exemplo, citaram que fusões cêntricas (Translocações Robertsonianas) e inversões pericêntricas não são tão deletérias para fertilidade dos portadores, no entanto, quando estas começam a se acumular com as gerações o efeito deletério passa a ser observado com maior frequência.

Alguns autores já documentaram que estes rearranjos são frequentemente encontrados em roedores (BARROS et al., 1992; NACHMAN, 1992; WALKER & SPOTORNO, 1992; DOBIGNY et al., 2002), primatas (VIEGAS PÉQUIGMONT et al., 1985; GIRALDO et al., 1986; RUMPLER et al., 1986) e ruminantes (GUSTAVSSON, 1980; SCHMUTZ et al., 1990; WEBER et al. 1992; ZHANG et al., 1992; GUIMARÃES et al. 1995), sendo as fusões cêntricas as mais comuns aberrações cromossômicas que ocorrem em humanos (FERLIN et al. 2006).

Os efeitos destes dois tipos de rearranjos geralmente não são prejudiciais, contanto que estejam presentes como rearranjos simples, mas, uma vez que começam a se acumular, vão adquirindo efeitos deletérios (DOBIGNY et al., 2002).

Em bovinos, a fusão cêntrica dos cromossomos 1:29 é causa de redução da fertilidade. Touros que apresentam este rearranjo têm, em média, 10% de embriões anormais, já em vacas a porcentagem chega a 20% dos embriões

(SCHMUTZ et al., 1990). Também foi detectada a redução de 13,7% de oócitos fertilizados de uma vaca que apresenta translocação 14:20, em comparação com sua meio-irmã (ZHANG et al., 1992). Na Romênia, WEBER et al. (1992) encontraram uma taxa de concepção de 49,3% em touros com translocação 14:20 quando comparados à touros cromossomicamente sadios (59,2%).

Em contraste com as fusões anteriormente apresentadas, uma fusão em tandem simples pode ser marcadamente deletéria, diminuindo em 50% a fertilidade do portador (DOBIGNY et al., 2002). No entanto, HANSEN (1969) encontrou, em bovinos, um decréscimo de 10% da fertilidade.

Alguns estudos histológicos (WHITEHEAD, 1908; WODSEDALEK, 1916; GOLDSMITH, 1917) foram realizados em testículos de burros (*Equus caballus* x *E. asinus*) demonstrando distúrbios na gametogênese, em especial às falhas no pareamento cromossômico, provavelmente devido às diferenças no número de cromossomos autossômicos metacêntricos e acrocêntricos entre eqüinos e asininos (CHANDLEY et al., 1974; 1975). Recentemente, NEVES et al. (2005) estudando ultra-estruturalmente o testículo de burros, sugeriram que os túbulos seminíferos são capazes de completar a espermatogênese.

Dificuldades no pareamento, recombinação, segregação simples, e especialmente, múltipla, em heterozigotos podem ser as causas de parte da proporção de células germinativas mortas ou do desbalanço cromossômico. A morte das células germinativas são resultados de aberrações no pareamento cromossômico na fase de paquíteno (CHANDLEY, 1979, 1988; EPSTEIN, 1986).

TRUJILLO et al (1969) ao estudarem um bardoto (*Equus caballus* x *E. asinus*), diferentemente dos burros, descreveram que o fenótipo do animal se assemelhava ao do cavalo com exceção das orelhas alongadas, o animal possuía em sua histologia não apenas uma camada de células no epitélio germinativo, apresentavam células de sustentação, e células germinativas. Dentre as células germinativas, os autores chamaram a atenção para a identificação de espermatogônias gigantes indicando tetraploidia e espermatócitos secundários contendo quatro núcleos. Foram colhidas sete amostras de sêmen e, dentre estas, duas apresentavam espermatozóides aparentemente normais, inclusive no

tamanho da cabeça e flagelo, quando comparado com espermatozóides de cavalos e jumentos, o que é sugestivo de células haplóides. Um dos ejaculados chegou a apresentar uma concentração de 1.500 espermatozóides/mL, embora duas colheitas tenham sido azoospermicas.

Como justificativa da presença de células aparentemente viáveis, os autores sugeriram três mecanismos alternativos que poderiam produzir gametas: o primeiro através da segregação integralmente independente dos cromossomos do eqüino e asinino durante a primeira fase da meiose para duas células filhas, a probabilidade disto ocorrer foi de 1 em 2^{32} ; o segundo é caso ocorra um número substancial de tetraploidia o que levaria ao pareamento dos cromossomos com seus devidos homólogos, logo, cada espermátócito primário tetraplóide teria que originar quatro espermatozóides haplóides, e finalizando o terceiro mecanismo seria que as células tronco germinativas (espermatogônias) fossem inteiramente constituídas de material genético só de eqüinos e/ou de asininos.

Um fato interessante reportado por WISHART et al. (1988) foi que o cruzamento entre veado-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) e veado-mula (*Odocoileus hermionus*), dependendo se o parental macho era de uma ou outra espécie influenciou no grau de fertilidade ou infertilidade do filho. Ou seja, em cruzamentos híbridos onde o parental macho era um espécime de veado-da-cauda-branca, o filho foi aparentemente subfértil com presença de uma espermatogênese completa. Quando o parental macho era um veado-mula, o resultado do cruzamento híbrido era um filho estéril, onde só foram detectados túbulos seminíferos com presença de espermatogônias ou túbulos sem células germinativas.

Um exemplo comumente encontrado na literatura é o estudo reprodutivo de touros *Bos taurus* x *Bos indicus*. Alguns autores afirmam que a heterose provocada pelo cruzamento pode melhorar geneticamente a prole, tanto zootecnicamente com uma melhor maciez na carne (MOLINA et al., 1982; RAZOOK et al., 1986; NARDON et al., 1996; CHASE JUNIOR et al., 1998), bem como melhor adaptação das raças européias ao clima tropical (MORAIS, 1985; OLIVEIRA & ALENCAR, 1986).

BRITO et al. (2004) ao estudarem duas raças bovinas uma *Bos indicus* (Nelore) e outra *Bos taurus* x *Bos indicus* (Canchim) observou que a idade à puberdade da raça híbrida variou entre $360 \pm 9,4$ e $460 \pm 5,0$ dias entre touros precoce e tardio respectivamente, já para os nelore $526,7 \pm 12,3$ e $673,3 \pm 19,1$ dias. Para a raça que deu origem e a maior contribuição genética (5/8) do Canchim, o Charolês (*Bos taurus*), a puberdade ocorre com 287 ± 7 dias (ALMQUIST & BARBER, 1974), sugerindo que a raça mestiça é um intermediário das espécies parentais de origem.

No tocante à produção espermática, podem ser observados que touros mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*) são mais susceptíveis ao clima, há uma redução significativa na gametogênese durante períodos mais quentes, embora a fertilidade não seja tão afetada. No entanto, a susceptibilidade climática pode ter mais razão adaptativa da espécie europeia (*Bos taurus*) que passou esta característica à prole que o efeito genético da diferença (ABREU, 2000).

Nem sempre somente a gametogênese do híbrido é realmente afetada, mudanças comportamentais e fisiológicas da reprodução podem ser alteradas inviabilizando híbridos ou seus filhos, como o ocorrido com o ibex-dos-Alpes (*Capra ibex ibex*) (GRIEG, 1979).

A questão endocrinológica reprodutiva de híbrido é pouco estudada, no entanto, sabe-se que a hibridação em si reflete em um decréscimo na capacidade estereoidogênica das células de Leydig (CHUBB & NOLAN, 1987).

ASHER et al. (1996) ao compararem cervos-dama europeu (*Dama dama dama*) e híbridos F1 entre cervo-dama europeu e dama Mesopotâmico (*D. d. mesopotamica*) observaram que os animais híbridos possuíam maior peso corporal, menor circunferência testicular durante a primavera, quantidade plasmática de testosterona semelhante, embora os picos de testosterona tenham sido detectados mais cedo nos híbridos, demonstrando precocidade até mesmo quanto a espermatogênese.

Para McGOVERN (1976) as causas cromossômicas e gênicas não são causas únicas determinantes para a esterilidade do híbrido. Fatores fisiológicos podem, também, estar envolvidos. O cruzamento entre o bisão americano (*Bison*

bison) e o bovino doméstico (*Bos taurus*) produzem um híbrido macho estéril e uma fêmea fértil que pode até ser cruzada com a espécie parental. Com este exemplo DEAKIN et al. (1935) levantaram a hipótese de que os machos seriam estéreis devido à estrutura escrotal, onde no bovino doméstico o escroto é penduloso e possui uma pele fina já no bisão a proximidade com a parede abdominal é maior além de uma pele mais espessa, isso dificulta a termorregulação testicular dos filhos que se aproximassem do fenótipo do bisão e logo degeneração testicular por temperatura.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para realização dos cruzamentos que deram origem aos animais estudados foram utilizados cinco machos e 10 fêmeas parentais obtidos de criadouros e zoológicos legalizados ou não, de várias regiões do Brasil (Figura 2) e posteriormente amostrados por ABRIL et al. (2010) com intenção da avaliação dos cariótipos e identificação dos citótipos.

Estes animais parentais foram translocados para as dependências do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) em caixas de transporte por veículos e/ou avião como sugere NUNES et al. (1997), e, mantidos em baias individuais, posteriormente detalhadas.



Figura 2. Mapa do Brasil detalhado com as localizações de obtenção dos animais parentais. Fonte: ABRIL et al. (2010)

De acordo com a ciclicidade natural (sem sincronização do estro) das fêmeas, eram planejados os tipos de cruzamentos e o macho escolhido era colocado para cópula assistida na baia da fêmea ou no corredor de manejo.

Dos 26 cruzamentos realizados, 23 foram férteis, sendo que foram obtidos 18 produtos (10 fêmeas e oito machos), um natimorto, um parto distócico seguido de morte do produto, dois abortos e óbito de uma matriz durante a gestação.

As *causa mortis* dos abortos e do natimorto não tiveram laudos conclusivos. No parto distócico o feto apresentava-se com os posteriores exteriorizados e foi necessária a intervenção cirúrgica para a retirada do feto já morto. O laudo da necropsia para a matriz que veio a óbito durante a gestação não foi conclusivo.

Dos oito conceptos machos, um teve óbito aos sete meses de idade sem causas definidas, e os demais foram amostrados neste experimento. Sendo, dois resultados de cruzamentos entre progenitores de mesmo citótipos (animais 1 e 2), onde a diferença cromossômica autossômica entre os parentais (DCAP) foi zero (Tabela 01 - P), três resultantes de cruzamentos entre progenitores de citótipos diferentes porém de mesma linhagem evolutiva (animais 3, 4 e 5), onde a DCAP foi igual a dois (Tabela 01 - H-ML) e dois de cruzamentos entre progenitores de citótipos de linhagens evolutivas diferentes (animais 6 e 7), onde a DCAP foi oito e onze (Tabela 01 - H-LD).

Nos conceptos foi realizado uma avaliação prévia do cariótipo dos animais através do cultivo de linfócitos (MOORHEAD et al., 1960) e cariotipagem com coloração de Giemsa, nestas análises podemos observar que os animais resultados dos cruzamentos intracitótipos de mesma linhagem evolutiva (DCAP = 0) de veado-mateiro apresentaram o número fundamental (NF) igual ao reprodutor paterno, ou seja, animais 1 e 2 apresentaram NF = 45 e 53, respectivamente e seus respectivos pais 45 e 53.

Os demais animais resultados de cruzamentos híbridos (DCAP = 2 ou > 2) apresentaram números fundamentais intermediários aos parentais, com exceção do animal 5 que apresentou NF igual ao materno.

3.2. Manejo de cativeiro

a) Instalações:

O projeto foi desenvolvido no Galpão de Manejo de *Mazama* do NUPECCE do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/UNESP. Todos os animais, anteriormente ao desmame (seis meses) foram mantidos na mesma baia de suas progenitoras, após o desmame, foram mantidos isolados em baias de alvenaria de 12 m². Estas baias estavam dispostas em um galpão fechado, com corredor central. O Galpão de Manejo possuía um sistema de contenção e manipulação dos animais, para que fossem evitados os acidentes, comuns nesse grupo taxonômico.

b) Alimentação:

Os animais foram alimentados de acordo com o proposto por DUARTE (2010), onde a dieta consiste em administração de concentrado equino de alta palatabilidade (Omolene; Purina®), perfazendo até 1 kg/animal/dia e volumoso (2 kg/animal/dia). Os volumosos aceitos pelos animais foram: soja (*Glycyne max*), soja-perene (*Neonotonia white*), rami (*Boehmeria nivea*) e amora (*Morus alba*).

3.3. Contenção e colheita de material

Durante os seis primeiros meses (período de aleitamento) os animais foram mantidos nas mesmas baias de suas progenitoras, no entanto, após este período, foram separados em baias individuais e semanalmente acompanhados com colheitas de fezes frescas (até os 18 meses) para posterior dosagem de andrógenos fecais. Aos seis (desmame), 12 e 18 meses de idade, os animais foram anestesiados utilizando o protocolo sugerido por PINHO et al. (2010), ou seja, associação de cloridrato de xylazina (1 mg/kg) e cloridrato de quetamina (5 mg/kg) aplicada intramuscularmente.

Nas contenções químicas aos 18 meses, os animais foram submetidos à colheita de sêmen, utilizando eletroejaculador para bovinos (Duboi®, Brasil) com estímulos de três segundos e descanso por três segundos até um total máximo de

10 estímulos, seguido de massagens caudo-epididimária e ondulatórias na uretra, como sugerido por DUARTE & GARCIA (1995).

Após a colheita de sêmen, os animais foram submetidos à orquiectomia unilateral. Do testículo retirado foi feita uma biópsia, para confecção de lâminas para avaliação da meiose (complexo sinaptonêmico) utilizando-se uma agulha de biópsia (Super Core, MD Tech) de 14 gauges e 9 cm. O excedente do material testicular foi dividido em frações de aproximadamente 1 cm de espessura com auxílio de lâmina de bisturi e fixado em solução de Bouin durante 24 horas, para confecção de lâminas histológicas.

3.4. Avaliação reprodutiva

3.4.1. Avaliação do sêmen

O sêmen foi colhido em tubos Falcon de 15 mL e avaliado quanto ao volume, por micropipetagem. Posteriormente, retirada uma alíquota de 10 µL para fixação em solução de formol salina na proporção de 1:200 para avaliação morfológica e micrométrica dos espermatozóides e da concentração espermática em câmara de Neubauer (espermatozóides/mL).

O restante das amostras seminais foram diluídas em meio de Tris-Gema para avaliação em duplicata (dois avaliadores) da motilidade individual (%) e vigor sob microscopia óptica com aumento de 400x (CBRA, 1998).

A avaliação morfológica do ejaculado foi realizada pelo método de preparação úmida sob microscopia de contraste de fases, onde as morfologias foram classificadas de acordo com a origem com o objetivo de assistir os defeitos decorrentes de uma espermatogênese anômala, ou seja, defeitos primários decorrente de problemas testiculares ou secundários decorrentes da maturação inadequada (BLOM, 1950).

Para as avaliações citométricas, procedeu-se com a extensão de uma gota de sêmen formolizado sobre uma lâmina de microscopia, deixou-se secar ao ar

por 10 minutos e posteriormente foi corada convencionalmente com Giemsa. As lâminas coradas foram examinadas em microscópio Leica DM 5000 B[®], onde foram feitas as mensurações de 100 espermatozóides por animal. Foram medidos, sob imersão (1000x), o comprimento (C), largura maior (LM) e menor (Lm) da cabeça do espermatozóide e posteriormente calculada a área pela fórmula Folha de Descartes, proposta por van DUIJN (1960) e apresentada a seguir.

$$Área = \left[\left(\frac{1,05 - 0,225Lm}{LM} \right) \times (0,36Lm + 0,69LM) \times C \right]$$

3.4.2. *Histologia*

Após a fixação em solução Bouin por 24 horas, os fragmentos testiculares foram desidratados em álcool 70% durante três dias consecutivos com troca de solução alcoólica a cada 24 horas, diafanizados em xilol e incluídos em parafina de acordo com a histotécnica proposta por LUNA (1968). Foram feitos cortes histológicos de 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina.

A análise histológica foi realizada em microscópio óptico (Leica DM 5000 B), onde foram mensurados 60 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, conforme recomendações de BERNDTSON & PICKET (1987). Foram aferidos o diâmetro tubular e altura do epitélio, além da quantificação da população (em 10 secções transversais) de células da linhagem espermática.

Tabela 1. Animais experimentais e seus respectivos progenitores, distância cromossômica autossômica entre os parentais (DCAP) e condição do cruzamento.

Animal	Id	Progenitor			Progenitora			DCAP	Status		
		Id	2N	NF	Citótipo	Id	2N			NF	Citótipo
1	MatFap 06	T251	45	48	Juína	T248	44	48	Juína	0	P
2	MatFap 10	T205	53	56	Paraná	T255	52	56	Paraná	0	P
3	MatFap 02	T251	45	48	Juína	T236	42	48	Rondônia	2	H-ML
4	MatFap 04	T251	45	48	Juína	T211	42	49	Rondônia	2	H-ML
5	MatFap 07	T260	51	56	Santarém	T256	52	56	Paraná	2	H-ML
6	MatFap 08	T251	45	48	Juína	T257	52	56	Paraná	8	H-LD
7	MatFap 14	T269	42	46	Rondônia	T255	52	56	Paraná	11	H-LD

Onde; Id = Identificação do animal; P = Cruzamento puro (Progenitores de mesmo citótipos), H-ML = Cruzamento híbrido (Citótipos diferentes) de mesma linhagem evolutiva e H-LD = Cruzamento híbrido de linhagens evolutivas diferentes, de acordo com ABRIL et al. (2010).

3.4.3. Dosagem hormonal

a) *Processamento inicial das amostras:*

As fezes colhidas semanalmente desde o desmame (seis meses) até os 18 meses, sempre as terças-feiras às oito horas da manhã. É importante comentar que as baias passavam por uma higienização no dia anterior. As amostras de fezes foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas em freezer (-20°C) até o início dos processamentos. Para o processamento as amostras foram secas em estufa a 56°C por aproximadamente 72 horas e trituradas com auxílio de um martelo de borracha. Este processamento diminui a influência da água nas dosagens hormonais e favorece a homogeneização destas nos casos de disfunções gastroentéricas, como diarreia e constipação. Adicionalmente, as amostras processadas possuem a vantagem de serem mais facilmente manuseadas e armazenadas (BROWN & WILDT, 1997).

b) *Extração dos metabólitos fecais:*

Os metabólitos foram extraídos das amostras fecais como descrito por GRAHAM et al. (2001). Sucintamente, à 0,5 g da amostra processada são adicionados 5,0 mL de metanol 80%. A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos, por 12 horas em agitador horizontal e novamente em vortex por 10 segundos. Após centrifugação a 1500 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi separado e diluído em tampão de diluição (0,2M NaH₂PO₄, 0,2M Na₂HPO₄, NaCl, BSA e água destilada, pH 7,0) para posteriores análises.

c) *Ensaio Imunoenzimático (EIA):*

As dosagens foram feitas através de EIA utilizando o anticorpo policlonal anti-testosterona R156/7 (Universidade da Califórnia – Davis – CA – USA) para testosterona. A reatividade cruzada para o anticorpo anti-testosterona R156/7 é testosterona 100%; 5 α -dihidrotestosterona 57,37%; androstenediona 0,27%; androsterona 0,4%; todos os outros metabólitos <0,04% (C. MUNRO, comunicação pessoal). Estes anticorpos foram escolhidos por apresentarem alta

reatividade cruzada com os metabólitos excretados nas fezes de *Mazama americana* (VERSIANI et al., 2009). Todos os extratos fecais foram diluídos em tampão de diluição (1:128 - 0,1M NaPO₄, 0,149M NaCl, pH 7,0) e dosados em duplicata. A validação das dosagens hormonais foi feita como descrito por BROWN et al. (2004), pela observação de uma disposição paralela entre a curva-padrão e a formada pelo pool de extratos fecais, preparados por diluição seriada.

3.4.4. *Complexo sinaptonêmico*

Para análise do complexo sinaptonêmico a metodologia utilizada foi proposta por WISE & NAIL (1987) com algumas modificações. A preparação celular da biopsia testicular seguiu as recomendações de SANTOS et al. (1994). O material proveniente da biopsia testicular foi picotado com auxílio de lâmina de bisturi até que a suspensão tomasse um aspecto leitoso e o mais homogêneo possível (mínimo de grumos). Esta suspensão foi centrifugada durante 13 minutos a 1500 rpm, retirado o sobrenadante e o pellet ressuspenso em 1,0 mL de solução de DMEM (suspensão matriz).

Para preparação das lâminas foram retirados 100 µL de suspensão matriz e diluída em 0,5 mL de meio de DMEM, tal diluição permitiu o ajuste apropriado da densidade de células (suspensão para confecção de lâminas). Uma gota desta suspensão foi colocada sobre uma lâmina previamente plastificada (utilizando solução contendo 1 g de plástico de transparência para retroprojector de Tri-Acetato – marca Schwan & Stabilo e 100 mL de Clorofórmio) com bordas seladas com esmalte à face da gota. Junto à gota de suspensão foram colocadas duas gotas de detergente Triton X100 a 0,03% (pH = 7,5) para a ruptura das membranas celulares, seguida de homogeneização horizontal e observação ao microscópio durante o tempo necessário para observação da expansão citoplasmática adequada.

Decorrido o tempo de expansão foram adicionadas cinco gotas de fixador, homogeneização por agitação horizontal e posteriormente a extensão do material uniformemente por toda a lâmina e secagem *overnight* em estufa a 45°C. Para

preparação do fixador, em 100 mL de água destilada foi adicionado tampão borato (3,1 g de ácido bórico em 250 mL água destilada, pH = 9,0) para correção do pH para 9,0; aquecimento até 70°C e adição de 4,0 g de paraformaldeído.

Ao esfriar foi acrescido 1,7 g de sacarose e corrigido o pH para 8,9. A solução fixadora foi armazenada em geladeira até o momento do uso, previamente filtrada em papel filtro (milipore). Decorrido o tempo de secagem, as lâminas passaram por lavagens em solução de Photo-Flo (Kodak) 0,4% durante um minuto, enxaguadas em água destilada e colocadas, novamente, para secar em posição vertical à temperatura ambiente.

Depois de secas, as lâminas foram submetidas ao processo de coloração com uma gota de solução colóide (0,5 g de gelatina dissolvida em 25 mL de água destilada em banho-maria a 60°C, resfriado e adicionado 0,25 mL de ácido fórmico) e duas gotas de nitrato de prata a 50%. Recobertas por lamínula e mantidas em câmara úmida e em banho-maria a 60°C por cerca de 7 minutos.

As lâminas coradas passaram por mais uma lavagem em água destilada, secas ao ar e avaliadas à microscopia óptica com aumento de 400x em busca de células na fase de prófase I, mais especificamente em paquíteno.

Sobre as células em paquíteno foram colocados uma grade de cobre (de 50 mesh) para avaliação em microscópio eletrônico de transmissão. Com auxílio de um bisturi, o plástico em torno da grade de cobre foi cortado (escarificado) em forma de quadrado e a lâmina introduzida em ângulo de proximadamente 45° em um recipiente contendo água, para destacamento apenas da região da grade (e plástico). O composto, plástico e grade, foi pescado com auxílio de pedaços de cartolina, colocados para secar e posteriormente recortados de modo que, apenas a grade e o plástico nela aderido fossem armazenados para observação ao microscópio eletrônico de transmissão, avaliação e captação de imagens dos paquítenos.

3.5. Análise estatística

Primeiramente, os resultados das avaliações morfométricas dos espermatozóides, dosagens de metabólitos de andrógenos fecais, medidas histológicas (diâmetro tubular e sua espessura epitelial), além das porcentagens das células intratubulares foram submetidas ao teste de normalidade de Anderson-Darling.

Detectou-se que o diâmetro do túbulo seminífero possuía distribuição normal e que a altura do epitélio germinativo dos mesmos, distribuição Lognormal. Logo, foram comparados pelo teste de Tukey.

As dosagens e os tipos celulares intratubulares foram comparados pelo teste não paramétrico de Bonferroni e por fim as medidas das cabeças dos espermatozóides foram comparadas pelo teste não paramétrico de Dunn.

IV. RESULTADOS

4.1. Avaliação do sêmen

Os resultados da avaliação dos parâmetros seminais dos animais experimentais estão apresentados na Tabela 2. Nesta tabela podemos observar que os animais 6 e 7 apresentaram-se azoospermicos.

Os animais puros (1 e 2) apresentaram, de modo geral, melhores características seminais com exceção à concentração espermática quando comparado ao animal 4 e o volume seminal em relação a todos os híbridos.

Dentre as estruturas morfológicas dos espermatozoides que apresentaram maiores porcentagens de defeitos podemos destacar o flagelo e a peça intermediária (Tabela 3).

Tabela 2. Parâmetros seminais da prole de veados-mateiro (*Mazama americana*) produtos do cruzamento de vários citótipos aos 18 meses de idade.

Animal (DCAP)	Volume (μL)	Concentração (Sptz $\times 10^9/\text{mL}$)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Patologias (%)*		Sptz Normais (%)
					Primárias	Secundárias	
1 (0)	110	3,59	80	3	20,0	10,0	70,0
2 (0)	160	4,03	75	4	20,0	10,0	70,0
3 (2)	220	2,10	70	3	3,0	30,0	67,0
4 (2)	320	6,33	80	3	54,0	7,5	38,5
5 (2)	200	2,08	55	2	29,0	13,0	58,0
6 (>2)	100	-	-	-	-	-	-
7 (>2)	200	-	-	-	-	-	-

* De acordo com Blom (1950). Entende-se Sptz como abreviação de espermatozoides.

Tabela 3. Porcentagem de patologias espermáticas da prole de veados-mateiros (*Mazama americana*) aos 18 meses de idade.

Animal (DCAP)	Patologias Espermáticas (%)					
	Flagelo	Gotas citoplasmáticas	Cabeça	Peça intermediária	Acrosoma	Ausência de defeitos
1 (0)	15,0	2,5	2,0	10,5	0,0	70,0
2 (0)	14,5	5,5	5,0	5,0	0,0	70,0
3 (2)	30,0	1,0	1,5	0,5	0,0	67,0
4 (2)	6,0	1,5	6,0	48,0	0,0	38,5
5 (2)	20,0	8,0	7,0	6,0	1,0	58,0
6 (>2)	-	-	-	-	-	-
7 (>2)	-	-	-	-	-	-

As análises citométricas dos espermatozóides dos animais amostrados estão apresentadas na Tabela 4, com exceção aos animais 6 e 7 que foram azoospermicos. Podemos observar que em todas as características morfométricas os animais 1, 2 e 3 foram semelhantes ($P>0,05$) pelo teste não paramétrico de Dunn, com exceção da largura menor do espermatozóide do animal 2 ($P<0,001$) os demais animais (4 e 5) foram diferentes entre si ($P<0,01$).

Tabela 4. Médias (desvios padrão) da micromorfometria dos espermatozóides da prole de prole de veados-mateiro (*Mazama americana*).

Animais	Comprimento (μm)	Largura Maior (μm)	Largura Menor (μm)	Área* (μm^2)
1	7,82 (0,56) ^b	4,22 (0,22) ^b	2,37 (0,28) ^c	27,23 (2,86) ^b
2	7,85 (0,29) ^b	4,32 (0,27) ^b	1,67 (0,25) ^a	27,10 (2,26) ^b
3	7,87 (0,35) ^b	4,31 (0,19) ^b	2,52 (0,32) ^c	28,03 (1,91) ^b
4	7,17 (0,28) ^a	4,12 (0,27) ^a	2,06 (0,30) ^b	24,09 (1,95) ^a
5	8,61 (0,52) ^c	4,63 (0,50) ^c	1,91 (0,53) ^b	32,12 (5,27) ^c
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-

* Área calculada pela fórmula Folha de Descartes, proposta por von DUIJN (1960). Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem pelo teste de Dunn ($P>0,01$).

4.2. Dosagens de metabólitos de testosterona e morfologia dos chifres

O Figura 3 mostra o perfil de metabólitos fecais de andrógenos, dos animais experimentais no período que vai do mês sete à 18 de vida. Adicionalmente, foi plotado nesta figura a observação pontual do aspecto do chifre durante as colheitas de seis, 12 e 18 meses de cada animal.

Através da análise individual de cada animal pelo teste de Bonferroni, os animais 3 e 4, originários do mesmo tipo de cruzamento (pai do citótipo Juína e mãe do citótipo Rondônia), não diferiram entre si durante todo o período avaliado ($P>0,05$). No entanto, entre, ambos animais e o animal 5 (Pai do citótipo Santarém e mãe Paraná) houve diferença significativa no mês 11 e entre o animal 3 e 5 durante o mês 16 e entre o 2 e 4 no mês 14.

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os animais de cruzamentos intracitótípos (1 e 2), com exceção aos meses 11, 14 e 15. Para os animais resultantes dos cruzamentos de linhagens evolutivas diferentes (6 e 7) não houve diferenças entre si ($P>0,05$).

Entre os animais puros (1 e 2) e o animal 7 (DCAP > 2) não houveram diferenças significativas ($P>0,05$), no entanto para o animal 6 (DCAP > 2) houve diferença apenas no 13º mês ($P<0,05$). Quando os puros são comparados com animal 3 não foram detectadas diferenças significativas, entre os puros e animal 4 observamos diferença significativa no 11º mês ($P<0,01$), e no 16º entre o animal 1 e 4 ($P<0,05$) e no 14º entre o animal 2 e 4 ($P<0,01$). Entre os puros e o animal 5 só foi detectado diferença significativa no 13º mês ($P<0,05$).

Através da avaliação morfológica dos chifres dos animais podemos observar que todos os animais perderam o velame até os 18 meses, embora os animais 5, 6 e 7 tivessem desenvolvido os chifres mais precocemente, em especial o animal 7, o qual já possuía chifres em botão aos 6 meses.

Os animais puros foram semelhantes entre si incluindo ainda o animal 3, os quais apresentaram chifres em botão aos 12 meses e o desencape até os 18 meses. O animal 4 desenvolveu mais rapidamente os chifres, posto que até os 12

meses não havia presença de botões e aos 18 meses já possuía chifres desencapados.

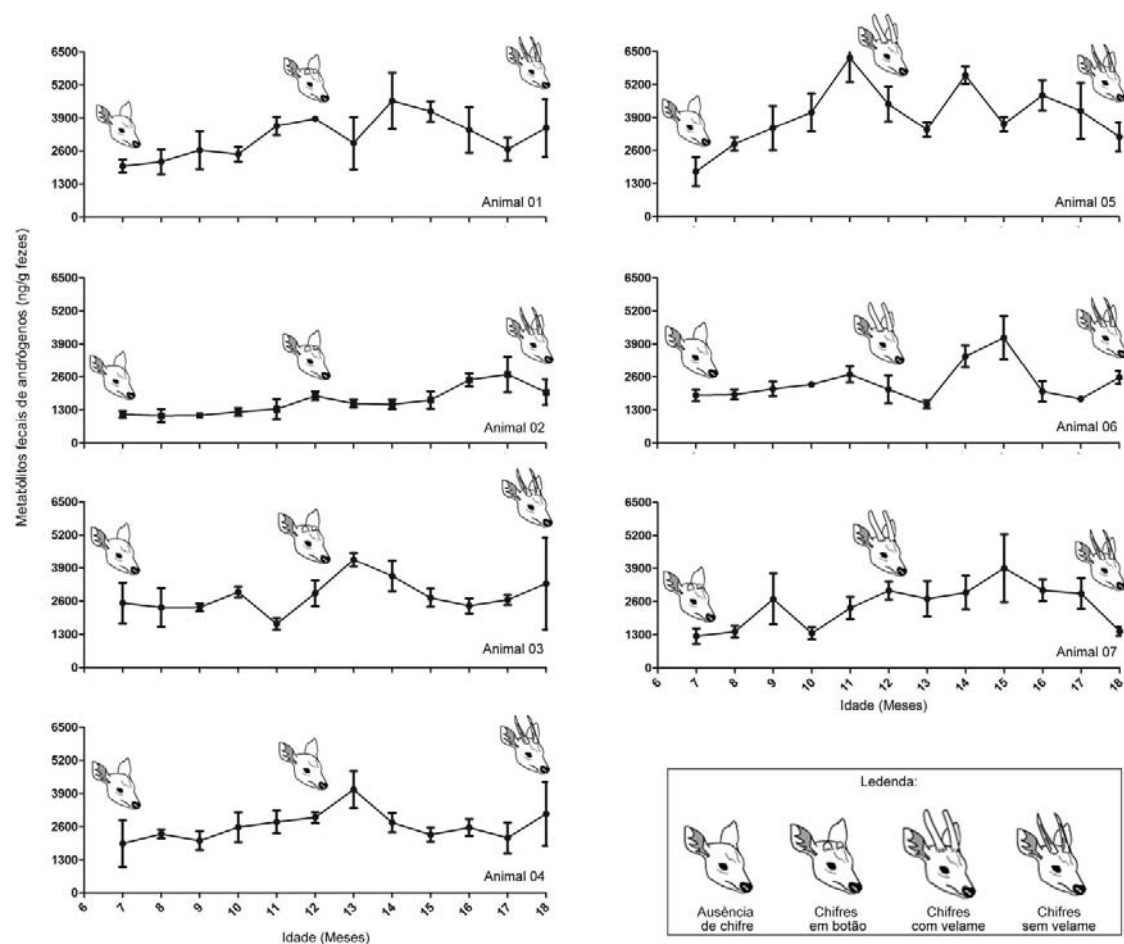


Figura 3. Perfil dos metabólitos fecais de andrógenos (pg/g de fezes) de acordo com a idade (7 - 18 meses) da prole de veados-mateiro (*Mazama americana*) com as descrições do aspecto dos chifres aos seis, 12 e 18 meses.

4.3. Avaliações histológicas

Os resultados da avaliação morfométrica dos túbulos seminíferos estão expressos na Figura 4. Como podemos observar, os animais resultantes de cruzamentos intracitótipo, ou seja, animal 2 ($215,48 \pm 17,97 \mu\text{m}$) e animal 1 ($202,99 \pm 23,16 \mu\text{m}$) apresentaram as maiores médias para diâmetro dos túbulos seminíferos no entanto, diferiram estatisticamente entre si ($P < 0,001$). Dentre os animais resultados de cruzamentos intercitótípos, o animal 5 obteve a maior média ($187,22 \pm 13,95 \mu\text{m}$) de diâmetro tubular ($P < 0,0001$), seguido pelos animais 4, 6 e 7 que não diferiram estatisticamente ($167,47 \pm 20,15 \mu\text{m}$; $171,29 \pm 14,28 \mu\text{m}$ e $160,36 \pm 16,92 \mu\text{m}$, respectivamente), e o animal 3 apresentou, significativamente ($P < 0,0001$) os menores diâmetros tubulares ($132,63 \pm 15,24 \mu\text{m}$).

O comprimento do epitélio seminífero não apresentou distribuição normal de acordo com o teste de Anderson-Darling ($P = 0,006$), no entanto, observamos que sua distribuição é Log-normal ($P = 0,074$). Com esta transformação logarítmica podemos observar (Figura 5) que os animais 1 ($71,05 \pm 11,35 \mu\text{m}$) e 2 ($70,80 \pm 11,01 \mu\text{m}$) não diferiram entre si ($P > 0,05$), no entanto, foram diferentes ($P < 0,0001$) do animal 5 ($62,07 \pm 6,07 \mu\text{m}$) e este por sua vez diferente dos animais 3, 4, 6 e 7 ($52,20 \pm 10,16 \mu\text{m}$; $56,68 \pm 10,32 \mu\text{m}$; $54,17 \pm 9,12 \mu\text{m}$ e $55,92 \pm 7,91 \mu\text{m}$, respectivamente) que não diferiram ($P > 0,05$).

O estudo morfológico dos núcleos e nucléolos das células presentes no interior dos túbulos seminíferos (Figura 6) estão expressos na Tabela 05. É importante lembrar que os animais 6 e 7 não tiveram todas as células identificadas devido à dificuldade da identificação de alguns núcleos que se apresentaram muito picnóticos e condensados (Figura 7).

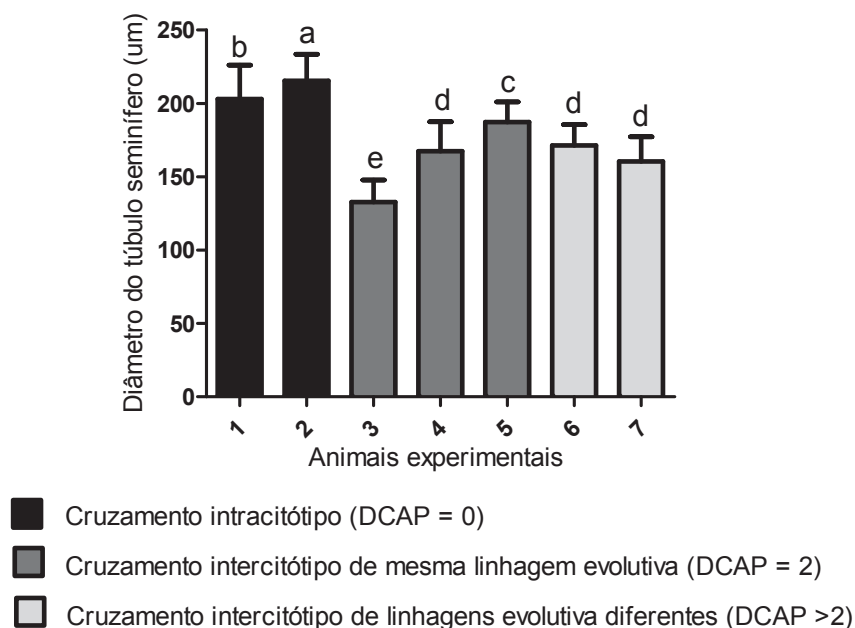


Figura 4. Diâmetro (μm) dos túbulos seminíferos da prole veados-mateiros (*Mazama americana*) de acordo com o tipo de cruzamento. Colunas sobpostas à “ns” não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

A Tabela 5 revela a proporção (porcentagem) dos tipos celulares presentes nos cortes histológicos dos animais experimentais. Pelo teste estatístico de Bonferroni ficou claro que os animais 3 e 4 tiveram as proporções dos tipos celulares semelhantes ($P > 0,05$), no entanto, foram diferentes do 5 apenas nos espermatócitos, ou seja, zigóteno/leptóteno ($P < 0,05$) e Paquíteno ($P < 0,001$) e espermatíde ($P < 0,001$).

Os animais 6 e 7 não diferiram entre si ($P > 0,05$), porém foram estatisticamente diferentes ($P \leq 0,01$) dos demais na proporção de todos os tipos celulares, com exceção dos espermatócitos primários iniciais (leptóteno/zigóteno) que foram semelhantes ($P > 0,05$).

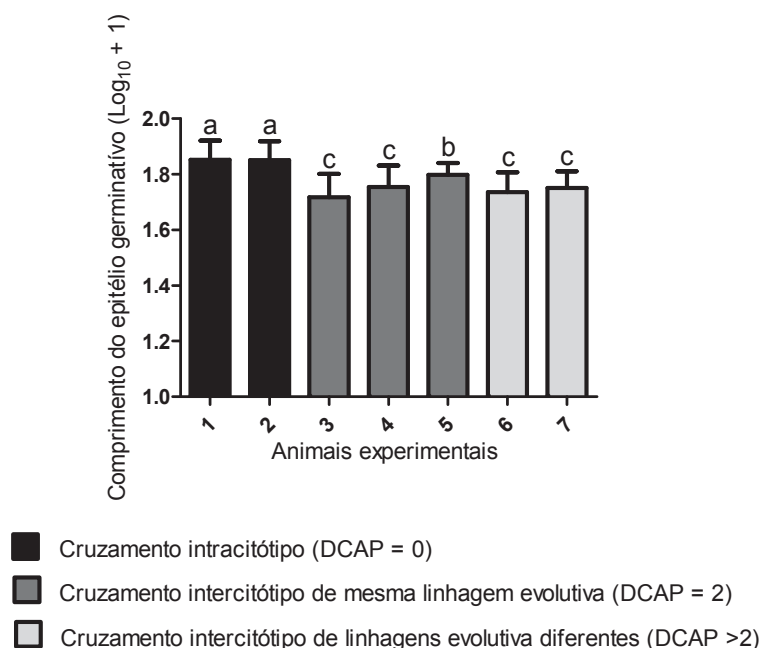


Figura 5. Altura do epitélio seminífero da prole de veados-mateiro (*Mazama americana*) de acordo com o tipo de cruzamento. Colunas sobpostas à mesma letra não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,05$).

Os animais (1 e 2) resultantes de cruzamentos intracitóticos (DCAP = 0) foram iguais entre si ($P > 0,05$), porém foram diferentes dos animais 3, 4 e 5 com relação à espermatogônias do tipo A ($P \leq 0,05$) e à espermátides arredondadas ($P \leq 0,01$). Foram diferentes ainda do animal 4 quanto à espermatogônias do tipo B ($P \leq 0,05$) e do animal 5 quanto à paquítenos ($P < 0,001$).

Considerando-se as quantidades absolutas de células no epitélio seminífero podemos observar que os tipos celulares que mais variaram, considerando todos os animais avaliados, incluindo puros (DCAP = 0) e híbridos (DCAP ≥ 2), foram os paquítenos e espermátides arredondadas, com um coeficiente de variação (CV) igual à 77,51 e 75,71, média de $11,54 \pm 8,95$ e $38,32 \pm 29,02$, valores máximos de 41 e 107, respectivamente, além de mínimo de 0 (zero) para ambos. Dentre os tipos celulares que menos variaram as células de Sertoli tiveram uma média de $11,36 \pm 1,27$ com valor máximo de 15 e mínimo de 8 com CV = 11,22 entre os animais avaliados (DCAP ≥ 0).

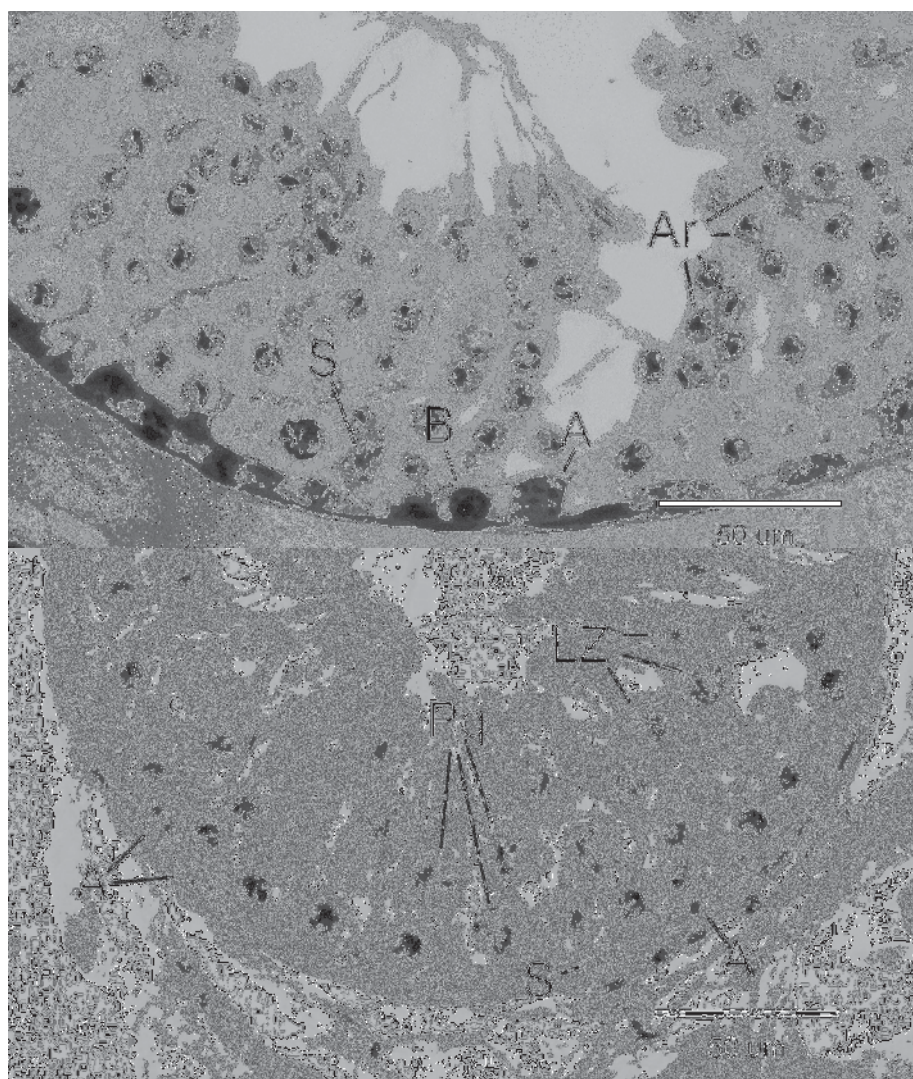


Figura 6. Fotomicrografias de cortes histológicos do animal 2, mostrando a morfologia das células do epitélio seminífero de veados-mateiro (*Mazama americana*). Entende-se por A uma espermatogônia do tipo A, B – espermatogônia do tipo B, LZ – células Leptóteno/Zigóteno, Pq – célula em paquíteno, Ar - espermátide arredondada e S – células de Sértoli.

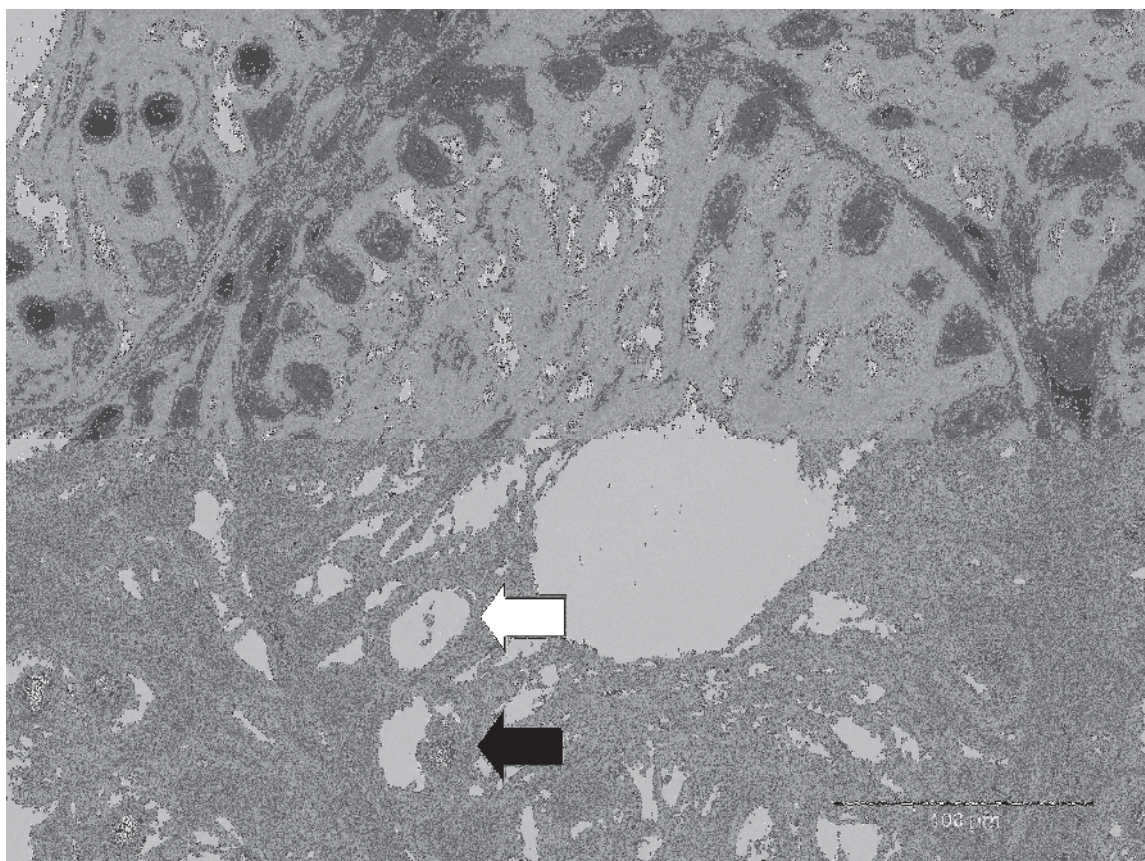


Figura 7. Fotomicrografia de um túbulo seminífero do animal 6 onde podem ser observadas vacuolizações (seta branca) do epitélio e células não identificáveis com núcleos condensados e picnóticos (seta negra).

Tabela 5. Médias (desvios padrão) das porcentagens dos tipos celulares do epitélio seminífero da prole de veados-mateiros (Mazama americana).

Animais	Espermatogônias A	Espermatogônias B	Leptótenos/ Zigótenos	Paquítenos	Espermátides arredondadas	Células de Sertoli
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	16,99 (3,21)	17,64 (2,08)	15,38 (2,24)	8,54 (1,79)	34,43 (3,86)	7,02 (1,13)
2	17,89 (2,89)	17,09 (2,20)	15,56 (2,09)	7,95 (1,46)	34,47 (3,99)	7,05 (0,86)
3	9,73 (3,03)	12,99 (3,75)	14,233 (0,89)	10,44 (1,43)	42,33 (4,50)	10,28 (2,19)
4	11,36 (3,08)	11,36 (2,82)	12,40 (2,50)	10,70 (3,67)	46,83 (6,31)	7,35 (1,72)
5	10,84 (1,53)	12,82 (2,14)	19,96 (6,35)	18,71 (5,27)	28,04 (8,30)	9,62 (0,93)
6	26,95 (5,94)	29,89 (7,38)	23,08 (13,60)	0,79 (1,36)	0,00 (0,00)	19,29 (3,19)
7	28,49 (4,71)	29,89 (5,55)	21,26 (7,27)	1,99 (2,72)	0,00 (0,00)	18,36 (2,53)

4.4. Avaliação dos complexos sinaptonêmicos

Devido a problemas de manutenção das amostras para avaliação sináptica (estudo dos complexos sinaptonêmicos) só foram possíveis de avaliar através de microscopia eletrônica sete células do animal 1, três do animal 3, quatro do animal 4, e três do animal 5.

Porém, a qualidade das células não foi suficientemente eficaz para permitir melhores avaliações. Apenas foi detectada uma célula no animal 4 com uma configuração sugestiva de trivalente (Figura 8) e com extremidades de cromossomos homólogos não pareadas (setas negras na Figura 8.3).

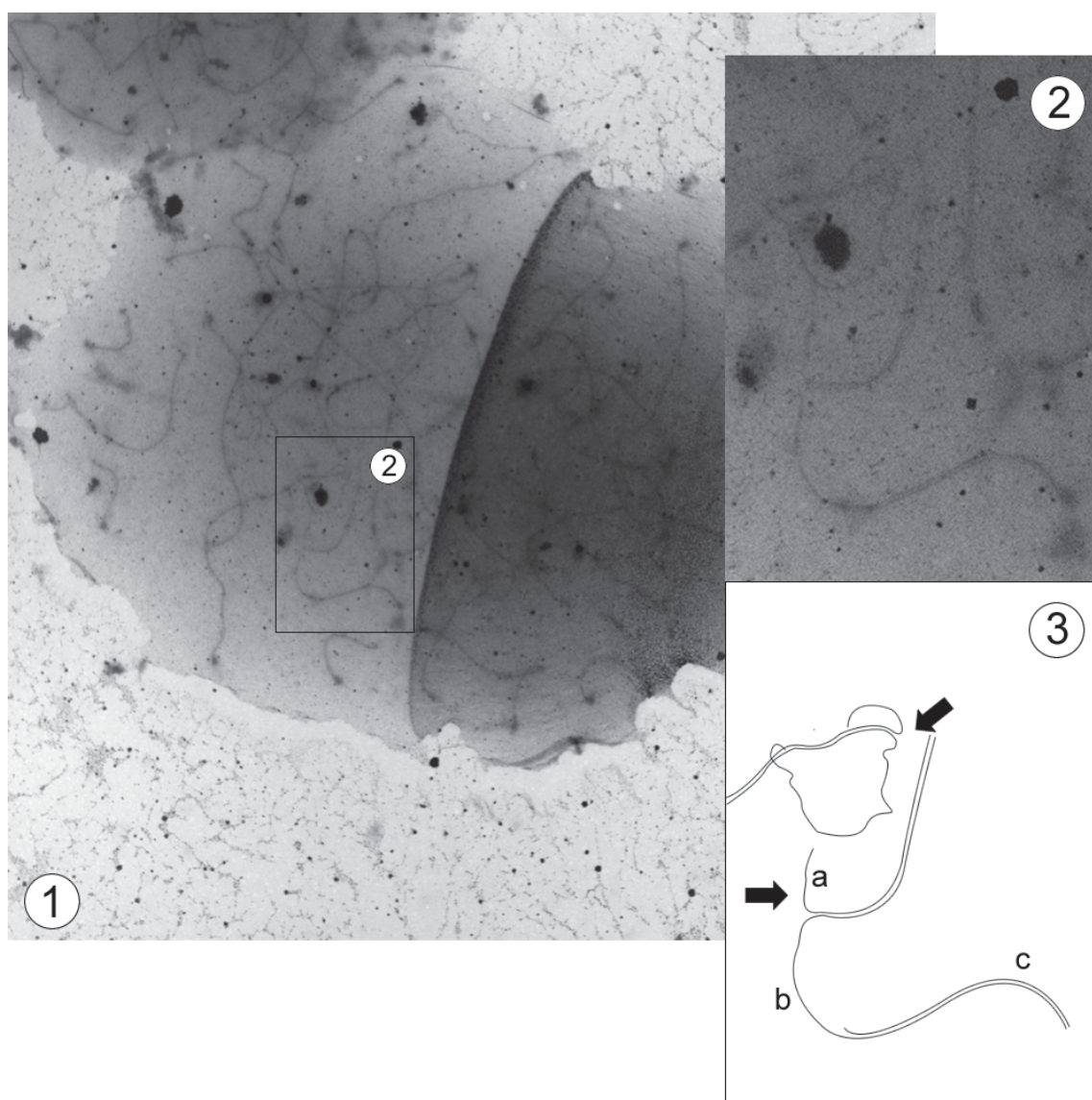


Figura 8. Eletronmicrografia de espermatócito primário do animal 4. Onde: 1 – vista panorâmica da célula, 2 – detalhe do interior da célula apresentando uma configuração sugestiva de trivalente, indicada pelos cromossomos a, b e c, além de extremidades não pareadas (setas negras); 3 – esquema ilustrativo dos detalhes 2.

V. DISCUSSÃO

De acordo com nossos resultados, podemos observar que os animais resultados de cruzamentos intracitótipo (1 e 2; DCAP = 0) tiveram, em geral, melhores qualidades seminais, seguidos pelos animais de cruzamentos intercitótipos de mesma linhagem (3, 4 e 5; DCAP = 2). Já os animais resultados de cruzamentos intercitótipos de linhagens evolutivas diferentes (6 e 7; DCAP > 2) apresentaram-se azoospermicos.

Híbridos de outras espécies também apresentaram espermatozoides, dentre eles burros (*Equus asinus* X *E. caballus*), bardotos (*E. caballus* X *E. asinus*) (TRUJILLO et al., 1969; CHANDLEY et al., 1974), veado-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), veado-mula (*O. hemionus*) (WISHART et al., 1988) e ainda entre espécies crípticas do musaranho *Sorex araneus* (JADWISZCZAKAND & BANASZEK, 2006).

De acordo com TRUJILLO et al (1969) existem três possibilidades de híbridos produzirem espermatozoides normais: 1 – Caso ao final da meiose I pelo menos uma célula filha recebesse a totalidade dos cromossomos de um dos parentais e para esta probabilidade os autores calcularam que a chance seria de 1 em 2^{32} ; 2 – Caso as células tronco apresentassem poliploidia e a meiose seguisse com um número duplicado de cromossomos aumentando as chance de um pareamento correto nas células germinativas, este fenômeno ocorre naturalmente em botânica e recebe o nome de anfidiplóidia ou alopoliploidia; e por fim 3 – caso existam células tronco (espermatogônias) com material genético apenas de um dos parentais, de acordo com os autores em ruminantes através das anastomoses entre conceptos em gestações gêmeares poderia produzir gametas quimeras durante a maturidade. No entanto, a probabilidade destas hipóteses ocorrem em veados-mateiros é ínfima, pois os partos gêmeares são raros além de que não ocorreram dentro deste experimento, não foram encontrados relatos de alopoliploidia em animais em especial em mamíferos onde a poliploidia é letal à

célula e por fim não foram identificadas células gigantes (como apresentado pelo autor) na histologia que pudessem justificar poliploidia.

No entanto, o estudo da citometria espermática seria de grande valia para inferir sobre a quantidade de material genético presente em seu interior como sugere BEATTY & FECHHEIMER (1972) que afirma ainda que o formato do núcleo espermático é controlado geneticamente.

Nossas avaliações morfológicas das células espermáticas mostraram que todos os animais apresentaram maiores quantidades de defeitos decorrentes de problemas gametogênicos (defeitos primários), como propõe a técnica de BLOM (1950), com exceção do animal 4, que teve maior quantidade de problemas de maturação (defeitos secundários).

A estrutura espermática mais afetada nos animais estudados foi o flagelo com exceção, novamente ao animal 4, que teve maiores problemas na peça intermediária. Nas avaliações seminais de burros e bardotos, CHANDLEY et al. (1974) encontraram que a maior quantidade de defeitos espermáticos também estavam relacionados ao flagelo, sendo que neste estudo poucas peças intermediárias foram afetadas.

Assim como CHANDLEY et al. (1974) e TRUJILLO et al. (1969), os animais híbridos amostrados neste trabalho apresentaram espermatozóides com citometrias intermediárias ou semelhantes aos animais puros, onde tomando por base os achados de BEATTY & FECHHEIMER (1972) os espermatozóides diplóides seriam significativamente maiores. Porém, uma avaliação criteriosa da citometria espermática na prole de veados-mateiro revelou aspectos interessantes. Os animais com DCAP = 0 foram iguais entre si, com a exceção da medida da largura menor, indicando que citótipo Juína tem espermatozóides mais largos na base. Logo, se colocarmos em escala de tamanho, temos o animal 2 com os espermatozóides mais estreitos, seguido pelo animal 5 e 4 e por fim os animais 3 e 1, ou seja, animal puro do citótipo Paraná (2), animal híbrido da linhagem do citótipo Paraná (5), animal cruzamento da linhagem Juína-Rondônia (4 e 3) e por último com espermatozóides mais largos na base o animal 1 (Puro para o citótipo Juína).

Estes resultados sugerem que os citótipos de linhagens evolutivas diferentes, em especial Juína e Paraná, têm diferenças no formato das células espermáticas, talvez uma característica individual já fixada nas populações.

A hibridação entre veado-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) e o veado-mula (*O. hemionus*) tiveram esterilidade observada e atribuída ao fato do híbrido produzir espermatozóides morfologicamente anormais, inclusive com aferição apoiada na citometria. Os animais híbridos possuíam células com menores cabeças e com bases mais largas. (WISHART et al., 1988).

A função estereidogênica de híbridos é pouco estudada, no entanto, sabe-se que a hibridação em si reflete em um decréscimo na funcionalidade de células de Leydig (CHUBB & NOLAN, 1987), porém, não suficiente para ocasionar falhas gametogênicas (NEVES et al., 2005). Nossos resultados sugerem que os vários cruzamentos influenciam na capacidade estereidogênica, posto que os animais 3 e 4, e, 6 e 7, que são originários de mesmos tipos de cruzamentos não diferiram entre si, porém quando comparados com outros cruzamentos variaram seus perfis em pelo menos um mês.

Um bom exemplo do fato descrito anteriormente são os animais de DCAP = 0, ou seja animais 1 e 2, onde apesar de originários de cruzamentos intracitótipo Juína e Paraná, respectivamente, variaram entre si os perfis hormonais nos meses 11, 14 e 15. Esta variação hormonal entre os animais e seus cruzamentos pode ser justificada pela não homogeneidade da resposta aos estímulos ambientais, ou seja, à falta de sazonalidade dos animais já previamente descrita por VERSIANI et al. (2008).

De acordo com ASHER et al. (1996) o cruzamento entre cervos Dama Europeu (*Dama dama dama*) e Dama Mesopotâmico (*D. d. mesopotamica*) produziu animais que, apesar de picos semelhantes de testosterona foram mais precoces inclusive com relação à espermatogênese. Este fato não foi observado com clareza em veados-mateiros, porém a avaliação pontual dos chifres (aos 6, 12 e 18 meses) sugere que os animais 5, 6 e 7 tiveram desenvolvimento mais precoce apesar de todos os animais terem perdido o velame até os 18 meses.

Outro fato interessante com relação à precocidade interespecífica é que o animal 4, híbrido de mesma linhagem evolutiva teve um rápido desenvolvimento dos chifres no período entre 12 e 18 meses, apesar de seu perfil de testosterona aparentemente tender à um declínio, contrapondo as prerrogativas de LINCOLN (1992) e PEREIRA (2010), onde o estágio do chifre é intimamente relacionado à testosterona.

As avaliações morfométricas dos cortes histológicos do testículo mostraram que os animais puros (DCAP = 0) tiveram os maiores diâmetros dos túbulos seminíferos e as maiores alturas do epitélio seminífero, possivelmente reflexo de sua funcionalidade, como proposto por NEVES et al. (2005), incluindo a atividade gametogênica.

Um fato interessante, é que os animais híbridos com DCAP > 2 foram semelhantes aos demais híbridos (DCAP = 2) quanto às medidas tubulares, com a exceção de que os animais DCAP > 2 possuíam grau superior de degeneração tubular com ausência de células espermáticas mais avançadas (estádios superiores aos espermátócitos primários), bem como TRUJILLO et al. (1969) e CHANDLEY et al. (1974) reportaram em burros e bardotos e BRITTON-DAVIDIAN et al. (2005) para camundongos.

Em musaranhos *Sorex* também não foram observadas diferenças com relação à morte celular quanto à animais puros e heterozigotos para uma fusão cêntrica (JADWISZCZAK AND BANASZEK, 2006).

Tanto em nossos achados para os animais híbridos de DCAP > 2, como na literatura (BRITTON-DAVIDIAN et al., 2005) encontramos a presença de células com núcleo picnótico e vacuolização epitelial, sugestivas de apoptose (GRIVICICH et al., 2007).

As reduções de comprimento do epitélio germinativo e diâmetro dos túbulos seminíferos além da perda das espermátides por apoptose nos híbridos são sugestivas de degeneração testicular. Esta patologia testicular é a causa mais comum de perda de fertilidade em mamíferos, apesar das causas primárias serem variadas (NASCIMENTO & SANTOS, 2003).

A perda de epitélio germinativo e degeneração das células germinativas estão intimamente ligadas em mamíferos híbridos (BRITTON-DAVIDIAN et al., 2005; JADWISZCZAKAND & BANASZEK, 2006).

O pareamento cromossômico durante a fase reducional parece ser o principal fator para avaliar o potencial e a qualidade da espermatogênese em especial nos animais de cruzamentos intercitótipos de mesma linhagem (DCAP =2), pois atestamos as capacidades espermatogênica e estereidogênciã. No entanto, até que ponto estes espermatozóides estariam suficientemente balanceados para que ocorra a produção de um possível F2?

Em humanos, observamos que a maioria das aneuploidias é atribuída à não disjunção dos cromossomos homólogos durante a fase de anáfase I ou das cromátides irmãs na anáfase II (HALE, 1996). De acordo com (JADWISZCZAKAND & BANASZEK, 2006) a heterozigosidade do cariótipo influencia diretamente na porcentagem de sinapses e suas posteriores disjunções na primeira fase da meiose.

Ao mensurar a distância cariotípica-evolutiva entre os pais além enumerar os rearranjos, podemos observar de acordo com os achados de ABRIL et al. (2010), que os parentais do animal 6 possuem a distância de três fusões em tandem, uma fusão cêntrica e uma inversão pericêntrica, já para o animal 7 diferencia-se do 6 por possuir uma fusão em tandem a mais.

De acordo com DOBGNY et al. (2002) uma fusão em tandem deprecia, acentuadamente a fertilidade da prole, no entanto, os parentais dos animais 3 e 4 são diferentes por apenas uma rearranjo em tandem e sua fertilidade não foi, suficientemente afetada nas características seminais, histológicas e de pareamento cromossômico, corroborando a depreciação sugerida para outro artiodáctilo, os bovinos (HANSEN, 1969). Se compararmos os indivíduos 3 e 4 aos animais com DCAP = 0, poderíamos sugerir sub-fertilidade, em especial pela presença de configuração sináptica anômala durante a meiose, observada no animal 4. Sendo este achado sugestivo de presença também no animal 3.

Avaliando a distância cariotípica entre os parentais do animal 5, podemos observar que existe apenas uma fusão cêntrica (Robertsoniana), que de acordo

com DOBGNY et al. (2002) não afetaria suficientemente a fertilidade do híbrido. No entanto, como foram apresentados em nossos resultados, este animal, assim como os demais híbridos de DCAP = 2, tiveram subfertilidade na qualidade espermática (aspectos físico-morfológicos) e histológica quando comparados com os animais puros (DCAP = 0).

É interessante citar que na análise dos parentais do animal 4 (T251 e T211) podemos observar que a fêmea (T211) do citótipo Rondônia possui uma fusão entre um cromossomo 5 e um supranumerário (B) e o pai (T251) do citótipo Juína não apresenta rearranjos, este tipo de configuração poderia explicar a presença de cromossomo com extremidade não pareada, no entanto, existem, na mesma célula mais bivalentes com mesma configuração, sugerindo que a célula não tenha alcançado o final do processo de formação dos complexos sinaptonêmicos, e que ainda estejam em zigóteno ou paquíteno inicial (BOGDANOV, 2003).

Para musaranhos *Sorex*, JADWISZCZAK AND BANASZEK (2006) calcularam que uma translocação Robertsoniana (fusão cêntrica) causa em média 1 a 2% de não disjunção durante a anáfase I. No entanto, o acúmulo deste rearranjo pode provocar maiores decréscimos na fertilidade (DOBGNY et al., 2002).

Para COYNE (2001) o mecanismo mais controverso de especiação seria por meio de alterações individuais em cromossomos, ou seja, a idéia de que um tipo de rearranjo como translocações e inversões pericêntricas pudessem causar “semi-esterilidade” no portador por conta de problemas meióticos. A justificativa do autor é de que um cromossomo rearranjado que cause “semi-esterilidade” de heterozigotos teria dificuldade de manter altas frequências dentro da população e só teria importância em pequenas populações.

Logo, é importante lembrarmos que a fragmentação de habitat causa um efeito ainda maior em populações com rearranjos únicos. Este fato passa a ter um peso maior se tomarmos por base os dados de FONSECA (1985) que afirma que na década de 80 do século passado, 43% da população humana brasileira estava concentrada na região da Mata Atlântica e conseqüentemente, somente 5 a 12%

das florestas originais ainda restaram, com ainda mais um agravante, as áreas residuais estão fragmentadas pela produção agrícola (BROWN & BROWN, 1992).

Sendo a mata atlântica um dos habitats do veado-mateiro (VARELA et al., 2010) podemos observar que com a fragmentação reduz-se a população efetiva forçando uma endogamia nas populações e aumentando o risco de extinção.

Assim como é difícil definir o que é espécie, também é difícil definir até que ponto os parentais são divergentes o suficiente para induzir a classificação da prole como híbrido ou não (EDMANDS, 2002).

Geralmente a hibridação entre espécies é comumente associada ao decréscimo da fertilidade chegando à esterilidade ou inviabilidade da prole. Esta perda de fertilidade ou viabilidade é importante para a manutenção, diferenciação e/ou adaptação das espécies (BARTON, 2001). Porém, em alguns casos a hibridação promove uma heterose entre os indivíduos provocando adaptações e melhorando alguns aspectos inclusive reprodutivos, a este fenômeno dá-se o nome de vigor híbrido (EDMANDS, 2002).

Nossos resultados mostraram que os animais resultados de cruzamentos intercitóticos de linhagens evolutivas diferentes ($DCAP > 2$) foram estéreis por bloqueios meióticos durante a fase de paquíteno embora a estrutura do parênquima testicular e as funções estereidogênicas estivessem normais, isto nos induz afirmar que a distância cromossômica entre estes parentais é suficientemente grande a ponto de causar esterilidade na prole. Este mecanismo foi previamente descrito como mecanismo cariotípico de isolamento reprodutivo por DOBZHANSKY (1936).

Tendo os animais puros ($DCAP = 0$) como controle por apresentarem em todos os aspectos reprodutivos os melhores valores, podemos observar que os animais híbridos com $DCAP = 2$ tiveram uma sugestiva subfertilidade. Tomando por base as considerações de EDMANDS (2002), pode-se especular que o vigor híbrido pode ter mascarado a mensuração do potencial da fertilidade e a comparação de isolamento reprodutivo entre os parentais.

Portanto, pelos resultados obtidos no presente estudo, podemos sugerir que existem pelo menos duas espécies de veados-mateiro compostas pelos dois

distintos clados já descritos citogenética e molecularmente, posto que os conceitos entre estas linhagens foram estéreis, o que se insere no clássico conceito biológico de espécie.

Com relação aos híbridos de mesma linhagem reprodutiva, sugere-se que possam ser subespécies distintas e que podem estar em processo de especiação avançada. Mesmo que mecanismos pós-zigóticos de isolamento reprodutivo possam não estar claramente presentes entre essas variantes cariotípicas, existe a possibilidade de existência de mecanismos pré-zigóticos envolvidos nas populações naturais. Estudos mais detalhados sobre o pareamento meiótico podem também esclarecer o efeito das diferenças cromossômicas no isolamento reprodutivo entre cariótipos próximos, contribuindo para a solução da questão taxonômica dos veados-mateiros.

VI. CONCLUSÕES

Podemos concluir que os animais puros (1 e 2) apresentaram melhores qualidades físico-morfológicas do sêmen quando comparados com os animais híbridos de mesma linhagem evolutiva (3, 4 e 5). Os híbridos entre linhagens evolutivas diferentes foram azoospérmicos. A histologia testicular revelou melhores qualidades morfométricas e população de células espermáticas para os animais puros (1 e 2), seguidos dos animais híbridos de mesma linhagem evolutiva (3, 4 e 5). Os híbridos de linhagens evolutivas diferentes (6 e 7) apresentaram degeneração dos túbulos seminíferos. Foi encontrado uma configuração meiótica anômala no pareamento dos cromossomos do animal 4 que pode sugerir formação de gametas desbalanceados.

Logo, podemos observar que existe um eficiente mecanismo de isolamento reprodutivo entre as duas linhagens evolutivas de veados-mateiros (*Mazama americana*), e uma depressão na fertilidade com os cruzamentos de citótipos de mesma linhagens evolutivas.

VII. IMPLICAÇÕES

Apesar deste trabalho não ter envolvido todos os citótipos de veado-mateiro, podemos observar que com os resultados serão necessários novos métodos de abordar a questão de conservação destes animais.

Em 1986, RYDER propôs um novo conceito no manejo de conservação de espécies, a criação das Unidades Evolutivamente Significativas (ESU), do inglês “Evolutionary Significant Units”, tendo como base os aspectos geográficos, morfológicos, comportamentais e genético de cada população.

Através dos nossos estudos, vemos, claramente, a necessidade de considerar que cada citótipo deve ser visto além dos conceitos de espécies e subespécies, mas sim como ESUs distintas. Pois, com o cruzamento indistinto o acúmulo dos rearranjos entre os citótipos pode motivar a divergência populacional e conseqüentemente uma pressão para especiação (KING, 1997), no entanto caso esta pressão seja muito grande a depressão da fertilidade da prole pode diminuir a população efetiva, causando endogamia e a grande possibilidade de extinção de até mesmo de um citótipo.

Os dados aqui apresentados, juntamente com a situação da Mata Atlântica sugere que a população de veados-mateiro da bacia do rio Paraná deveria migrar do status de “Dados Deficientes” pela IUCN para, possivelmente, “Criticamente Ameaçada” (Critically endangered – CR), exigindo um plano de conservação urgente, já que seria encarada como uma ESU distinta.

VIII. REFERÊNCIAS

ABREU, C. P. **Fatores que influenciam a produção de sêmen de touros mestiços *Bos taurus* x *Bos indicus***. 2000. 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) –Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2000.

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**, Basel, v. 128, n. 1-3, p. 177-187, 2010.

ALLEN, J. A. Notes on american deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v. 34, n. 18, p. 521-553, 1915.

ALMQUIST, J. O.; BARBER, K. A. Puberal characteristics and early growth of Charolais bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 38, p. 831-834, 1974.

ANDERSON, E. Hybridization of the habitat. **Evolution**, Lancaster, v. 2, p. 1–9, 1948.

ASHER, G. W.; BERG, D. K.; BEAUMONT, S.; MORROW, C. J.; O'NEILL, K. T.; FISHER, M. W. Comparison of seasonal changes in reproductive parameters of adult male European fallow deer (*Dama dama dama*) and hybrid Mesopotamian x European fallow deer (*D. d. mesopotamica* x *D. d. dama*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 45, p. 201-215, 1996.

ASHER, G. W.; GALLAGHER, D. S.; TATE, M. L.; TEDFORD, C. Hybridization between Sika Deer (*Cervus nippon*) and Axis Deer (*Axis axis*). **Journal of Heredity**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 236-240, 1999.

BAKER, R. J.; BRADLEY, R. D. Speciation in mammals and the genetic species concept. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 87, n. 4, p. 643-662, 2006.

BALLINGER, S. W. **Allozymic and mitochondrial DNA analysis of sympatric white-tailed and mule deer in West Texas**. 1987. 48 p. Dissertação - Texas A & M Univ., College Station. 1987.

BARROS, M. A.; REIG, O. A.; PEREZ-ZAPATA, A. Cytogenetics and karyosystematics of South American oryzomyine rodents (Cricetidae: Sigmodontidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 59, n. 34-38, 1992.

BARTON, N. H. The role of hybridization in evolution. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 10, p. 551-568, 2001.

BEATTY, R. A.; FECHHEIMER, N. S. Diploid spermatozoa in rabbit semen and their experimental separation from haploid spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, n. 7, p. 267-277, 1972.

BENIRSHCKE, K. V.; KUMAMOTO, A. T. Mammalian cytogenetics and conservation of species. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 82, p. 187-191, 1991.

BERNDTSON, W. E.; PICKET, B. W. Relationship of absolute number of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 64, n. 3, p. 241-246, 1987.

BLOM, E. Interpretation of spermatocytology in bulls. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 1, p. 223-228, 1950.

BOER, P.; JONG, J. H. Chromosome pairing and fertility in mice. In: GILLIES, C. B. **Fertility and chromosome pairing: recent studies in plants and animals**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 37-76.

BOGDANOV, Y. Variation and evolution of meiosis. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 39, n. 4, p.363-381, 2003

BORODIN, P. M.; ROGATCHEVA, M. B.; ZHELEZOVA, A. I.; Oda, S. I. Chromosome pairing in inter-racial hybrids of the house musk shrew (*Suncus murinus*, insectivora, Soricidae). **Genome**, Toronto, v. 41, p. 79-90, 1998.

BORODIN, P. M.; BARREIROS-GOMEZ, S. C.; ZHELEZOVA, A. I.; BONVICINO, C. R.; D'ANDREA, O. S. Reproductive isolation due to the genetic incompatibilities between *Thrichomys pachyurus* and two subspecies of *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Genome**, Toronto, v. 49, p. 159-167, 2006.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; UNANIAN, M. M.; DODE, M. A. N.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, Stoneham, n. 62, n. 7, 2004.

BRITTON-DAVIDIAN, J.; FEL-CLAIR, F.; LOPEZ, J.; ALIBERT, P.; BOURSOT, P. The genus *Mus* as a model for evolutionary studies Postzygotic isolation between the two European subspecies of the house mouse : estimates from fertility patterns in wild and laboratory-bred hybrids. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 84, p. 379-393, 2005.

BRITTON-DAVIDIAN, J.; CATALAN, J.; DRACA RAMALHINHO, M.; GANEM, G.; AUFFRAY, J.C. CAPELA, R.; BISCOITO, M., SEARLE, J.B.; LUZ MATHIAS, M. Rapid chromosomal evolution in island mice. **Nature**, London, n. 403, p. 158, 2000.

BROWN JUNIOR, K. S.; BROWN, G. G. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: WHITMORE, T. C.; SAYER, J. A. **Tropical deforestation and species extinction**. Chapman and Hall, London, 1992, p. 119-142.

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

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species**. 2nd ed. Smithsonian Institution, 2004, p. 1-93.

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

CARNELOSSI, E. A. G. **Diferenças moleculares entre citótipos de Mazama americana (Artiodactyla: Cervidae)**. 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

CARR, S. M.; BALLINGER, S. W.; DERR, J. N.; BLANKENSHIP, L. H.; BICKHAM, J. W. Mitochondrial DNA analysis of hybridization between sympatric white-tailed deer and mule deer in West Texas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, n. 83, p. 9576-9580, 1986.

CBRA - Colégio Brasileiro De Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte. 1998. 49p.

CHANDLEY, A. C.; SHORT, R. V.; ALLEN, W. R. Meiosis in interspecific equine hybrids. I. The male mule (*Equus asinus* x *E. caballus*) and hinny (*E. caballus* x *E. asinus*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, n. 13, p. 330-341, 1974.

CHANDLEY, A. C. The chromosomal basis of human infertility. **British Medical Bulletin**, Oxford, n. 35, p. 181-186, 1979.

CHANDLEY, A. C. Meiotic studies and infertility. In: DANIEL, A. **The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements**. New York: Alan R. Liss, 1988, p. 361-382.

CHANDLEY, A. C.; SHORT, R. V.; ALLEN, W. R. Cytogenetic studies of three equine hybrids. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, Cambridge, n. 23, p. 365-370, 1975.

CHASE JUNIOR, C. C.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A. C.; MENCHACA, M. A.; WEST, R. L.; JOHNSON, D. D.; BUTTS JUNIOR, W. T. Prewaning growth traits for Senepol, Hereford, and reciprocal crossbred calves and feedlot performance

and carcass characteristics of steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 2967-2975, 1998.

CHUBB, C.; NOLAN, C. Mouse hybrid sterility and testicular function. **Biology of Reproduction**, Champaign, n. 36, p. 1343-1348, 1987.

CORTI, M.; CAPANNA, E.; ESTABROOK, G.F. Microevolutionary sequences in house mouse chromosomal speciation. **Systematic Zoology**, Washington, n. 35, p. 163-175, 1986.

COYNE, J. A.; ORR, H. A. The evolutionary genetics of speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, n. 1366, p. 287-305, 1998.

COYNE, J. Reproductive isolation. In: BRENNER, S.; MILLER, J. H. **Encyclopedia of Genetics**, Academic Press: New York. 2001, p. 1679-1686.

CRAFT, W. A. The sex ratio in mule and other hybrid mammals. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, n. 1, p. 19-40, 1938.

CRONIN, M. A. Mitochondrial DNA phylogeny of deer (Cervidae). **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 72, n. 3, p. 503-566, 1991.

CRONIN, M. A.; VYSE, E. R.; CAMERON, D. G. Genetic relationships between mule deer and white-tailed deer in Montana. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 52, p. 320-328, 1988.

DEAKIN, A.; MUIR, G. W.; SMITH, A. G. Hybridization of domestic cattle, bison and yak. **Report of the Wainwright Experiment**, Department of Agriculture, Dominion of Canada. n. 479, p. 5-29, 1935;

DERR, J. N. **Genetic interactions between two species of North American deer, *Odocoileus virginianus* and *O. hemionus***. 1990. Tese (Doutorado) - Texas A&M Univ., College Station. 1990.

DERR, J. N. Genetic interactions between white-tailed and mule deer in the southwestern United States. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 55, p. 228-237, 1991.

DERR, J. N.; HALE, D. W.; ELLSWORTH, D. L.; BICKHAM, J. W. Fertility in an F1 male hybrid of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) x mule deer (*O. hemionus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 93, p. 111-117, 1991.

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

DOBZHANSKY, T. H. Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. **Genetics**, Austin, v. 21, p. 113-135, 1936.

DOUZERY, E.; RAND, E. The mitochondrial control region of Cervidae: Evolutionary patterns and phylogenetic content. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 14, n. 11, p. 1154-1166, 1997.

DUARTE, J. M. B. Captive management. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**, 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2010, p. 240-247.

DUARTE, J. M. B. **Análise citogenética e taxonômica do gênero Mazama (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. Não paginado. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Reprodução assistida em Cervidae brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1, p. 111-121, 1995.

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

DUIJN, C. Mensuration of the heads of bull spermatozoa. **Mikroskopie**, Viena, v. 14, p. 265-276, 1960.

EPSTEIN, C. J. **The consequences of chromosome imbalance**. Cambridge University Press, 1986.

FERLIN, A.; ARREDI, B.; FORESTA, C. Genetic causes of male infertility. **Reproductive Toxicology**, New York, v. 22, p. 133-141, 2006.

FONSECA, G. A. B. The vanishing Brazilian Atlantic forest. **Biological Conservation**, Essex, v. 34, p. 17-34, 1985.

FREITAS, T. R. O. Geographic variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia, Octodontidae) and its cytogenetic relationship with other species of the genus. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 67, p. 193-198, 1994.

GARCIA, L.; PONSÁ, M. M.; EGOZCUE, J.; GARCIA, M. Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 69, p. 103-120, 2000.

GAVIN, T. A.; MAY, B. Taxonomic status and genetic purity of Colombian white-tailed deer. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 52, p. 1-10, 1988.

GIRALDO, A.; BUENO, M.; SILVA, E.; RAMÍREZ, J.; UMANA, J.; ESPINAL, C. Estudio citogenético de 288 *Aotus* colombianos. **Biomedica**, Bogotá, v. 6, p. 5-13, 1986.

GOLDSMITH, W. M. Sperm formation in the domestic animals, with consideration of the sterility and fertility in mules, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 12, p. 363-369, 1917.

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

GREIG, J. C. Principles of genetic conservation in relation to wildlife management in southern Africa. **South African Journal of Wildlife Research**, Bloubergstrand, v. 9, p. 57-78, 1979.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007

GROVES, C. P.; GRUBB, P. Relationships of living deer. In WEMMER, C. M. **Biology and Management of the Cervidae**. Washington, Smithsonian Institution Press. 1987, p. 21-59.

GUIMARÃES, S. E. F.; PINHEIRO, L. E. L.; GUIMARÃES, J. D. Meiotic peculiarities in hybrid buffalo. **Theriogenology**, Stonehan, v. 43, p. 579-583, 1995.

GUSTAVSSON, I. Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals - A review. **Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie**, Berlin, v. 97, p. 176-195, 1980.

HALDANE, J. B. S. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 12, n. 2, 1922.

HANSEN, K. M. Bovine tandem fusion and infertility. **Hereditas**, London, v. 63, p. 453-454, 1969.

HOLLOCHER, H. Reproductive isolation in Drosophila: how close are we to untangling the genetics of speciation? **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 8, n. 6, p. 709-714, 1998.

IUCN. **Red List of Threatened Species**. Versão 2010.1. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: 12 mai. 2010.

JADWISZCZAK, K.; BANASZEK, A. Fertility in male common shrew, *Sorex araneus*, from the extremely narrow hybrid zone between chromosome races. **Mammalian Biology**, Berlin, v. 71, n. 5, p. 257-267, 2006.

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

KATARYNA, A.; JADWISZCZAK, K. A.; BANASZEK, A. Fertility in the male common shrews, *Sorex araneus*, from the extremely narrow hybrid zone between chromosome races, **Mammalian Biology**, Berlin, v. 71, p. 257–267, 2006.

KING, M. **Species evolution: The role of chromosomal change**. Nova Iorque: Cambridge University Press, 1993.

LINCOLN, G. A. Biology of antlers. **Journal of Zoology**, London, v. 226, p. 517–528, 1992.

LUNA, L. G. **Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968, 258 p.

MASSARINI, A.; BARROS, M. A.; ORTELLS, M. O. REIG, O. A. Evolutionary biology of fossorial Ctenomyine rodents (Caviomorph: Octodontidae). I. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in Central Argentinian populations of tuco-tucos. **Genetica**, Dordrecht, v. 83, p. 131-144, 1991.

MAYR, F. **Animal species and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, Cambridge, 1963, 797p.

McGOVERN, P. T. The barriers to interspecific hybridisation in domestic and laboratory animals. II. Hybrid sterility. **British Veterinary Journal**, London, v. 132, p. 68-75, 1976.

MOLINA, R.S.; DEATON, O.W.; MUÑOZ, H. Potencial productivo del Romosinuano y sus cruzamientos para ganado de carne. **Prod. Anim. Trop.**, Santo Domingo, v.7, n.4, p.272-277, 1982.

MOORHEAD, R.S.; NOWELL, P.C.; MELINAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, A. Chromosome preparations of leucocytes culture from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, Orlando, v.20, p.13, 1960.

MORAIS, M. Tolerancia al calor de bovinos Holstein-Cebú. II. Efecto de la temperatura ambiental y la humedad relativa en la temperatura rectal, frecuencia respiratoria y tasa sudoral en novillas cruzadas. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**, La Habana v.16, p.193-200, 1985.

MUIR, P. D.; SEMIADI, G.; ASHER, G. W.; BROAD, T. E.; TATE, M. L.; BARRY, T. N. Sambar Deer (*Cervus unicolor*) x Red Deer (*C. elaphus*) Interspecies Hybrids. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 88, p. 266-372, 1997.

NACHMAN, M.W.; SEARLE, J. B. Why is the house mouse karyotype so variable? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 10, p. 397-402, 1995.

NARDON, R.; RAZZOK, A. G.; MOURA, A. C.; FIGUEIREDO, L. A.; LIMA, M. L. P. Influência da raça, época de abate e metodologia de análise nas características quali-quantitativas de carcaças de bovinos selecionados para ganho de peso. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza: UFC, 1996. p.200-202.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 137p.

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

NEVES, E. S.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L. R. Ultrastructural observation of the mule testis indicates normal function of somatic cells. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 2, n. 4, p. 263-271, 2005.

NUNES, A. L. V.; GASPARINI, R. L.; DUARTE, J. M. B.; PINDER, L.; BUSCHINELLI, M. C. Captura, contenção e manuseio. In: DUARTE, J.M.B. (Ed.). **Biologia e conservação dos cervídeos sul-americanos**. Jaboticabal: FUNEP, 1997, p. 142-170.

OKA, A.; MITA, A.; SAKURAI-YAMATANI, N.; YAMAMOTO, H.; TAKAGI, N.; TAKANO-SHIMIZU, T.; TOSHIMORI, K.; MORIWAKI, K.; SHIROISHI, T. Hybrid break down caused by substitution of the X chromosome between two mouse subspecies. **Genetics**, Austin, v. 166, p. 913–924, 2004.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos Canchim ao carrapato (*Boophilus microplus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 25., 1986, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 1986. p.262.

PEREIRA, R. J. G. Male Reproduction. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**, 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2010, p. 39-50.

PINHEIRO, L. E. L.; CARVALHO, T. B.; OLIVEIRA, D. A. A. A 4/21 tandem fusion in cattle. **Hereditas**, London, v. 122, p. 99-102, 1995.

PINHO, M. P.; MUNERATO, M.S.; NUNES, A.L.V. Anesthesia and chemical immobilization. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**, 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2010, p. 228-239.

RAZOOK, A.G.; LEME, P.R.; PACKER, I.U.; LUCHIARI FILHO, A.; NARDON, R.F. TROVO, I.B.; CAPELOZZA, C.N.Z.; PIRES, F.L.; NASCIMENTO, J.; BARBOSA, C.; COUTINHO, J.L.B.; OLIVEIRA, W.J. Evaluation of Nellore, Canchim, Santa Gertrudis, Holstein, Brown Swiss and Caracu as sire breeds in matings with

Nellore cows. I. Effects on progeny growth, carcass traits and crossbred productivity. In: 3rd WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 3., 1986, Lincoln. **Anais...** Lincoln: University of Nebraska Board of Regents, 1986. p. 348-352.

RIBEIRO, A. M. Os veados do Brasil segundo as coleções Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. **Revista do Museu Paulista**, São Paulo, n. 11, p. 209-308, 1919.

ROBINSON, W.P.; BERNASCONI, F.; MUTIRANGURA, A., LEDBETTER, D.H.; LANGLOIS, S.; MALCOLM, S.; MORRIS, A.M.; SCHINZEL, A.A. Nondisjunction of chromosome 15: Origin and recombination. **American Journal of Human Genetics**. v. 53, p. 740-751, 1993.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. 2000. f. 174. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RUMPLER, Y.; DUTRILLAUX, B. Chromosomal evolution in *Malagasy lemurs*. **Cytogenetics and Cell Genetics**. Basel, v. 42, p. 164-168, 1986.

RYDER, O. A. Species conservation and systematic: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, n. 1, p. 9-10, 1986.

SANTOS, J. L.; JIMÉNEZ, M. M.; DÍEZ, M. Synaptic patterns of rye B chromosomes. I. The standard type. **Chromosome Research**, Oxford, v. 1, p. 145-152, 1994.

SARRIA-PEREA, J. A. **Comparações entre alguns citótipos de Mazama americana (ARTIODACTYLA: CERVIDAE): Quanto grande é a diferença entre eles?** 2004. 51 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SCHMUTZ, S. M.; FLOOD, P. F.; MOKER, J. S.; BARTH, A.; MAPLETOFT, R.; CATES, W. Incidence of chromosomal anomalies among western Canadian beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 70, p. 779-783, 1990.

SEARLE, J.B. Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. In HARRISON, R.G. **Hybrid Zones and the evolutionary process**, New York: Oxford University Press, 1993, p. 309-353.

SMITH, M. H.; BRANAN, W. V.; MARCHINTON, R. L.; JOHNS, P. E.; WOOTEN, M. C. Genetic and morphologic comparisons of red brocket, brown brocket, and white-tailed deer. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 67, n. 1, p. 103-111, 1986.

STUBBLEFIELD, S. S.; WARREN, R. J.; MURPHY, B. R. Hybridization of free-ranging white-tailed and mule deer in Texas. **Journal of Wildlife and Management**, Bethesda, v. 50, p. 688-690, 1986.

TATE, M. L.; GOOSEN, G. J.; PATENE, H.; PEARSE, A. J.; McEWAN, K. M.; FENNESSY, P. F. Genetic Analysis of Pere David's x Red Deer Interspecies Hybrids. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 88, 1997.

TAYLOR, K. M.; HUNGERFORD, D. A.; SNYDER, R. L. Artiodactyl mammals: their chromosome cytology in relation to patterns of evolution. In: BENIRSCHKE K. **Comparative mammalian cytogenetics**. Berlin: Springer Verlag, 1969, p. 346-356.

TAYLOR, P. J. Patterns of chromosomal variation in African rodents. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 81, p. 317-331, 2000.

THOMAS, O. On certain of the smaller south american cervidae. **Annals and Magazine of Natural history**, London, v. 11, p. 585-589, 1913.

TRUJILLO, J. M.; OHNO, S.; JARDINE, J. H.; ATKINS, N.B. Spermatogenesis in a male hinny: Histological and cytological studies. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 79-84, 1969.

VARELA, D. M.; TROVATI, R. G.; GUZMÁN, K. R.; ROSSI, R. V.; DUARTE, J. M. B. Red brocket deer *Mazama americana* (Erxleben 1777). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**, 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2010, p. 151-159.

VELASCO, J.D. Species concepts should not conflict with evolutionary history, but often do. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, Oxford, v. 39, p. 407-414, 2008.

VERSIANI, N. F.; PEREIRA, R. J. G.; DUARTE, J. M. B. Annual variations in fecal androgen metabolites and antler cycle of captive red brocket bucks (*Mazama americana*) in southeast Brazil. **European Journal of Wildlife Research**, Heidelberg, v. 55, p. 535-538, 2008.

VIÉ, J. C.; VOLOBOUEV, V.; PATTON, J.; GRANJON, L. A new species of *Isothrix* (Rodentia, Echimyidae) from French Guiana. **Mammalia**, Paris, v. 60, p. 393–406, 1996.

VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; KOIFFMANN, C. P.; DUTRILLAUX, B. Chromosomal phylogeny of *Lagothrix*, *Brachyteles* and *Cacajao*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 39, p. 99-104, 1985.

WALKER, L. I.; SPOTORNO, A. E. Tandem and centric fusions in the chromosomal evolution of the South American phyllotines of the genus *Auliscomys* (Rodentia, Cricetidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 61, p. 135-140, 1992.

WANG, W.; LAN, H. Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 17, p. 1326–1333, 2000.

WEBER, A. F.; BUOEN, L. C.; ZHANG, T. Q.; RUTH, G. R. Prevalence of the 14/20 centric fusion chromosomal aberration in US Simmental cattle. **Journal of**

the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, v. 200, p. 1216-1218, 1992.

WEBER, M.; GONZÁLEZ, S. Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. **Ecoscience**, Sainte-Foy, v. 10, n. 4, p. 443-454, 2003.

WHITEHEAD, R. H. A peculiar case of cryptorchism and its bearing upon the problem of the function of the interstitial cells of testes, **The Anatomical Record**, New York, v. 2, n. 5, p. 177-181, 1908.

WISE, D. A.; NAIL, B.; SHULL, J. K. A technique for analysing fish meiotic chromosomes with light and electron microscopies. **Copeia**, Lawrence, v. 2, p. 499-503, 1987.

WISHART, W. D.; HRUDKA, F.; SCHMUTZ, S. M.; FLOOD, P. F. Observations on spermatogenesis, sperm phenotype, and fertility in white-tailed x mule deer hybrids and a yak x cow hybrid. **Canadian Journal of Zoology**. Ottawa, v. 66, p. 1664-1671, 1988.

WODSEDALEK, J. E. Causes of sterility in the mule. **Biological Bulletin**, Taichung, v. 20, p. 1-56, 1916.

ZHANG, T. Q.; BUOEN, L. C.; DAVIES, M.; WEBER, A. F.; RUTH, G. R. Preliminary data comparing embryo transfer efficiency of Simmental half-sister donors: normal vs 14/20 centric fusion carrier. In: XVII World Buiatrics Congress, 3., 1992, Saint Paul (Minnesota). **Anais...** Saint Paul: University of Minnesota, 1992, p. 67-70.