

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**O EFEITO DA MELATONINA ORAL NOS PADRÕES
REPRODUTIVOS DE MACHOS DE VEADO-CATINGUEIRO
(*Mazama gouazoubira*)**

Yuki Tanaka
Médica Veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**O EFEITO DA MELATONINA ORAL NOS PADRÕES
REPRODUTIVOS DE MACHOS DE VEADO-CATINGUEIRO
(*Mazama gouazoubira*)**

Discente: Yuki Tanaka

Orientador: Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte

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

T161e	Tanaka, Yuki O efeito da melatonina oral nos padrões reprodutivos de machos de veado-catingueiro (<i>Mazama gouazoubira</i>) / Yuki Tanaka. -- Jaboticabal, 2020 87 f. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: José Maurício Barbanti Duarte 1. Cervídeos Neotropicais. 2. Sazonalidade Reprodutiva. 3. Sêmen. 4. Reprodução. 5. Endocrinologia. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

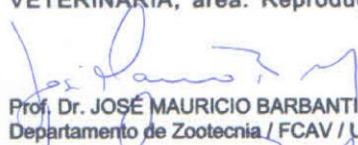
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: O EFEITO DA MELATONINA ORAL NOS PADRÕES REPRODUTIVOS DE MACHOS DE VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouzoubira*)

AUTORA: YUKI TANAKA

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

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


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


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


Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Anatomia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Jaboticabal, 07 de agosto de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Nascida no dia 14 de fevereiro de 1990, no distrito de Shizuoka, Japão. Em 2012 ingressou no curso em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP), graduando-se em 2017. Em 2018, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias na modalidade “Mestrado Acadêmico”. Durante todo o período do mestrado, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Epígrafe

“Live as if you were to die tomorrow.
Learn as if you were to live forever”

Mahatma Gandhi

Dedico e ofereço

A minha mãe, “*Katyan*”, **Quimie Tanaka**, que me ensinou a ser independente, ser forte. Que sempre incentivou a estudar e correr atrás dos sonhos.

A minha tia “*Youkobatyan*”, **Youko Nukui**, que também me incentivou a nunca parar de estudar. Que sempre investiu em nossa formação.

...A minha “baba”, vó, **Rosa Nukui**, que apesar do seu esquecimento cada vez mais frequente, sempre lembra de mim com essa frase carinhosa: “*Yukitchan, quanto tempo né?! Guenki?!*”

Aos animais Fabian, Bento, Beto Carreiro, Lugano, Bill, Pulga e Tofu por terem participado desse trabalho.

Um muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A CNPq pela concessão da bolsa (131540/2018-1), e a Unesp, pela oportunidade de fazer pesquisa de qualidade.

Ao meu orientador, **Professor Dr. José Maurício Barbanti Duarte**, que desde o momento que trocamos o primeiro e-mail, me abraçou e deu a oportunidade de integrar a essa equipe maravilhosa chamada NUPECCE; que desde o rascunho desse trabalho, sempre esteve presente para discutir, para ensinar, e me ajudar a pensar na essência da pesquisa. Que desde as conversas de corredor e de sala, compartilhou suas experiências como “líder” e “ser humano”.

Aos professores da USP, **Professor Dr. José Ricardo Garcia Pereira**, que me deu apoio para iniciar essa jornada acadêmica no NUPECCE e **Professor Marcilio Nichi**, que está sempre disposto em me ajudar no que for preciso

Aos meus amigos de São Paulo, principalmente ao **Guilherme Molnar Castro**, que apesar das nossas divergências, sempre esteve ao meu lado. Sempre que tive medo, que precisei de um conselho, que precisava desabafar, sempre que precisava de alguma ajuda você estava *aqui*

Aos amigos/colegas do NUPECCE, pelos momentos preciosos de café na cozinha, pelos churrascos, que afagam o coração! A **Maria Helena e Gabrielle**, que me acompanharam de perto, e praticamente toda minha trajetória no NUPECCE. Aos que me ajudaram no laboratório: **Claudia e Eveline. Eveline**, que mesmo longe da bancada, fazia o possível para tirar minhas dúvidas sobre endocrinologia

Aos tratadores do NUPECCE, **Antônio Turco e Renato Cruz**, que me distraíam da rotina do laboratório e dos experimentos jogando conversa fora nos corredores

Ao técnico do NUPECCE, **João Boer**, que sempre estava disposto a me ajudar na preparação dos reagentes.

Sou eternamente grata por tudo: pelo NUPECCE ter se tornado minha terceira casa, pelas pessoas que conheci e pelos aprendizados

SUMÁRIO

	Página
Certificado de Comissão de Ética	iii
Mudança de título	iv
LISTAS	v
O EFEITO DA MELATONINA ORAL NOS PADRÕES REPRODUTIVOS DE MACHOS DE VEADO-CATINGUEIRO (<i>Mazama gouazoubira</i>)	viii
RESUMO	viii
Palavras chave	viii
THE ORAL MELATONIN EFFECT ON REPRODUCTIVE PATTERNS OF BROWN BROCKET DEER (<i>Mazama gouazoubira</i>) BUCKS.....	ix
ABSTRACT.....	ix
Keywords:.....	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	10
1. Introdução.....	10
2. Revisão de literatura	13
2.1. Veado-catingueiro (<i>Mazama gouazoubira</i>).....	13
2.2. Melatonina: síntese, secreção, distribuição e metabolização ..	14
2.3. Regulação da secreção de melatonina.....	15
2.4. O papel da melatonina em ciclos sazonais.....	17
2.5. Melatonina e reprodução: o papel da kisspeptina.....	19
2.6. Neurônios Kp como guardiões da reprodução sazonal	21
2.7. Melatonina e reprodução: o papel da pars tuberalis.....	23
2.8. Reprodução dos cervídeos de regiões temperadas.....	26
2.9. Estudos com melatonina em cervídeos de regiões temperadas	29
2.10. Reprodução de cervídeos tropicais e neotropicais.....	30
2.11. Estudos com melatonina em cervídeos em cervídeos de regiões tropicais.....	38
3. REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 2 – “Exogenous melatonin enhances testosterone secretion and sperm quality in brown brocket deer (<i>Mazama gouazoubira</i>) bucks”	57
4. Abstract.....	57
5. Introduction	57
6. Material and Methods.....	60

6.1. Animals and Experimental design	60
6.2. Melatonin treatment	60
6.3. Fecal androgens metabolites measurement, fecal collection and enzyme immunoassay	61
6.4. Gross morphometry	62
6.5. Electroejaculation and semen analysis	62
6.6. Statistical analysis	63
7. Results	63
8. Discussion	67
9. Conclusion	72
10. References	72
11. Supplementary material	77
CAPÍTULO 3 – Considerações finais sobre a dissertação	79

Certificado de Comissão de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “O efeito da melatonina oral exógena na secreção de testosterona em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)”, protocolo nº 01929/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 08 de março de 2018.

Vigência do Projeto	05/03/2018 a 05/08/2020
Espécie / Linhagem	Cervídeos
Nº de animais	06
Peso / Idade	15 a 20 kg / 2 a 9 anos
Sexo	Machos
Origem	NUPECCE

Jaboticabal, 08 de março de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Mudança de título

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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "O efeito da melatonina oral exógena na secreção de testosterona em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)", sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e Certificado CEUA protocolo nº 01929/18, aprovado em reunião ordinária em 08 de março de 2018, teve o título alterado para "**O efeito da melatonina oral nos padrões reprodutivos de machos de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)**" com aprovação da alteração em reunião ordinária de 10 de outubro de 2018.

Jaboticabal, 10 de outubro de 2018.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora - CEUA

LISTAS

Listas de abreviaturas

ADP. Núcleo pré-óptico anterodorsal
ARC. Núcleo arqueado
Cry1. Gene Cryptocromo1
CYP1A2. Citocromo P450
EIA. Enzyme immunoassay
FAM. Fecal androgen metabolites
FSH. Hormônio folículo estimulante
GnRH. Hormônio estimulador de gonadotropinas
HHG. Hipotálamo-hipófise-gonadal
HIOMT. hidroxiendol-O-metil
IUCN. International Union for Conservation of Nature
Kp. Kisspeptina
LC. Least Concern
LHRH. Luteinizing hormone-releasing hormone
M. americana. Mazama americana
M. gouazoubira. Mazama gouazoubira
Mlt1. Melatonin receptor 1
Mlt2. Melatonin receptor 2
N-acetil-5 metoxitriptamina. Melatonina
NAT/AANAT. Serotonina-N-acetiltransferase
NKA. Neuroquinina A
NPVAV. Núcleo periventricular anteroventral
NSQ. Núcleo supraquiasmático
O. virginianus. Odocoileus virginianus
P. puda. Pudu puda
PD. Pars distalis
Per1. Gene Period1
PT. Pars tuberalis, 31
PVN. Paraventricular Nucleus
TH. Tirosina hidroxilase
TRH. Trato retino-hipotalâmico

Lista de Tabelas (Capítulo 1: Revisão de Literatura)	
Tabela 1 Espécies neotropicais, sazonalidade reprodutiva, associação das características reprodutivas com fotoperíodo, latitude, localização geográfica das respectivas espécies.	39
Tabela 2 Espécies tropicais, sazonalidade reprodutiva, associação das características reprodutivas com fotoperíodo, latitude, localização geográfica das respectivas espécies.	40
Lista de Tabelas (Capítulo 2: Artigo)	
Table 1 Animals (A, B, C, D, E, F and G), age and reproductive history and their latitude of origin. Animals A, B, C and D were allocated to treated group and Animals E, F and G to control group.	60
Lista de Figuras (Capítulo 1: Revisão de Literatura)	
Figura 1 Exemplar de fêmea de veado-catingueiro (Mazama gouazoubira)..	13
Figura 2 Caminho multi-sináptico desde o NSQ (Suprachiasmatic Nucleus – SCN) até a glândula pineal. Sinais circadianos provenientes do NSQ são transmitidos para o núcleo paraventricular (Paraventricular Nucleus -PVN). Este se projeta para a medula espinhal, exatamente no núcleo intermediolateral (IML), de onde saem neurônios pré-ganglionares noradrenérgicos, sendo que as fibras desses neurônios alimentam a glândula pineal via gânglio superior cervical (Superior cervical gaglion – SCG).	17
Figura 3 Desenho esquemático de um corte saginal da hipótlamo basal e da hipófise. Notar a relação topográfica das células da pars tuberalis com o plexo capilar primário. As células da pituitária assim como os neurônios hipotalâmicos desembocando na eminência média e pode influenciar as atividades das células da par distalis. Notar a proximidade da PT com o terceiro ventrículo.....	24
Figura 4 Possíveis modelos sobre o efeito da melatonina na secreção de tuberalina. Modelo A no qual a melatonina atua diretamente nos genes relógio, e estes atuam na liberação de tuberalina; Modelo B no qual a melatonina age diretamente nos genes relógio, sendo que estes interagem com proteínas e influencia a tuberalina; e o modelo C, no qual a ação da melatonina nos genes não está relacionada com o controle fotoperíodo da tuberalina, que age de forma independenteError! Bookmark not defined.	
Lista de Figuras (Capítulo 2: Artigo)	
Figure 1 Fecal testosterone concentration in melatonin treated group (■) (n=4) and control group (-▲-) (n=3) in function of experimental days at study prior to melatonin treatment (since day -28 until -7) until post melatonin treatment (day 91). 7 days basis interval are presented as medians (squares and triangles) ± interquartile range (error bars). *Indicates significant difference between groups and days (P<0.05).	64

Figure 2 Individual FAM profile during pre-melatonin treatment (Day – 28) until post-treatment (Day 91). Black square bracket indicates melatonin period treatment (Day 0 to Day 60) in treated group. 65

Figure 3 Graph lines represent the mean values of testicular volume (cm³), sperm motility (%), membrane integrity (%) and major defects (%) from treated (■) and control group (-▲-). Upper letters represent difference along time for treated group. For the mean testicular volume, the treated group showed a similar mean value in Day 30, Day 60 and Day 90, however the mean value of Day 0 differs from Day 30, Day 60 and Day 90 ($p < 0.05$). Although the mean testicular volume is higher on Day 0 than the following days (Day 30, Day 60 and Day 90), it is possible to observe a reduction in testicular volume until Day 90. During Day 30 to Day 60 and after the end of treatment (Day 60 to Day 90) there was a non-significant slight increase in the mean testicular volume. Mean sperm motility from treated group showed higher value in Day 60 than in Day 0, which is considered the period closest to melatonin cessation. Although not statistically significant, membrane integrity (%) and major defects show a possible effect of melatonin treatment ($p > 0.05$) in improving these seminal parameters during the treatment period (Day 0 to Day 60). Horizontal bar with diagonal stripes indicates the period of melatonin treatment.....66

Figure 4 Differences in percentage among days/per individual from Treated (grey lines) and Control group (dark grey lines). The major defects decline during the melatonin treatment which corresponds to 30/0 and 60/30, and these values increase during 90/60, which is the period of melatonin treatment cessation for male A, B and C. For membrane integrity, the values for males A, B, D tend to increase during the melatonin period, and the highest percentage was observed at 60/30, and a reduction at 90/60. The Control group did not show any improvement in the membrane integrity during the same period. For sperm motility, males A, B and C showed an improvement in this parameter at 30/0, whereas the Control group tend to not show any pattern..78

O EFEITO DA MELATONINA ORAL NOS PADRÕES REPRODUTIVOS DE MACHOS DE VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)

RESUMO – O fotoperíodo é o principal regulador da reprodução sazonal em cervídeos de regiões temperadas, responsável por regular a secreção de testosterona, ciclo do chifre, desenvolvimento do pescoço e volume testicular nos machos. No entanto, pouco se sabe sobre seu efeito na reprodução de cervídeos de regiões tropicais. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito indireto do fotoperíodo, através da administração de melatonina oral em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). Parâmetros reprodutivos como, volume testicular, circunferência do pescoço, qualidade do sêmen e testosterona fecal foram avaliados do dia 0 ao dia 90 e o tratamento com melatonina foi realizado desde o dia 0 até o dia 60. No total, sete indivíduos foram utilizados no estudo. Quatro animais foram alocados no grupo tratado (TG) e 3 no grupo controle (GC). A circunferência de pescoço e algumas características seminais não apresentaram diferença entre os grupos e períodos analisados. Houve um aumento dos níveis de MAF no início do tratamento (dias 7, 14, 21 e 35) e após o tratamento (dias 84 e 91) no GT ($p < 0.05$) Houve redução do volume testicular médio ($p < 0.05$) no período entre D 0 e D 30 e entre D 0 e D 90, com um pequeno aumento ($p > 0.05$) entre D 30 e D 60 nos animais tratados. Ainda, a motilidade espermática teve o seu maior valor no D 60, comparado com D 0 ($p < 0.05$), mas nenhuma diferença significativa foi encontrada para outros parâmetros seminais. Apesar de não haver diferença significativa, a integridade de membrana e defeitos maiores tendem a ter valores maiores e menores, respectivamente, no grupo tratado do que no grupo controle ($p > 0.05$). Para esses parâmetros, a porcentagem de incremento por indivíduo mostrou que machos do grupo tratado tendem a ter uma porcentagem maior, o que significa que houve um possível efeito da melatonina durante o período do tratamento. Esses resultados sugerem que *M. gouazoubira* responde a variações drásticas de fotoperíodo e aparentemente a melatonina exógena melhora as características seminais ao invés de controlar a sazonalidade dessa espécie em regiões neotropicais.

Palavras chave: fotoperíodo, endocrinologia, melatonina, sêmen, testosterona

THE ORAL MELATONIN EFFECT ON REPRODUCTIVE PATTERNS OF BROWN BROCKET DEER (*Mazama gouazoubira*) BUCKS

ABSTRACT – This research aimed to assess the indirect effect of photoperiod by giving oral melatonin for brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). Reproductive parameters such as testicular volume, neck circumference, semen quality, fecal androgen metabolites (FAM) were evaluated from Day 0 to Day 90, and melatonin treatment were performed during Day 0 to Day 60. In total, seven individuals were used in the study. Four animals were allocated to treated group (TG) and 3 to control group (CG). The neck circumference and some seminal parameters did not show any significant difference between CT and GT and along the experimental period. High FAM levels were observed for TG in days 7, 14, 21, 35, 84 and 91 ($p < 0.05$). The mean testicular volume reduced in Day 0 to Day 30 ($p < 0.05$) and to Day 0 to Day 90 ($p < 0.05$), with a slight increase in the mean testicular volume during Day 30 to Day 60 ($p > 0.05$). Sperm motility has the highest value on Day 60 compared to Day 0 ($p < 0.05$). Although not statistically different, membrane integrity and major defects tend to be higher and lower, respectively, on the Treated group than in the Control group. For these parameters, incremental change (%) per individual showed that males from Treated group tend to have higher percentage during the melatonin treatment, which means that melatonin might have an effect during melatonin treatment. Those findings suggest that *M. gouazoubira* respond to drastic photoperiod change and melatonin seems to improve the seminal characteristics instead of controlling the seasonal reproduction in *M. gouazoubira* while inhabiting neotropics.

Keywords: endocrinology, melatonin, photoperiod, semen, testosterone

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

A história evolutiva dos cervídeos na América do Norte e nos neotrópicos ainda é um tanto obscura (Duarte et al., 2008). As espécies neotropicais atravessaram o Istmo do Panamá há 2,5 milhões de anos para a América do Sul e cada espécie se adaptou em áreas e habitats com características distintas (Duarte et al., 2008). Diante desse cenário, as espécies também adaptaram suas estratégias reprodutivas durante sua evolução no ambiente tropical (Tabelas 1 e 2). Presumivelmente, as espécies de cervídeos foram consideradas completamente não sazonais, mas Asher (2011) infere que elas podem perceber o fotoperíodo de maneira diferente das espécies de regiões temperadas por causa da presença de sazonalidade refletida na variação sazonal das características sexuais secundárias, que possivelmente é uma característica herdada de seus ancestrais de regiões temperadas (Bubenik et al., 1996). Por outro lado, outros autores acreditam que os cervídeos dessas regiões não utilizam o fotoperíodo para prever a reprodução, pois eles foram naturalmente selecionados para sincronizar seu ciclo endógeno reprodutivo com a disponibilidade de alimentos, que é o único fator que afeta o tempo da reprodução e é frequentemente determinado pelos fatores locais, como clima e época do período de chuvas (Bubenik et al., 1991; Pereira, 2010).

Considerando esse cenário controverso, segundo o qual as espécies de cervídeos tropicais podem responder ao fotoperíodo ou não, fica claro que ainda temos pouco entendimento de quais forças evolutivas afetaram os padrões reprodutivos de espécies de cervídeos de regiões neotropicais, com este grupo de cervídeos representado por muitos táxons que estão em sério risco de extinção (Asher, 2011). De acordo com a IUCN (2016), dentre 29 espécies de cervídeos tropicais/neotropicais/subtropicais, 11 são classificadas como vulneráveis, 1 próximo a ameaça de extinção e 3 como dados insuficientes.

Sob essa perspectiva, o entendimento da biologia reprodutiva dessas espécies é claramente imprescindível, como um meio de aumentar os esforços de sua conservação. No entanto, estudos envolvendo espécies ameaçadas de extinção costumam ser dificultadas devido ao número limitado de espécimes em cativeiro, que é o principal obstáculo para a condução das pesquisas científicas. Nesse contexto, o surgimento da endocrinologia não invasiva permitiu o desenvolvimento de pesquisas em muitos aspectos da reprodução nesse grupo de mamíferos, embora haja ainda poucos dados sobre a biologia reprodutiva de espécies neotropicais (Pereira, 2010). A maioria das informações está concentrada em algumas espécies (*Pudu puda* - (Bartoš et al., 1998; Blanvillain et al., 1997; Bubenik et al., 1996, 2000; Macnamara e Eldridge, 1987), *Mazama gouazoubira* (Barrozo et al., 2001; Bisbal, 1994; Pereira et al., 2006; Pinder, 1992; Stallings, 1986); *Ozotoceros bezoarticus* - (Pereira et al., 2005;

Pinder, 1992; Tomás, 1995), e à vista disso, surge uma necessidade em expandir o entendimento para as outras espécies de 6 gêneros de cervídeos que ocorrem na América Central e no Sul (*Mazama*, *Pudu*, *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* e *Blastocerus*) (Duarte et al., 2008).

Dentre diversas questões sobre a biologia reprodutiva dos cervídeos neotropicais, de fato, a linha de estudo que envolve o ciclo biológico e a reprodução é ainda uma das frentes pouco exploradas. Durante a pesquisa bibliográfica para a elaboração desse trabalho, apenas dois - o primeiro publicado em 1988, na autoria de Loudon e Curlewiss e o segundo publicado em 1992, por Mylrea - buscaram entender o efeito do fotoperíodo na reprodução dos machos das espécies tropicais (cervo-chital – *Axis axis*) por meio do tratamento hormonal com melatonina. As informações geradas a partir desses dois trabalhos mostraram resultados um pouco divergentes a respeito da potencial sazonalidade do cervo-chital. Loudon e Curlewiss (1988) afirmaram que o tratamento com melatonina não tem efeito no aumento do volume testicular, da circunferência do pescoço e na mineralização dos chifres, indicando a insensibilidade dessa espécie ao fotoperíodo. No entanto, os autores observaram que um indivíduo do estudo teve atraso na queda do chifre, e por isso sugerem a possibilidade de um efeito a longo prazo do fotoperíodo nesse parâmetro. Mylrea (1992) afirma também que o tratamento com melatonina afetou o ciclo dos chifres do cervo-chital, fazendo com que os machos tivessem queda sincronizada dos chifres. Mesmo diante desses achados, algumas dúvidas ainda permaneceram sem explicação. Se os estudos tivessem sido conduzidos em regiões nativas da espécie (originária do continente asiático – Nepal, Índia e Bangladesh – latitude 13° a 27°N), será que os animais responderiam da mesma forma? Em regiões nativas, a espécie apresenta sazonalidade reprodutiva limitada (com ausência ou presença do ciclo anual do chifre em algumas regiões do continente asiático, podendo ou não ser relacionado a idade e período de maior atividade sexual em diferentes épocas) e já em regiões translocadas, como os indivíduos estudados por Mylrea e Loudon e Curlewiss (Austrália 37°S ao 15°S e Inglaterra, 52°N, respectivamente), as espécies apresentam ciclo do chifre e testicular que corresponde ao período de 13 meses.

A experimentação que envolve translocações de espécies para regiões onde elas não são nativas, pode revelar a real insensibilidade ao fotoperíodo das espécies. No entanto, muitas apresentam respostas contrárias ao que teoricamente se espera. O cervo-rusa, considerada uma espécie assazonal com ciclicidade durante o ano todo, com presença do ciclo do chifre assíncrono e distribuição de nascimentos observado durante o ano todo em sua região nativa (regiões equatoriais de Java, Timor e Celebes), mostra padrões sazonais quando transferidos para o Sul da Austrália (38°S). A espécie estabelece um ritmo de reprodução baseado em dias longos e pico de fertilidade ocorrendo durante o final do inverno e na primavera (Van Mourik et al., 1986; Van Mourik e Stelmasiak, 1990). Já a espécie neotropical *Mazama americana* nativa de regiões neotropicais, é também considerada assazonal, com ciclicidade presente ao longo do ano nessas regiões, sem a presença do ciclo anual do chifre e distribuição dos nascimentos ao longo do ano (Mayor et al., 2009; Pereira et al., 2020).

Quando a espécie é translocada para regiões temperadas, a espécie continua mantendo a sua assazonalidade reprodutiva, com produção de filhotes ao longo de todo ano (Macnamara e Eldrige, 1987).

Além dos contrastes observados após estudos envolvendo translocações de espécies nativas para outras regiões, muitos autores tentaram entender porquê mesmo espécies de cervídeos tropicais que são simpátricas na mesma região tropical podem apresentar diferentes características reprodutivas, com variações sazonais ou não. Quatro espécies de cervídeos que residem a mesma região do Nepal (Mishra e Wemmer, 1987) apresentam reprodução e forrageamento bem distintos entre si. Por outro lado, espécies neotropicais como veado-mateiro (*Mazama americana*) e veado-catingueiro (*M. gouazoubira*) que são simpátricas da Mata Atlântica, ambas compartilham estratégias reprodutivas semelhantes (dados baseados apenas em indivíduos de cativeiro), apesar de diferirem apenas na preferência de habitats e padrão de atividade (majoritariamente noturna para primeira e diurna para segunda) (Oliveira et al. 2016; Refs do cativeiro).

Inúmeras hipóteses foram levantadas (fatores climáticos, sociais, competição de recursos por espécies simpátricas, pressão exercida por predadores entre outros) na tentativa de explicar os motivos pelos quais algumas espécies tenham retido algumas características sazonais e outros não, mas até hoje, a existência dessa diversidade reprodutiva entre os cervídeos tropicais e neotropicais não foi esclarecida.

Diante de todos os fatos e dessa demanda, esse trabalho tem como objetivos a) solidificar o entendimento sobre reprodução do veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*); b) investigar a potencial sazonalidade dessa espécie por meio de tratamento hormonal com melatonina.

2. Revisão de literatura

2.1. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)

Os cervídeos são representados por 43 três espécies e 206 subespécies distribuídos amplamente pela Europa, Ásia, América do Norte, América do Sul e Norte da África (Whitehead, 1993). No Brasil, ocorrem pelo menos oito espécies da família Cervidae, que são: cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*), veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), veado-mateiro (*Mazama americana*), veado-bororó (*Mazama nana*), veado-roxo (*Mazama rondoni*) e bororó-do-sul (*Mazama bororo*) (Duarte, 1996).

O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) (Figura 1) é o cervídeo mais abundante na região brasileira (Duarte, 1996) e classificado como **Least Concern (LC)** ('pouco preocupante' = não está sujeita ao risco de ameaça imediata a sobrevivência) pela lista vermelha IUCN (Black-Décima e Vogliotti, 2016). No entanto, a classificação de ameaça varia entre as regiões, sendo considerada vulnerável no Rio Grande do Sul e ameaçada no Rio de Janeiro (Bergallo et al., 2000).



Figura 1 Exemplar de fêmea de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*).

Fonte: Foto de J.M.B. Duarte.

Os indivíduos da espécie são considerados de pequeno a médio porte, com peso entre 11-25 quilos e altura de aproximadamente de 0,50 m (Rossi, 2000). A coloração pode variar de cinza escuro até marrom avermelhado (Pinder e Leeuwenberger, 1997). A região ventral é baia, com áreas brancas na parte inferior da cauda e face interna da orelha. As regiões submandibulares e perioftálmicas são mais claras, mas dificilmente chegam a ser brancas, sendo que a maioria dos

indivíduos (dependendo da subespécie) apresentam uma pinta branca acima dos olhos, que é inexistente em outras espécies (Duarte, 1996). A orelha é grande e arredondada e os chifres são simples e não ramificados, sendo que este último é uma característica de todos os machos do gênero *Mazama* (Duarte, 1996).

O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) pode ser encontrado entre as latitudes 5°S and 35°S e em regiões da Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil (exceto na Amazônia). Os indivíduos dessa espécie ocupam áreas de florestas densas contínuas até savanas abertas com poucas e pequenas manchas de mata, mas sempre associados a florestas para abrigo e alimentação (Duarte et al., 2012). A espécie se adapta facilmente a terras cultivadas, desde que pequenas áreas estejam disponíveis para seu abrigo (Pinder e Leeuwenberger, 1997).

Em todas as regiões nas quais ocupa, o *M. gouazoubira* é classificado como reprodutor assazonal, devido a ausência de período crítico sem disponibilidade de alimentos (Pereira et al., 2010). No entanto, a concentração de nascimentos é mais observada em meses nos quais são mais favoráveis para sobrevivência da prole (Branan e Marchinton, 1987). Em vida livre, os picos de nascimentos podem ser observados em diferentes períodos do ano: no Cerrado, os filhotes são mais frequentemente observados em campo durante o final das estações chuvosas (Leeuwenberger et al., 1999); no Pantanal, dois picos de nascimentos são observados, o primeiro antes do início da estação chuvosa e o segundo após o período de cheia (Pinder, 1997). Juliá e Peris (2010) reportaram a presença de ligeiros picos de nascimentos durante o ano no noroeste da Argentina, e os machos foram frequentemente vistos com chifre mineralizado durante alguns meses específicos do ano, assim como para os machos da região brasileira, onde o chifre mineralizado foi visto com maior frequência em alguns meses específicos do ano na região do Mato Grosso (Black-Décima et al., 2010).

Segundo Asher et al. (1999), existe uma clara relação entre padrões anuais de chuva e o momento de nascimento da prole, mas como as espécies sincronizam a estratégia reprodutiva usando um marcador de curto prazo (exemplo, padrão de chuvas) ainda permanece obscuro. A pressão seletiva sofrida por espécies tropicais favoreceu a evolução de padrões reprodutivos projetados para explorar flutuações da disponibilidade local de alimentos ou pela disponibilidade de recursos que o habitats oferecem, em vez de utilizarem a luz como um preditor para reprodução (Monfort et al., 1993).

Apesar de muitos autores acreditarem que cervídeos tropicais e neotropicais não respondem ao fotoperíodo, ainda não se sabe ao certo se o fotoperíodo pode de fato exercer alguma influência sobre a reprodução de espécies neotropicais, como é o caso do veado-catingueiro.

2.2. Melatonina: síntese, secreção, distribuição e metabolização

A melatonina ou N-acetil-5 metoxitriptamina é um hormônio produzido pela glândula pineal (Axerold, 1974) descrita pela primeira vez em glândula pineal de bovinos por Lerner e colaboradores (1958).

Esse hormônio é sintetizado quase que exclusivamente dentro das células da glândula pineal denominadas pinealócitos (Arendt, 2011), onde a melatonina é o produto final de uma sequência de reações que tem origem a partir do triptofano, onde este é convertido em 5-hidroxitriptofano, deste para 5-hidroxitriptamina, este para N-acetilserotonina (convertido pela enzima serotonina-N-acetiltransferase ou NAT/AANAT), que é então, convertida em melatonina (enzima Acetil serotonina metil transferase ou ASMT) (Axelrod, 1974). Sua produção não se restringe a glândula pineal, podendo a enzima AANAT ser encontrada, em menor extensão, em outras regiões do cérebro, pituitária e testículo, trato gastrointestinal (Bubenik, 2001), retina (Tosini e Menaker, 1996), mas também em estruturas celulares como a mitocôndria, o qual tem sido considerado o principal local da produção de melatonina das células do corpo (Tan et al., 2016; Reiter et al., 2020). O processo de síntese da melatonina é regulado pela inervação simpática da glândula pineal, primariamente através do receptor β -adrenérgico mediado pela regulação da atividade da enzima NAT (Klein e Weller, 1970; Klein et al., 1971). Durante o dia, a atividade simpática está reduzida e a produção de melatonina é baixa, e já durante a noite, a atividade simpática, atividade da enzima NAT e a produção de melatonina estão altas (Moore, 1995).

Por ter características lipofílicas, uma vez que esse hormônio é sintetizado, ele não é estocado dentro dos pinealócitos e rapidamente deixa estas células para alcançar a circulação sanguínea (Do Amaral; Cipolla-Neto, 2018; Reiter, 1991), e por esse motivo a quantidade de melatonina encontrada na circulação reflete a taxa de produção desse hormônio pela glândula pineal (Reiter, 1990).

Na circulação sanguínea, a melatonina se liga a albumina, e sua metabolização ocorre no fígado formando a molécula 6-hidroxi melatonina pelo citocromo P450 (CYP1A2) e conjugado para 6-sulfatometoximelatonina, para subsequente excreção pela urina (Do Amaral e Cipolla-Neto, 2018).

A produção e a secreção de melatonina ocorre em maior quantidade durante o período da noite em quase todas as espécies (Arendt, 1995; Reiter, 1993) e na maioria dos vertebrados o ritmo é endógeno, ou seja, é gerado internamente (Arendt, 2011). Esse ritmo persiste na ausência de marcadores ambientais, e em geral, assumindo um período que diverge levemente de 24 horas, sendo, portanto, um verdadeiro ritmo circadiano (Czeisler et al., 1999; Middleton et al., 1996).

2.3. Regulação da secreção de melatonina

A regulação da secreção da melatonina é realizada pelo núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo, que é um sistema que gera um ritmo endógeno (Brown et al., 1994). Fatores como a luz, que tem um efeito supressor

agudo sob a atividade da glândula pineal, tem um efeito regulatório sobre o sistema: a luz é recebida no NSQ via trato retino-hipotalâmico (TRH), que por sua vez, mantém a atividade do NSQ sincronizado com o fotoperíodo (Brown et al., 1994).

De forma mais detalhada, o mecanismo regulatório da secreção de melatonina funciona da seguinte maneira: a retina possui fotorreceptores (cones, bastonetes e células ganglionares fotossensíveis) responsáveis por captar a informação da luz (Legan e Karsch, 1983). Esta última classe, diferentemente dos cones e bastonetes não resulta em formação de imagens, e é responsável por regular as funções cognitivas em humanos (Cajochen et al., 2005) e pela produção de um pigmento denominado melanopsina (Contreiras et al., 2019). As células ganglionares fotossensíveis são a porta de entrada para diversos níveis de luz transmitidos para o sistema nervoso central (Ritter et al., 2019), e a melanopsina é extremamente sensível a luz azul e a absorção da melanopsina é estimado nesse espectro, com um pico em ~480nm (Ritter et al., 2019). Além disso, esse pigmento tem um papel importante no ritmo circadiano e tem sido associado com aumento da vigília através da dependência da melanopsina na supressão da melatonina (Contreras et al., 2019). A partir do momento no qual a luz é captada por todos os fotorreceptores mencionados anteriormente, ela é integrada através de um caminho complexo envolvendo passos tanto neurais como humorais (Malpoux et al., 1996). A luz é transmitida através do TRH que se origina das células ganglionares da retina, para NSQ, onde os terminais do TRH se projetam predominantemente (Moore, 1995). O NSQ, por sua vez, envia os sinais que regulam a síntese e a secreção da melatonina pela glândula pineal (Goldman, 2001). A comunicação do NSQ com a pineal é feita por um caminho multi-sináptico (Figura 2) (Kalsbeek et al., 2006). Os sinais circadianos provenientes do NSQ são transmitidos sequencialmente para o núcleo paraventricular, onde os neurônios do NSQ se projetam ventralmente para o núcleo paraventricular. Este se projeta para a medula espinhal, exatamente no núcleo intermediolateral da medula espinhal, onde residem neurônios pré-ganglionares noradrenérgicos, as quais as fibras desses neurônios chegam a glândula pineal, via gânglio superior cervical (Borjigin et al., 1999), que recebe sinais inibitórios que resultam em baixa produção de melatonina durante o dia (Moore, 1995).

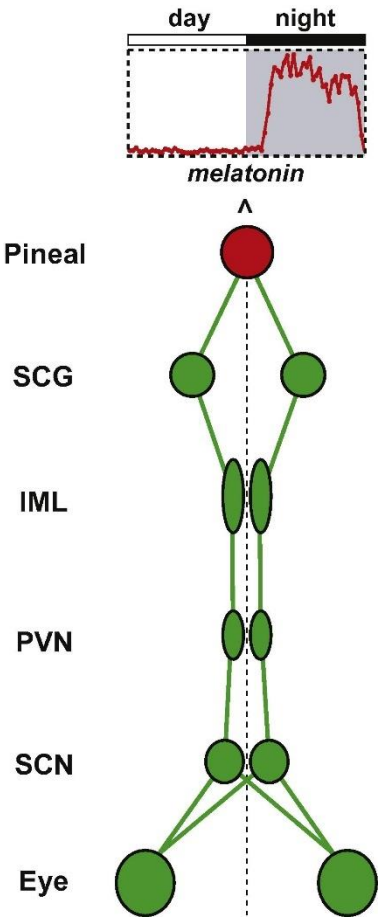


Figura 2 Caminho multi-sináptico desde o NSQ (Suprachiasmatic Nucleus – SCN) até a glândula pineal. Sinais circadianos provenientes do NSQ são transmitidos para o núcleo paraventricular (Paraventricular Nucleus -PVN). Este se projeta para a medula espinhal, exatamente no núcleo intermediolateral (IML), de onde saem neurônios pré-ganglionares noradrenérgicos, sendo que as fibras desses neurônios alimentam a glândula pineal via gânglio superior cervical (Superior cervical ganglion – SCG).

Fonte: Borjigin et al. (2012).

2.4.O papel da melatonina em ciclos sazonais

Os sinais inibitórios que são recebidos para a glândula pineal deixam de ser transmitidos a partir do momento no qual a luz deixa de ser captada, ou seja, quando se inicia o período do escuro. Apesar do fato de que a melatonina é liberada durante o período do escuro entre os mamíferos (Reiter, 1991), o padrão do aumento da secreção da melatonina varia entre as espécies. Segundo Reiter, (1993), existem 3 padrões de secreção da melatonina. No padrão A, a melatonina é produzida com um atraso de algumas horas após o início do escuro, característica presente em hamster sírio; já o padrão B, o aumento gradual da produção de indolaminas (classe de compostos produzidos pela pineal - Underwood e Goldman, 1987), começando logo no início do escuro e o pico dos níveis de melatonina alcança nível máximo no meio da fase do escuro, seguido por uma redução gradual na produção de indol durante a segunda metade da noite, típico padrão dos ratos domésticos (*Ratus noervegicus*) e humanos; e os animais que possuem o padrão C, como os ovinos, a secreção de

melatonina é alta durante a noite inteira, assim dentro de 30min após o início do escuro, a melatonina atinge seu pico.

Muitos mamíferos utilizam as mudanças sazonais do comprimento da noite como sinal para desencadear mudanças sazonais em seus comportamentos e fisiologia, com aqueles relacionados a reprodução, migração e hibernação (Wehr, 1997). A melatonina serve como um transdutor dos efeitos sazonais do comprimento da noite na biologia e comportamento (Wehr, 1997).

A duração do pico de secreção de melatonina é um parâmetro crítico para transmissão da informação do fotoperíodo e é responsável por sinalizar o comprimento do dia para organização dos ritmos sazonais (Arendt, 1998; Cardinali e Pévet, 1998). Alterações na duração da secreção de melatonina, que são induzidas pelas variações no comprimento da noite, transmitem informações sobre a troca das estações para as células que regulam as mudanças sazonais do comportamento (Bartness e Goldman, 1989).

Essa hipótese foi comprovada através de experimentos conduzidos em animais pinealectomizados, administrando melatonina para induzir efeitos diários de concentrações de melatonina referentes ao “dia longo” e “dia curto” (Cardinali e Pévet, 1998). Os primeiros experimentos foram realizados com hamsters e ovinos através de infusões temporizadas de melatonina de forma sistêmica ou central nesses animais pinealectomizados (Bartness et al., 1993). A melatonina é injetada, normalmente em horários específico do dia, uma vez por dia e por um número específico de horas, com a finalidade de testar diretamente o “modo” como o sinal da melatonina é necessário para desencadear as respostas fisiológicas ao fotoperíodo.

Em uma série de experimentos, Carter e Goldman (1983a, 1983b) tentaram identificar quais características do perfil de secreção de melatonina são as mais importantes para mediar as mudanças induzidas pelo fotoperíodo no status reprodutivo em hamsters siberianos juvenis. Como nessa faixa de idade os animais respondem tanto ao estímulo do fotoperíodo como também ao tratamento com melatonina, os hamsters mais jovens são preferíveis para esses estudos (Bartness e Goldman, 1989).

A princípio, padronizar parâmetros de infusão da melatonina é um passo importante para conduzir experimentos desse nível, como fase, duração e amplitude para que as características individuais do ritmo natural da ocorrência de melatonina possam ser estudados na determinação do controle do fotoperíodo sob o sistema reprodutivo que ainda está em fase de desenvolvimento (Bartness e Goldman, 1989).

Diferentes tempos de infusão em hamsters pinealectomizados com infusão temporária de melatonina a 10ng/dia por um período de 12 dias, mostraram que 12 horas de duração inibiu o desenvolvimento testicular, 4 ou 6 horas de infusão não causou nenhum efeito inibitório, sugerindo a ação inibitória da melatonina sobre o sistema reprodutivo.

Para verificar se havia o efeito estimulatório da melatonina em hamsters, Cart e Goldman testaram a infusão de melatonina de 0.83ng/hora com diferentes tempos de infusão: aqueles que receberam infusão diária de 12h ou 8h, não havia nenhum

efeito estimulatório; hamsters que receberam 4 ou 6h de melatonina tinham testículos mais desenvolvidos. Outro grupo experimental recebeu 4h de infusão de melatonina em uma dose 100 vezes maior (83ng/hora) exibiram crescimento testicular, sugerindo que o efeito estimulatório da melatonina se relaciona com a duração dos altos níveis de melatonina (Bartness et al., 1993).

Apesar dessas evidências demonstradas em hamsters, que são considerados animais de dias longos, foi demonstrada também que em ovinos, considerados animais de dias curtos, a retirada da pineal causa efeitos na sua reprodução, porém os efeitos são mais “leves” (Bittman et al., 1983).

A remoção ou denervação da glândula pineal bloqueia as respostas reprodutivas ao fotoperíodo, afetando dessa forma o tempo ideal para a época reprodutiva, mas não previnem a ocorrência de mudanças cíclicas na reprodução, sendo esse fenômeno descrito não só em ovinos, mas também em cervídeos e equinos (Grubbaugh et al., 1982; Lincoln, 1989; Snyder et al., 1983).

Experimentos conduzidos com a retirada da pineal ou denervação mostraram a existência de um ritmo endógeno anual mesmo após eliminação do circuito que regula o fotoperíodo nos animais (Bittman et al., 1983; Grubbaugh et al., 1982; Lincoln, 1989; Snyder et al., 1983).

Além desse ritmo endógeno, foi demonstrado que quando esses animais passam por esses procedimentos, outros sinais do ambiente podem produzir ciclos bem definidos com as estações. Em ovinos, por exemplo, mudanças sazonais na nutrição parece ser particularmente importantes em ditar a sazonalidade de animais pinealectomizados, sugerindo que em ovinos normais o efeito da nutrição e fotoperíodo interagem entre si para ditar o período correto da reprodução (Lincoln, 1989). Nesse mesmo estudo, foi verificado que a atividade sexual foi observada dois meses antes que o grupo controle, e se a dieta fosse restrita, havia um declínio na sua atividade testicular em resposta ao tipo de alimentação fornecida.

Outro ponto importante é que fatores sociais também podem afetar a capacidade reprodutiva desses animais, sendo que a secreção de testosterona aumenta em indivíduos, em resposta a fêmeas em estro, sugerindo a partir de todas essas evidências de que mesmo sem a melatonina, eles são capazes de responder a outros marcadores ambientais como nutrição, temperatura e fatores sociais (Lincoln, 1989).

Em cervídeos, tanto em animais pinealectomizados como em animais controle, o crescimento na circunferência testicular foi similar, mas o padrão normal foi atrasado de 1 a 3 meses nos animais pinealectomizados; o ciclo do chifre e as mudanças na pelagem foram alterados em animais pinealectomizados, concluindo que a glândula pineal tem um papel fundamental na sincronização dos ciclos reprodutivos entre os indivíduos (Snyder et al., 1983).

2.5. Melatonina e reprodução: o papel da kisspeptina

Como visto no tópico anterior, a melatonina tem um papel fundamental em gerar ciclos sazonais na reprodução e outros processos fisiológicos (Lincoln, 2002). Em relação a reprodução, acredita-se que a melatonina tenha um papel importante na estimulação indireta de hormônios relacionados a reprodução como o hormônio estimulador de gonadotropinas (GnRH), através do envolvimento de um neuropeptídeo denominado kisspeptina (Kp) e seu receptor (KiSS1R ou GPR54) no controle da atividade reprodutiva (Revel et al., 2009).

A kisspeptina faz parte de um conjunto de neurônios do núcleo ARC denominado neurônios KNDy (Kisspeptina, neuroquinina B e dinorfina) que fornecem estímulos tanto inibitórios como estimulatórios (Bedenbaugh et al., 2020). No núcleo ARC, neurônios Kp podem expressar neuroquinina B e dinorfina, que atuam como inibidores da liberação de LH respectivamente nos neurônios Kp, podendo controlar a pulsabilidade do GnRH (Simonneaux, 2020; Nestor et al., 2018).

Dentre todos esses neuropeptídeos, a kisspeptina é o mais estudado até então. A Kp tem um importante papel na maturação e na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), sendo que há algum tempo, os neurônios Kp foram identificados como um sistema neuroendócrino chave e essencial para os neurônios GnRH (Desroziers et al., 2010) em diversos vertebrados (Ogawa e Parhar, 2013).

Os neurônios Kp se projetam em algumas áreas do cérebro, especificamente na região pré-óptica para os neurônios GnRH (Desroziers et al., 2010), mas também pode se encontrar a presença do RNAm do gene *Kiss1* em regiões discretas do prosencéfalo, incluindo regiões hipotalâmicas como o núcleo arqueado (ARC), o núcleo periventricular anteroventral (NPVAV) e o núcleo pré-óptico anterodorsal (ADP), amígdala, e em vários tecidos periféricos, principalmente placenta, ovário, testículo, pâncreas e fígado (Kauffman et al., 2007).

A Kp é influenciada por diversos hormônios esteroides, que atuam na mudança da expressão da *Kiss1* no hipotálamo (Colledge, 2009), sendo que os neurônios Kp são os principais alvos para os efeitos de feedback central negativo (no ARC) e positivo (NPVAV) dos hormônios esteroides que estão envolvidos no controle dos loops do eixo reprodutivo (Simonneaux et al., 2012). Os neurônios Kp são importantes na mediação indireta das ações dos hormônios esteroides sexuais nos neurônios GnRH, uma vez que estes últimos não possuem receptores de hormônios sexuais (de Tassigny e Colledge, 2010). A maioria dos neurônios Kp expressa o receptor alfa de estrógeno (ER α de 90%), o receptor de andrógeno (~65%) e o receptor de progesterona (~86%) (110), dados consistentes com seu papel como mediadores do feedback de esteróides sexuais no eixo reprodutivo da expressão do *Kiss1* no núcleo arqueado (ARC) (de Tassigny e Colledge, 2010). Esse mecanismo de feedback negativo e positivo foi descrito em roedores e ovinos e possui uma importância fisiológica. Hormônios esteroides sexuais suprimem a expressão do gene *Kiss1* no núcleo ARC e aumenta a expressão do *Kiss1* na região NPVAV, sendo que essa modulação é fisiologicamente importante para o pico de LH, que é indiretamente

sinalizado pela Kp da região NPVAV no feedback positivo de estrógeno (Smith et al., 2007).

O mecanismo pelo qual os esteroides sexuais regulam a expressão da Kp nas regiões NPVAV e no núcleo ARC falta esclarecimentos. Acredita-se que tanto a indução como a inibição da expressão do *Kiss1* necessitam do receptor de estradiol ER α , que medeia o efeito primário do estradiol na secreção de GnRH (Gottsch et al., 2009). Assim, o receptor estradiol ER α exerce sua função através de várias vias de sinalização, que pode envolver a translocação do receptor para o núcleo, onde recruta cofatores para o local regulador de elementos de resposta ao estrógeno (ERE) com a finalidade de alterar a transcrição do gene (via clássica) como também pode atuar independentemente da via clássica, interagindo com outros fatores transcricionais (via não clássica) (Gottsch et al., 2009). Isso foi demonstrado através da avaliação do efeito do estradiol na expressão do *Kiss1* em camundongos mutantes com moléculas de ER α que não se ligavam com as seqüências de ERE (Gottsch et al., 2009), sendo que a estimulação da expressão de *Kiss1* na região NPVAV, dependia da via clássica, e já a inibição da expressão de *Kiss1* necessita da via não clássica (Gottsch et al., 2009). Além disso, o fator de crescimento semelhante a insulina tipo-1 (IGF-1) aumenta a expressão de *Kiss1* apenas na região NPVAV e não causa nenhum efeito no núcleo ARC de fêmeas de ratos pré-púberes na presença de estradiol (Hiney et al., 2009; Hiney et al., 2010). Essas alterações na expressão do gene *Kiss1* são consistentes com os neurônios no núcleo ARC regulando o feedback negativo dos esteroides na liberação do GnRH e naqueles presentes na região NPVAV, responsáveis pelo pico pré-ovulatório do LH (de Tassigny and Colledge, 2010; Herbison, 2008).

2.6. Neurônios Kp como guardiões da reprodução sazonal

Os neurônios Kp são considerados integradores de internos para a regulação da reprodução (Desroziers et al., 2010), como o balanço energético negativo (relacionado com a reserva energética, através da leptina), estresse, ambientes não favoráveis (Simonneaux et al., 2009) e também na integração de informações relacionadas ao tempo, como o dia e o ano para ajustar a reprodução em resposta as variações sazonais do ano (Clarke et al., 2009; Simonneaux et al., 2009).

Se as células Kp são determinantes na secreção de GnRH/LH nas diferentes estações, espera-se que haja mudanças na expressão do gene *Kiss1* de acordo com as mudanças estacionais (Clarke et al., 2009). Para verificar se o fotoperíodo é o principal fator que altera os níveis de Kp, ovinos foram submetidos ao tratamento de luz por 4 semanas, e observou-se que a condição artificial de dias curtos resultou em uma maior expressão do *Kiss1* do que nos dias longos (Chalivoix et al., 2010; Wagner et al., 2008), assim como foi relatado para roedores com reprodução sazonal (Chalivoix et al., 2010; Revel et al., 2007; Simonneaux et al., 2009). O mesmo

tratamento diminui a expressão de *Kiss1* na região NPVAV de hamster siberianos (Smith et al., 2006), sendo que quando estes têm a glândula pineal retirada e são mantidos em dias curtos, apresentam elevada expressão no ARC, que pode ser revertida por injeções de melatonina (Simonneaux et al., 2009).

Essa expressão aumentada do gene *Kiss1* no núcleo arqueado é observado durante o período de atividade sexual dos ovinos, se comparado com o período de ausência de atividade sexual (Wagner et al., 2008). Essa condição é observada também na ausência de feedback promovida por hormônios esteroides de animais que foram submetidas a ovariectomia (Smith et al., 2007) e aqueles que receberam reposição de estrógeno (Smith et al., 2008), indicando que a mudança sazonal a sensibilidade ao estrógeno é afetada pela mudança das respostas da Kp frente ao estrógeno (Smith, 2012).

Isso fornece grandes indícios de que o padrão de secreção da melatonina possa governar a expressão do gene *Kiss1*, mas esse controle pode ser indireto, uma vez que os neurônios Kp não expressam receptores de melatonina (Li et al., 2011). Especula-se que esse controle indireto possa ser realizado por um sistema interneuronal que retransmitem para os neurônios Kp, como o sistema de neurônios dopaminérgicos A14/A15, que são estimulados pelo estrógeno e inibe a secreção de GnRH durante o período de atividade não sexual dos ovinos (Smith, 2012).

Muitos estudos apoiam a ideia de que os neurônios KNDy do núcleo ARC são essenciais para a sazonalidade reprodutiva, já que o número de peptídeos e as células contendo o seu RNAm diminui durante o anestro, devido possivelmente a inibição potencializada pelo estradiol (Smith et al., 2008; Weems et al., 2016). Adicionalmente, neurônios KNDy, utilizando a dinorfina como marcador, co-expressam os receptores de dopamina D2R, um subtipo responsável pela inibição dos pulsos de GnRH. Em outras palavras, a co-localização de D2R e a entrada dopaminérgica na população de KNDy suportam a hipótese de que as ações de feedback negativo de estradiol durante o anestro são transmitidos via neurônios dopaminérgicos A15 que suprimem a liberação de kisspeptina dos neurônios ARC, e assim inibem a frequência de pulso de GnRH (Weems et al., 2017). Além disso, essa co-expressão muda de acordo com a estação, sendo que 80% das células KNDy possuem a co-localização do receptor D2R durante o anestro, enquanto que há 40% durante a estação reprodutiva (Weems et al., 2016). Assim, infere-se que os neurônios dopaminérgicos A15 que se projetam para o núcleo ARC atuam inibindo a atividade dos neurônios Kp, culminando na inibição da secreção de GnRH durante o anestro (Goodman e Lehman., 2012; Weems et al., 2016).

A melatonina, além de regular a secreção pulsátil de LH, também é responsável por regular a secreção de prolactina, estimulando neurônios dopaminérgicos para inibição desse hormônio, que possui padrão circunual primariamente determinado pelo fotoperíodo (Hazlerigg et al., 1996; Munro et al., 1980) e que medeia possivelmente, o início da atividade reprodutiva (Munro et al., 1980). Em ovinos e bovinos, a prolactina possui variação sazonal, sendo que os menores níveis de prolactina são encontrados no outono/inverno, enquanto que altos níveis são

observados durante a primavera/verão (Munro et al., 1980). O efeito da prolactina se deve direta e indiretamente na alteração da esteroidogênese e na secreção de LH (Munro et al., 1980; Niswender et al., 2000).

Em ovinos, dois fatores regulam a secreção pulsátil de LHRH e de prolactina: fotoperíodo (através da melatonina) e o feedback de esteroides, como o estradiol (Beccavin et al., 1998). Estudos sugerem que a via dopaminérgica da eminência mediana constitui um passo essencial da regulação fotoperiódica da secreção de LH que medeia o efeito da melatonina nos neurônios LHRH (Viguié et al., 1997). Além disso, a enzima tirosina hidroxilase (TH) produzida pelos neurônios dopaminérgicos, que controla a taxa de biossíntese das catecolaminas, é afetada pelo fotoperíodo e também pelo estradiol, apesar de apenas um grupo específico do grupo de neurônios (A12) possuir receptores de estradiol (Beccavin et al., 1998). No grupo A15, o estradiol atua na estimulação da enzima TH, mas sem possuir receptores de estradiol (Beccavin et al., 1998).

Acredita-se que o estradiol e o fotoperíodo atuam na modulação da concentração de RNAm nos dois grupos dopaminérgicos A12 e A15, sendo que no primeiro o estradiol estimula RNAm de TH, e no último, as concentrações de RNAm de TH diminui durante a exposição a dias longos, quando a atividade enzimática é estimulada pelo estradiol, que atua via não genômica (Beccavin et al., 1998). O fotoperíodo, em outras palavras, atua via melatonina ativando os neurônios dopaminérgicos A15, que inervam os neuronios KNDy. O estrógeno, secretado durante a fase não reprodutiva aumenta a liberação de dopamina para inibir os neurônios KNDy, suprimindo a frequência de Kp e GnRH (Nestor et al., 2018).

2.7. Melatonina e reprodução: o papel da pars tuberalis

A pars tuberalis (PT) é a parte rostral da adenohipófise e está nas proximidades da camada externa da eminência mediana, vasculatura portal (plexo primário) e a pars distalis hipofisária (Yasuo et al., 2009; Yasuo and Korf, 2011), com conexão parcial com o terceiro ventrículo e eminência mediana (Figura 3) (Fitzgerald, 1979; Guerra et al., 2010).

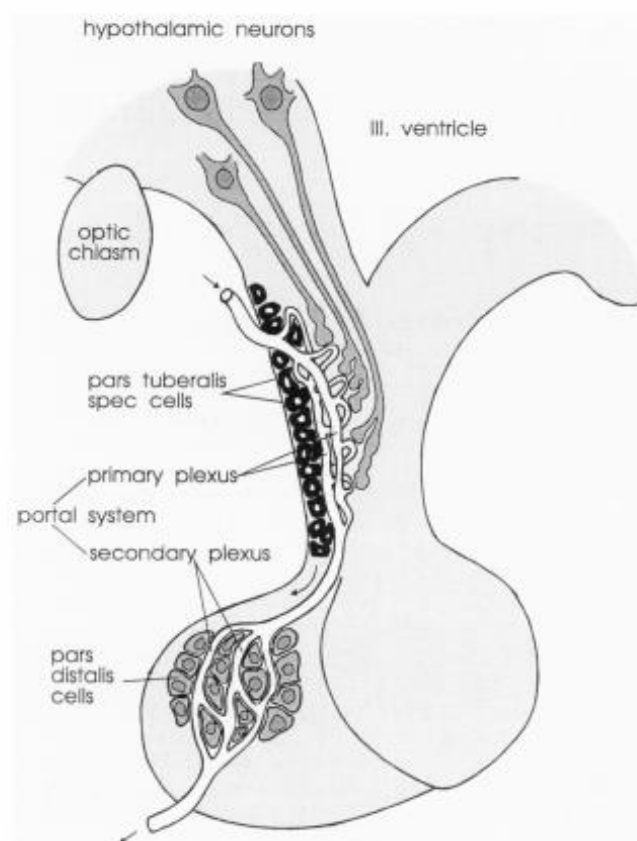


Figura 3 Desenho esquemático de um corte saginal da hipófise e hipotálamo basal. Notar a relação topográfica das células da pars tuberalis com o plexo capilar primário. As células da pituitária assim como os neurônios hipotálamicos desembocando na eminência média e pode influenciar as atividades das células da pars distalis. Notar a proximidade da PT com o terceiro ventrículo.

Fonte: Wittkowski et al. (1992)

A relação dessas estruturas faz com que a PT seja considerada como um importante centro regulatório das funções endócrinas e neuroendócrinas, exercendo um papel nas variações sazonais dessas funções do organismo (Yasuo and Korf, 2011). A sua localização ideal entre a hipófise e o hipotálamo tem como objetivo influenciar o eixo hipotálamo-hipofisário, e parece que essa posição anatômica sinaliza de maneira retrógrada e anterógrada na condução do metabolismo energético, reprodução e a troca da pelagem (Wood e Loudon, 2018).

Em mamíferos, como citado anteriormente, a produção rítmica de melatonina pela glândula pineal é regulada pelo fotoperíodo, e esse hormônio é uma representação endócrina desse fator ambiental, que possui diferentes tempos de duração entre as estações do ano, sendo este menor durante o verão, e maior durante o inverno (Wood e Loudon, 2018). Acredita-se que a PT tem um papel chave nesse processo sazonal da fisiologia reprodutiva, presente nos animais com reprodução sazonal, típico de regiões temperadas (Dupré et al., 2008).

A importância da PT na regulação da fisiologia sazonal é dada pelo fato de que essa estrutura contém alta densidade de receptores de melatonina [MT1 - (MNTR1A) and MT2 – (MNTR1b)] que participam da regulação sazonal da reprodução, decodificando as mudanças da secreção noturna de melatonina (Dupré et al., 2008; Wood e Loudon, 2018). O principal receptor presente nessa região é o receptor MT1, que é essencial para a resposta fotoperiódica das gônadas (Weaver et al., 1996) e

associado com a regulação dos genes relógio, que estão relacionados com a ritmicidade (Yasuo e Korf, 2011). O mecanismo molecular desse sistema relógio na PT é fortemente dependente de melatonina através do receptor MT1 (Unfried et al., 2009). A expressão desses genes relógio, também encontrados no núcleo supraquiasmático (Dardente et al., 2003; Dupré et al., 2008; Yasuo e Korf, 2011), varia de acordo com a diminuição da secreção de melatonina (Gene *Period1* - Per1) e o início da secreção desse hormônio (Gene *Cryptocromo1* - Cry1) (Dupré et al., 2008) em um sistema de feedback entre esses genes (Reppert e Weaver, 2002). Especificamente, a expressão de Per1 ocorre na primeira metade da fase de luz, enquanto que a expressão de Cry1 ocorre durante o início da fase de escuro (Lincoln et al., 2003), coordenadas pela variação do fotoperíodo. Esses padrões de expressão gênica foram associados com as concentrações sanguíneas de melatonina durante o dia, com a ativação do Per1 associada com a parada da secreção desse hormônio e a ativação de Cry1 com o início de secreção da melatonina, sugerindo que este último tem um efeito positivo na ativação de genes responsivos ao fotoperíodo (genes criptocromos) (Lincoln et al., 2003). Além disso, o tratamento exógeno com melatonina também afeta o perfil de expressão desses genes relógio, reforçando a ideia de que a melatonina tem um efeito importante na regulação desses genes. O tratamento agudo inibe a expressão de Per1 nas células da PT em ovinos, enquanto que o tratamento prolongado e sua subsequente retirada estimula em grandes proporções a expressão de Per1 (Hazlerigg et al., 2004; Lincoln et al., 2002). Mais importante do que isso, a melatonina demonstra ter uma ação direta para induzir a resposta ao fotoperíodo na hipófise (Lincoln e Clarke, 1994).

Acredita-se que essa expressão dos genes também tenha uma associação com a prolactina (Morgan et al., 2000; Hazlerigg et al., 2004), que como citado em tópicos anteriores, é fotoperíodo dependente. A indução da secreção de prolactina ocorre aparentemente após as alterações dos genes relógio causadas pela melatonina endógena (Hazlerigg et al., 2004), resultado de um estímulo indireto desse último hormônio que inibe sua secreção (Lincoln e Clarke, 1994). Segundo Morgan et al. (2000), é possível que o fotoperíodo atue na secreção de prolactina através de um fator liberador denominado tuberalina, um componente produzido pelas células da PT que posteriormente influencia os lactotrofos, que são células da par distalis (PD) da hipófise que secretam a prolactina (Morgan et al., 1996). Segundo Morgan et al. (2000), não se sabe ao certo qual a relação dos genes relógio com a liberação da tuberalina, e mesmo após um certo tempo, essa relação ainda permaneceu no campo hipotético. Dardente (2007) propôs três possíveis modelos para a secreção melatonina-dependente da secreção de tuberalina (Figura 4). O modelo A, no qual a melatonina atua diretamente nos genes Per1/Cry1, e estes por sua vez atuariam na liberação de tuberalina; o modelo B, no qual, a melatonina afeta os genes relógio, porém de maneira “independente dos genes relógio”; a sua interação com proteínas e os genes relógio Per1/Cry1 faz com que influencie a secreção de tuberalina; e o modelo C, no qual a ação da melatonina nos genes Per1/Cry1 não está relacionada com o controle fotoperiódico da tuberalina, que age de forma independente.

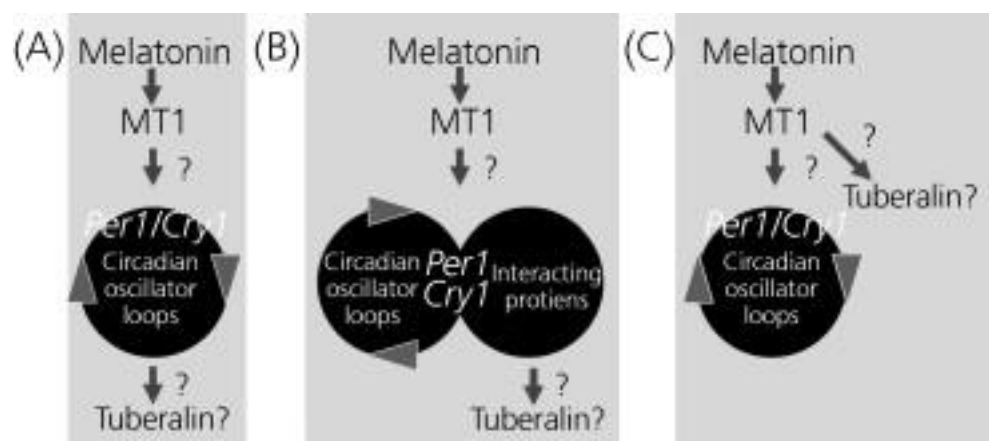


Figura 4 Possíveis modelos sobre o efeito da melatonina na secreção de tuberalina. Modelo A no qual a melatonina atua diretamente nos genes relógio, e estes atuam na liberação de tuberalina; Modelo B no qual a melatonina age diretamente nos genes relógio, sendo que estes interagem com proteínas e influencia a tuberalina; e o modelo C, no qual a ação da melatonina nos genes não está relacionada com o controle fotoperíodo da tuberalina, que age de forma independente

Fonte: Dardente (2007).

De qualquer maneira, ainda há de ser definido como esses genes relógio/melatonina atuam na secreção de tuberalina. Hazlerigg et al. (1993) propôs a existência de uma molécula apelidada de “Stim X”, que atua na expressão sazonal de tuberalina, já que é considerada melatonina dependente e que por sua vez, inibe a produção de AMP cíclico. Alguns anos depois, Dupre et al. (2010) sugeriram que existem diversas moléculas que são potenciais candidatos na secreção de tuberalina como os peptídeos liberados pelo gene TAC1, que se expressa de maneira dependente do fotoperíodo e por consequência, os produtos desse gene (Substância P e neuroquinina A (NKA) podem atuar regulando a secreção sazonal de tuberalina, e que refletirá, por sua vez, na produção de prolactina pelos lactotrofos da PD (Dupre et al., 2010).

2.8.Reprodução dos cervídeos de regiões temperadas

A maioria dos estudos sobre reprodução de cervídeos é baseada em espécies de cervídeos de zonas temperadas, que evoluíram para responder a mudanças externas (por exemplo, flutuações fotoperiódicas) e este, por sua vez, modular a atividade neuroendócrina para determinar o momento da época reprodutiva (Bronson, 1988), que ocorre durante os dias curtos (Asher, 2011; Koziol et al., 2020; Lincoln e Short, 1980). Em cervídeos de regiões temperadas, a sazonalidade é caracterizada por mudanças sazonais em suas características reprodutivas (fertilidade observada durante o ciclo do chifre mineralizado, desenvolvimento do volume testicular sazonal, atividade espermatogênica sazonal) sincronizada com as estações e entre os indivíduos (Asher et al., 1987). Diferentemente das espécies de regiões temperadas,

os cervídeos de regiões tropicais e subtropicais parecem ser sazonais na maioria dos habitats nativos, mas ao mesmo tempo podem exibir uma sincronização relativa ou inexistente do ciclo dos chifres (Asdell, 1946; Loudon e Curlewis, 1988).

A sazonalidade reprodutiva é um fenômeno muito estudado em ruminantes (Loudon, 1994), sendo os ovinos o maior objeto das pesquisas realizadas nesse campo (Arendt et al., 1983; Karsch et al., 1984; Kennaway et al., 1982; Lincoln, 1991; Lincoln e Ebling, 1985). O passo seguinte foi o desenvolvimento desses estudos foi a introdução de espécies selvagens como modelo experimental, como camundongo-de-patas-brancas, esquilos e rato-de-algodão (Lynch et al., 1978; Reiter et al., 1983; Thiele et al., 1983), que são amplamente superiores em muitos aspectos em relação aos roedores de laboratório (Bubenik et al., 1986), devido ao potencial de se tornarem reprodutores não sazonais. Posteriormente, ruminantes selvagens foram introduzidos para os estudos envolvendo fotoperiodicidade como o cervo-vermelho (*Cervus elaphus*) (Abbott et al., 1984) e veado-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) (Bubenik et al., 1986).

Os cervídeos são modelos de espécies selvagens que foram estudados posteriormente, pois assim como os ovinos, respondem às variações do fotoperíodo. Os cervídeos possuem uma diversidade muito grande em relação a sua morfologia, fisiologia, ecologia (Asher, 2011). As estratégias reprodutivas adotadas por essas espécies também são diversas, podendo ser altamente sazonais, como é o caso dos cervídeos de zonas temperadas/boreais, como também completamente assazonais, como os cervídeos de zonas tropicais. Ambos têm a capacidade de modular a sua capacidade reprodutiva dirigida por fatores sociais e/ou ambientais, sendo que os cervídeos de regiões boreais/temperadas tem a capacidade de se tornarem potenciais reprodutores não sazonais se as circunstâncias são favoráveis, como a disponibilidade de fêmeas no estro ao longo do ano (Bubenik et al., 1985) e os cervídeos tropicais se tornarem reprodutores sazonais, se houver mudança na disponibilidade de alimentos, caracterizando-os como reprodutores sazonais oportunísticos (Mayor et al., 2011).

O fotoperíodo é o principal marcador ambiental que regula a reprodução dos animais de dias curtos, sendo a variação circanual do fotoperíodo o principal fator que coordena a reprodução dos mamíferos (Reiter, 1980). Dessa maneira, a luz é utilizada como um sinal vindo do meio externo para que o organismo saiba quando ativar ou desativar o sistema reprodutivo e muitos mamíferos obedecem a ciclos anuais de atividade sexual que é caracterizada por um período reprodutivo seguido de descanso sexual, onde neste último a função das gônadas pára completamente ou estão atividade reduzida (Thibault et al., 1966; Weens et al., 2015).

A importância do fotoperíodo na reprodução de cervídeos de regiões temperadas foi observada por vários autores, que observaram alterações no sistema reprodutivo ocasionadas pela variação do fotoperíodo tanto nas gônadas (Goss, 1983) como no chifre (French et al., 1956; Goss, 1963, 1969b, 1969a, 1970; Jaczewski, 1954). Este último, considerado uma característica sexual secundária dos cervídeos, é uma estrutura dependente de fotoperíodo (Jaczewski, 1954) que está intimamente

ligado com a atividade testicular. Assim, o chifre é considerado um indicador confiável da atividade testicular do macho de cervídeo (Bubenik, 1986), sendo que a queda e o chifre em velame são indicativos da pausa na espermatogênese em diversas espécies pertencentes a regiões temperadas (Chapman e Harris, 1991; Lincoln, 1992) e o chifre mineralizado representando o período fértil do macho (Lincoln, 1985).

Esse ciclo anual do chifre é um evento sincronizado entre os indivíduos, e a sincronia dos eventos fisiológicos é importante para preparar os machos na disputa e acesso as fêmeas, através do aumento sazonal da testosterona antes do período de cópula (Lincoln e Tyler, 1994). Essa testosterona induz também a maturação do chifre em velame e dá forma ao chifre mineralizado, e também ao comportamento sexual e agressivo associado ao período de maior atividade sexual (Lincoln e Tyler, 1994). O período de calcificação do chifre coincide com a maturação sexual dos cervídeos e corresponde com a maior circulação de testosterona (Mazur, 1973; Mcmillin et al., 1974; Mirarchi et al., 1977). Esse aumento de testosterona induz também o retorno da atividade espermatogênica, resultado do crescimento do volume testicular, desenvolvimento da musculatura do pescoço, e estabelecimento da cor da pelagem de inverno dos cervídeos.

O padrão de acontecimentos dos eventos reprodutivos acontece de forma a coincidir com as características ambientais encontradas em cada estação do ano (Snyder et al., 1983), de forma que tanto o início ou o repouso sexual aconteça em períodos corretos do ano, que para cervídeos correspondem as estações de outono-inverno e primavera-verão, respectivamente. A sincronia é um fenômeno hormônio-dependente (Lincoln e Tyler, 1994) comandada pela melatonina. Seu papel na sincronização foi demonstrado a partir da retirada da glândula pineal (Snyder et al., 1983). Nos cervídeos boreais, esse procedimento não tem efeito importante no padrão sazonal das funções fisiológicas, mas altera o padrão de acontecimentos que predizem a chegada do período reprodutivo. Este, que acontece normalmente no outono/inverno, pode acontecer em qualquer estação do ano: a ausência da pineal desregula o momento certo para a troca da cor da pelagem, mudança do chifre para a fase mineralizada, aumento do volume testicular, retorno da produção espermática, perfil de testosterona, aumento do diâmetro do pescoço, anulando a sincronia de eventos entre os indivíduos (Snyder et al., 1983).

Além disso, a melatonina tem um papel fundamental na percepção da variação do fotoperíodo (Bubenik, 2006). A duração da secreção da melatonina, por sua vez, tem a função de servir tanto como “relógio” e calendário” (Bubenik, 2006) situando o organismo de forma temporal no ambiente e também é responsável por regular a atividade hipotálamo-hipofisária e eixo gonadal (Wayne et al., 1988). Essa relação temporal com o sistema endócrino-reprodutivo tem uma grande importância nos mamíferos, principalmente nos que vivem em regiões de altas latitudes onde o comprimento do dia e da noite varia em grandes níveis durante o ano. Esse mecanismo é considerado uma habilidade que possui uma distinta vantagem seletiva dos mamíferos (Weens et al., 2015). O principal fator fisiológico que influencia nesse

processo é a garantia do nascimento da prole no período mais favorável para sua sobrevivência (Weens et al., 2015).

Para ajustar o nascimento da prole na época da primavera, os animais acasalam durante o outono/inverno (Asher, 2019). Nos reprodutores de dias curtos, tanto fêmeas e machos começam a ciclar quando a duração da noite é maior que a do dia, momento no qual há um aumento do período da secreção de melatonina que é suficiente para estimular o eixo reprodutivo. No caso dos machos, a melatonina estimula o eixo gonadal através da produção de testosterona, com o intuito de preparar os machos para os acasalamentos (Asher et al., 1987).

2.9. Estudos com melatonina em cervídeos de regiões temperadas

As funções sazonais relacionadas a reprodução tem uma grande influência do meio externo, e a dependência do fotoperíodo para ajustar o acontecimento dos eventos reprodutivos se comprovou por meio de experimentos envolvendo a retirada da glândula pineal (Malpaux et al., 1999; Nakane e Yoshimura, 2014), regime de luz (Thibault et al., 1966), e por meio de tratamentos com melatonina (Bittman et al., 1983; Karsch, 1984; Williams e Helliwell, 1993; Yellon e Foster, 1985)

Os estudos envolvendo os efeitos do fotoperíodo em certas mudanças fisiológicas anuais que acontecem nos cervídeos têm sido alvo de pesquisa há um certo tempo (Abbott et al., 1984). Os controles artificiais de fotoperíodo como o regime de luz e o tratamento com melatonina alteram o curso anual dos eventos dependentes do fotoperíodo, como o desenvolvimento testicular, a produção espermática, alargamento da musculatura do pescoço, troca de pelagem e na mudança da fase do chifre.

As alterações no chifre, dependendo da fase do chifre no qual o indivíduo é submetido ao tratamento, vão desde atraso na queda do chifre, atraso no crescimento do chifre em velame como resultado ao aumento de testosterona até a antecipação da mineralização do chifre (Bubenik et al., 1986), que naturalmente obedece a um ciclo anual que é caracterizado pelo crescimento do chifre em velame durante a primavera e a sua mineralização e queda do velame para dar origem ao chifre mineralizado no início do outono (Brown et al., 1978).

Segundo Bubenik (1983), a antecipação da mineralização é um dos indicativos da resposta ao tratamento de melatonina em veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) e isso é observado também em outras espécies como veado-vermelho (*Cervus elaphus*) submetida ao tratamento com melatonina. Geralmente, a antecipação da mineralização do chifre é acompanhado pelo aumento na concentração de testosterona sérica (*Cervus elaphus* – Lincoln; et al., (1984), *Odocoileus virginianus* – Bubenik et al., (1986); Bubenik (2006). O aumento da secreção de testosterona induzida pela melatonina, por sua vez, dita as mudanças observadas no chifre, nas características fisiológicas e no comportamento de machos

de cervídeos, além de induzirem também mudança na cor da pelagem dos animais, que adquirem uma coloração mais escura que é típica do período reprodutiva dessa espécie (Bubenik, 2006).

2.10. Reprodução de cervídeos tropicais e neotropicais

No geral, a reprodução sazonal em ruminantes selvagens pode ser influenciada pelo fotoperíodo, densidade populacional, efeito climático a curto ou longo prazo, condição física durante o período de atividade sexual, fenologia das plantas ou estímulos sócio-sexuais (Ungerfeld et al., 2008). No entanto, esses marcadores ambientais variam consideravelmente dependendo da localização, e nessas circunstâncias, diferentes padrões reprodutivos são observados entre os cervídeos de regiões temperadas e tropicais (Pereira et al., 2010).

O ciclo reprodutivo entre espécies neotropicais é bastante diversificado, e mesmo residindo no mesmo ambiente tropical, cada espécie apresenta uma característica distinta o que impossibilita a definição do padrão reprodutivo típico das espécies de cervídeos dessas regiões. Vale ressaltar que mesmo as mesmas espécies que residem em diferentes latitudes, ou mesmo nas mesmas latitudes, podem diferir notavelmente no tempo de seus ciclos reprodutivos (Pereira, 2010). Por exemplo, o veado-de-cauda-branca (*O. virginianus*) é considerado um reprodutor altamente sazonal na América do Norte, mas a sazonalidade parece ser menos forte em latitudes abaixo de 30°, onde as espécies também podem ser encontradas. O veado-de-cauda-branca da América do Norte (Gallina & Arevalo, 2016), onde as espécies ocupam a maior parte da faixa geográfica e onde o fotoperíodo muda drasticamente ao longo do ano, com longos e frios períodos de inverno, tem uma estação reprodutiva altamente concentrada: o acasalamento ocorre em novembro e dezembro e os filhotes nascem em junho e julho (Goss, 1983). No entanto, as mesmas espécies podem ser encontradas em diferentes latitudes da região Neotropical, e nestas regiões, *O. virginianus* mostra falta ou diferentes graus de sazonalidade reprodutiva, evidenciadas no ciclo de chifres, período de reprodução de machos e fêmeas e período de nascimento dos filhotes (Fuller et al., 2019; Pereira, 2010).

Para *O. virginianus* localizada em regiões tropicais, o grau de sazonalidade reprodutiva varia entre 1 ° e 28 ° N, caracterizado pela presença de estro pós-parto, sendo este uma característica mais comum do que em espécies da zona temperada (Sadleir, 1987), ocorrência de nascimentos ao longo de todo ano (Fuller et al., 2019) com pico durante a estação seca, geralmente com influência do padrão de chuvas (Blouch, 1987; Bronson, 1985; Fuller et al., 2019; Galindo-leal; e Weber, 1998; Janzen, 1983; Klein, 1982; Rodríguez e Solís, 1987, 1994; Wainwright, 2007) ou o ciclo de chifres, que também mostra variação latitudinal (Contreras-Moreno et al., 2019; Pereira, 2010), sem aparente sincronia na reprodução com o ciclo dos chifres (Contreras-Moreno et al., 2019; Gallina et al., 2010). Um estudo recente realizado por

Contreras-Moreno et al. (2019) exemplifica claramente a possível falta de fotoperíodo no ciclo reprodutivo de espécies tropicais: o ciclo sazonal do chifre de *O. virginianus* pertencente a áreas tropicais (por exemplo, Campeche, México, 19 ° N) é caracterizado pelo desenvolvimento do chifre em velame quando a duração da luz do dia aumenta, ao contrário do que ocorre nas latitudes temperadas quando esse chifre se desenvolve durante a redução no comprimento do dia (Goss, 1983; Lincoln, 1992b). Diante disso e tendo em vista a baixa alteração no fotoperíodo nos trópicos, Contreras-Moreno et al. (2019) sugerem que o fotoperíodo poderia ter influência reduzida no controle do desenvolvimento de chifres em *O. virginianus* de Campeche (19 ° N). Além disso, *O. virginianus* das regiões de Campeche (19 ° N) possui uma estação de nascimento da prole sincronizada com as mudanças sazonais, e este processo ocorre geralmente durante os meses da estação seca, quando há locais secos, o que reduziria a mortalidade causada pelo afogamento durante o período de cheia. A associação entre o nascimento e cheias foi documentada em outros estudos, como em *O. virginianus* nos Everglades, na Flórida (Macdonald-beyers e Labisky, 2005), no cervo Chital (*Axis axis*) (Dinerstein, 1980) e em *Thamin Rucervus eldii* (Aung et al., 2001).

O veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), outro cervídeo neotropical, apesar de em menor grau, também mostra uma certa variação reprodutiva regional sobre sua distribuição no leste da América do Sul (5 ° - 40 ° S) (Merino et al., 1997; Pereira, 2010) caracterizada por nascimentos com picos em diferentes regiões neotropicais e sem padrão sazonal estrito (Merino et al., 1997; Redford, 1987; Rodrigues, 1996). Apesar do ciclo de chifres bem definido e síncrono, estudos têm mostrado que o veado-campeiro não é estritamente sazonal (Jackso e Langguth, 1987; Pereira et al., 2005; Redford, 1987). Além disso, também é sugerida a associação entre ciclo reprodutivo e precipitação para *O. bezoarticus* de vida-livre do Parque Nacional das Emas (Mato Grosso do Sul / Goiás, Brasil, 18 ° S). Esta espécie, localizada em áreas neotropicais, tem um ciclo de chifre bem definido e síncrono associado à variação sazonal de testosterona (Pereira et al., 2005). Segundo este último autor, nesta espécie, o desenvolvimento do chifre em velame ocorre durante a diminuição do comprimento do dia (principalmente no inverno) e o chifre mineralizado é observado durante o verão e o outono, quando é considerado o período de atividade sexual. De fato, não está claro se o fotoperíodo poderia afetar o ciclo reprodutivo de *O. bezoarticus*, uma vez que os indivíduos mantidos em regiões temperadas não apresentaram período de atividade sexual fixo (Frädrich, 1981). Mesmo assim, sugere-se que a atividade reprodutiva possa estar relacionada aos padrões anuais de precipitação, uma vez que *O. bezoarticus* está exposto a uma leve variação no fotoperíodo e experimenta uma grande mudança na precipitação nessa área (Pereira et al., 2005).

Similarmente, o ciclo de chifres de taruka (*Hippocamelus antisensis*) (8 ° S - 30 ° S) é sincronizado e sazonal. A queda de chifres ocorre em setembro, o crescimento do chifre em velame em dezembro e a mineralização do chifre em fevereiro (Barrio, 2010). O pico da estação reprodutiva ocorre em junho no meio da estação seca

(Barrio, 2010). Os nascimentos ocorrem de janeiro a março, atingindo o pico em fevereiro no meio da estação chuvosa, embora no mês de abril também seja relatado o pico de nascimentos para as populações do sul (Barrio, 2013).

No entanto, outras espécies neotropicais, como o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), aparentemente têm um ciclo de chifres único, com pouca ou nenhuma influência do fotoperíodo (chifre em velame e chifre mineralizado observados ao longo do ano tanto em vida-livre como em cativeiro) e falta de sincronização do ciclo do chifre entre os animais (Ramos, 2004). Segundo este último autor, com base em observações anedóticas, a permanência dos machos com chifre mineralizado favorece o domínio do território e pode estar relacionada à idade, sendo que os machos menores de 6 e maiores de 9 anos tem a queda do chifre mineralizado apenas em períodos secos.

Curiosamente, estudos realizados em espécies do gênero *Mazama* aparentemente mostram alguma inconsistência em seus ciclos reprodutivos: estudos em cativeiro demonstram que *M. gouazoubira* não apresenta um ciclo definido dos chifres, sem variação sazonal nas características reprodutivas, bem como para *M. americana* (Pereira et al., 2020). Os machos de *M. gouazoubira* da região da Argentina perdem o chifre entre agosto e dezembro e ficam em fase de velame desde o momento em que perdem o chifre até março ou abril, quando os chifres se tornam mineralizados (Black-Décima, 2000; Black-Décima et al., 2010). No Brasil, *M. gouazoubira* também apresentam alguma ciclicidade no ciclo do chifre, já que a maioria dos indivíduos são encontrados com chifres mineralizados em maio, junho e julho (Stallings, 1986; Black-Décima et al., 2010). Em relação aos nascimentos, *M. gouazoubira* também parece mostrar alguma sazonalidade na natureza: no Cerrado, os filhotes eram mais frequentemente observados no campo no final da estação chuvosa (Leeuwenberger et al., 1999); No Pantanal, foram observados dois picos de concentração de nascimentos, o primeiro logo antes do início da estação chuvosa e o segundo após o período anual de cheia (Pinder, 1997); Juliá e Peris (2010) relataram alguns picos leves de nascimentos no ano no noroeste da Argentina.

A concentração de nascimentos é notadamente observada nos meses considerados mais favoráveis ao desenvolvimento de filhotes (Branan e Marchinton, 1987): Para *Mazama americana*, os filhotes são vistos durante os períodos do ano com menor precipitação (Bisbal, 1994); no Peru, os nascimentos ocorreram entre fevereiro e abril, porém especificamente no nordeste do Peru, as espécies apresentaram diferentes picos de nascimentos quando o registro dos nascimentos foi realizado em diferentes períodos (Hurtado-Gonzalez e Bodmer, 2006; Mayor et al., 2011); no Suriname, o nascimento está concentrado entre setembro e abril, no primeiro - e mais moderado - dos dois períodos de chuvas anuais na região (Branan & Marchinton, 1987); em cativeiro, *M. americana* se reproduz ao longo do ano (observação pessoal).

2.10. A falta de resposta ao fotoperíodo

Os cervídeos tropicais podem ter retido a “ritmicidade endógena” desenvolvida por seus ancestrais de cervídeos de regiões temperadas (Loudon e Brinklow, 1992) e um grande número espécies tropicais exibe reprodução sazonal ou épocas de reprodução pouco definidas, aparentemente não relacionadas a mudanças fotoperiódicas (Asher et al., 1996; Asher et al., 1999; Bubenik et al., 1991). No entanto, estudos detalhados devem ser realizados para confirmar a possibilidade da falta de resposta ao fotoperíodo dessas espécies.

Diante dessa consideração, mesmo as espécies de cervídeos simpátricas nas regiões tropicais podem diferir em seu ciclo reprodutivo, sugerindo que as forças evolutivas (por exemplo, padrão de precipitação, pressão de predação, disponibilidade sazonal de alimentos, competição entre espécies simpátricas) atuam em diferentes graus no seu ciclo reprodutivo. É o caso do Cervo-Chital e do Cervo-Sambar (*Rusa unicolor*) que compartilham o mesmo hábitat em Nepal, e tem uma diferença de 6 meses no seu ciclo reprodutivo (Mishra e Wemmer, 1987). Além disso, de acordo com os mesmos autores, no Parque Nacional Real de Chitawan do Nepal coexistem quatro espécies de cervídeos, e todas elas têm um tempo diferente no ciclo reprodutivo, seleção de habitat e ecologia alimentar. O veado-campeiro e o cervo-do-pantanal coexistem na planície temperada da região norte do Pampa, no sudeste da América do Sul, e ambos têm características diferentes em relação à preferência de habitat, ecologia alimentar e ciclo reprodutivo. O cervo-do-pantanal é considerado uma espécie estenóica, confinada ao ambiente das áreas úmidas e o veado-campeiro é uma espécie euriônica e ocupa a planície do Pampa, mas também as pradarias nas fronteiras do Pantanal (Loponte e Corriale, 2019).

No caso de *M. americana* e *M. gouazoubira*, são espécies simpátricas na Mata Atlântica e apresentam inúmeras semelhanças ecológicas e uso de habitat (Ferregueti et al., 2015). Ao contrário dos cervídeos do Nepal, *Mazama spp* apresenta ciclo reprodutivo semelhante, seleção de habitat e ecologia alimentar (Barrozo et al., 2001; Ferregueti et al., 2015; Gayot et al., 2004; Pereira, 2010; Pereira et al., 2010). Por outro lado, essas duas espécies diferem em seu nicho ecológico (por exemplo, padrão de atividade, preferência de habitat), o que pode evitar a competição por habitat e recursos alimentares.

Segundo Asher (2011), algumas espécies tropicais percebem e respondem a mudanças no fotoperíodo de maneira diferente das espécies de cervídeos de regiões temperadas. O Cervo-Rusa (nativo das regiões equatoriais de Java, Timor e Celebes) cicla durante todo o ano (com ciclo de chifre assíncrono e distribuição de nascimento ao longo do ano nos trópicos) e mostra padrões reprodutivos sazonais distintos quando são transferidos e mantidos no sul da Austrália (38 ° S): o pico de fertilidade ocorre durante o final do inverno e na primavera (julho-setembro) (Van Mourik et al., 1986) e estabelece um ritmo reprodutivo baseado em dias longos (Van Mourik e Stelmasiak, 1990). No caso do Cervo-de-Eld (*Cervus eldi thamin*), esta espécie

apresenta forte sazonalidade reprodutiva em sua região de origem subtropical, que persiste após a translocação para altas latitudes (48 ° N). No entanto, os nascimentos da prole ocorrem durante os meses de inverno (Monfort et al., 1991).

Algumas teorias foram levantadas para explicar o porquê cervídeos tropicais ou subtropicais translocados para ambientes temperados respondem ao fotoperíodo: cervídeos tropicais ou subtropicais podem responder a flutuações fotoperiódicas sutis de baixa amplitude, uma vez que o Cervo-de-Eld mantido em cativeiro em regiões temperadas por mais de 50 anos continuam exibindo seu padrão reprodutivo original (Pereira, 2010).

O Cervo-Chital apresenta uma contradição no seu ciclo reprodutivo, uma vez que em condições naturais a sazonalidade nos trópicos é limitada, e após a translocação para zonas temperadas apresenta mudanças em relação a sazonalidade (Asher, 2011). A espécie mantida na latitude 27 ° N (no sul do Nepal) se reproduz durante a primavera (março a maio) (Mishra e Wemmer, 1987) e quando a espécie, de origem do subcontinente indiano, é mantidos a latitude 51°N, os indivíduos exibem ciclo testicular e do chifre que corresponde ao período de 13 meses.

Curiosamente, o gênero *Mazama* translocado para zonas temperadas (por exemplo, *Mazama americana*) mantido no zoológico do Bronx (latitude 39 ° N) se reproduz ao longo do ano (MacNamara & Eldridge, 1987), com nascimentos ocorrendo em todos os meses do ano.

Diante dessas observações, a insensibilidade ao fotoperíodo parece estar presente em algumas espécies, sendo que cervídeos tropicais translocados para ambientes temperados podem expressar ritmos endógenos ligados a padrões históricos de disponibilidade de recursos nos trópicos, em vez de responder aos sinais do fotoperíodo (Monfort et al., 1993). No entanto, aparentemente, a mudança ao fotoperíodo pode ser percebida por outras espécies de cervídeos tropicais, mas até hoje permanece incerto o motivo pelo qual ainda retêm essa habilidade.

Dados sobre observação do nascimento e evidências de espermatogênese em cervídeos tropicais sugerem que os machos mantêm a fertilidade durante todo o ano (Chapman e Harris, 1991; Loudon e Curlewis, 1988; Monfort et al., 1993; Pereira, 2010). Alguns, ou senão a maioria dos cervídeos neotropicais, exibem a capacidade fertilizante em todas as fases do chifre já que é possível observar uma grande distribuição dos nascimentos ao longo do ano (Pereira, 2010).

No entanto, o papel das gonadotrofinas no controle da atividade esteroidogênica e espermatogênese em cervídeos tropicais é pouco conhecido (Pereira, 2010). Nos machos de cervídeos de regiões temperadas, a secreção de melatonina induz oscilações nos níveis de LH, bem como nos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona, a fim de iniciar a atividade de esteroidogênese testicular e estimular a espermatogênese durante o pico do ciclo testicular circanual, respectivamente (Pereira, 2010). No entanto, em cervídeos tropicais, a melatonina parece não ter um efeito no ciclo reprodutivo dessas espécies, como demonstrado por Loudon & Curlewis (1988). O perfil de LH e FSH no Cervos de Eld mostra variações circanuais, semelhantes a algumas espécies de cervídeos de

regiões temperadas como o veado-de-cauda-branca, com presença de espermatozoides móveis em todas as estações do ano e pico da atividade gonadal à medida que o comprimento do dia aumenta (Monfort et al., 1993). Por outro lado, o Cervo-Chital mostra pouca variação sazonal nos níveis de FSH e LH (Bubenik et al., 1991), próximo dos níveis sazonais médios encontrados em corça (*Capreolus capreolus*) (Bubenik et al., 1991). O Pudu é a única espécie neotropical que tem os níveis de FSH e LH descritos na literatura, com presença nos níveis máximos de FSH durante 4 meses seguidos e dois picos de LH que precedem os dois picos de testosterona, sendo este pico observado durante o outono e o outro na primavera (Bubenik et al., 1996). O macho desta espécie exibe dois picos sazonais de igual magnitude para os hormônios reprodutivos (FSH e testosterona) espaçados em aproximadamente 6 meses (Bubenik et al., 1996; Vidal et al., 2012).

O padrão semestral e elevações temporárias da testosterona na primavera são observados em várias espécies de cervídeos de regiões temperadas (Bubenik, 1986), como em corça (Schams e Barth, 1982; Sempéré, 1990), cervo-vermelho (Suttie e Kay, 1985) e em machos castrados de veado-de-cauda-branca (Bubenik et al., 1982), mas o pico fora da estação da atividade sexual é muito menor do que o encontrado para o pudu da região sul e é caracterizado por uma pequena reativação da função reprodutiva e, portanto, um pulso de testosterona (Bartoš e Bubenik, 2011). Por outro lado, a variação sazonal dos hormônios reprodutivos no pudu se assemelha mais à da corça. Essas duas espécies compartilham raízes filogenéticas semelhantes (Vidal et al., 2012). Não obstante, mesmo que o corça e o pudu tenham dois picos anuais de testosterona, na primeira espécie os picos de LH e testosterona ocorrem muito mais próximos no tempo, com o pico da primavera sendo consideravelmente menor que o do verão (Sempéré, 1990; Sempéré et al., 1992). No passado, acreditava-se que apenas os machos pudu e a corça apresentavam essa característica distinta, mas outros cervídeos tropicais, como o cervo-rusa, também mostra uma elevação bifásica anual de testosterona (Pereira, 2010), assim como o veado-campeiro (Pereira et al., 2005). A variação sazonal do perfil de testosterona no macho *O. bezoarticus* (Pereira et al., 2005) se assemelha mais a da espécie *P. puda* (Vidal et al., 2012) e a corça (Sempéré, 1990; Sempéré et al., 1992; Reyes et al., 1997).

Muitos autores afirmam que esse ritmo bimodal é uma reativação das características reprodutivas relacionadas às características sexuais secundárias e ao comportamento sexual (Bubenik, 1990; Vidal et al., 2012). Em pudu, o pico de testosterona que ocorre na primavera está relacionado ao comportamento de perda do velame e o pico durante o verão-outono está relacionado ao comportamento sexual (Vidal et al., 2012), concordando com Bubenik et al. (1982) que afirma que os níveis máximos de testosterona parecem ser essenciais para o comportamento reprodutivo. Para *O. bezoarticus*, embora inconclusivo, é semelhante às espécies de pudu: o pico do outono-verão corresponde ao período de atividade sexual e o pico da primavera-inverno está relacionado a queda do velame e à mineralização de chifres (Pereira et al., 2005).

Evidências sugerem que esse ritmo bimodal é uma relíquia do padrão reprodutivo originário dos cervídeos ancestrais que se desenvolveram nas regiões semitropicais (Bubenik, 1990) que ainda persiste em alguns cervídeos tropicais e temperados existentes, resultantes da evolução (Bubenik et al., 2002). De acordo com Reyes et al. (1997), as duas elevações sazonais da testosterona e a elevação prolongada do FSH podem estar relacionadas ao período prolongado de ativação gonadal, e o pico que ocorre na primavera está relacionado à ativação do sistema reprodutivo e com a determinação da hierarquia de machos em pudu (Bubenik et al., 1996). Existe uma regra geral de que a população que vive mais perto do equador exibe uma estação reprodutiva mais longa do que a que é encontrada nas regiões mais boreais (Bubenik et al., 1990). Apesar dos poucos dados disponíveis sobre o perfil de FSH e LH em espécies neotropicais, sabe-se que as espécies podem manter atividade gonadal ativa ao longo de todo o ano. Tanaka et al. (dados não publicados) avaliaram o perfil dos metabólitos fecais de andrógenos, ciclo de chifres e características seminais em um indivíduo de veado-campeiro durante o período de 1 ano e observaram que o ejaculado é mantido durante todo o ano e o perfil de metabólitos fecais de andrógenos apresenta dois picos, resultado semelhante encontrado por Pereira et al. (2005) para esta espécie. Durante o acompanhamento anual do indivíduo do veado-campeiro, o animal manteve o chifre mineralizado do início até o final do estudo. Este resultado é interessante de uma certa maneira, uma vez que o ciclo de chifres nessa espécie possui ciclo sazonal. De acordo com Ungerfeld et al. (2009), o comprimento da fase do chifre mineralizado pode ser estendido resultante de estímulos sociais, que pode causar um estímulo na produção de testosterona. Ungerfeld e colaboradores observaram que os machos que mantinham contato permanente com as fêmeas, retinham o chifre mineralizado por mais tempo que os machos separados das fêmeas. Portanto, a colheita constante de sêmen (1x por semana) durante um ano provavelmente teve o mesmo efeito estimulatório que a presença de fêmeas, e estendeu a permanência chifre mineralizado. Isso é corroborado pelos estudos feitos por West e Nordan (1976), que observaram a extensão do período da atividade sexual em cervídeos de regiões temperadas como o veado-mula (*Odocoileus hemionus*), devido a presença de fêmeas em período de estro prolongado. No estudo de Tanaka (dados não publicados), foi possível verificar que as características seminais não apresentaram variação sazonal, em contraste com os dados obtidos por Duarte e Garcia (1997) que observaram a ausência de produção seminal durante o inverno e a primavera, quando os indivíduos estavam com o chifre desencapado e presença de boa qualidade seminal em um indivíduo com chifre em velame.

Até o momento, estudos em indivíduos cativos de espécies de *Mazama ssp* mostraram que o modelo bianual da testosterona não é observado nessas espécies. Existe um claro padrão acíclico de secreção de testosterona tanto plasmática e fecal, e foi levantada a hipótese de que a manutenção do ejaculado ao longo do ano é resultado da disponibilidade durante o ano todo de fêmeas em condições reprodutivas e da ocorrência de estro pós-parto em *Mazama ssp* (Pereira, 2010), que pode ter

favorecido evolutivamente os machos cujo potencial reprodutivo foi preservado, independentemente da estação e do status dos chifres (Pereira et al., 2020). Portanto, a qualidade do sêmen não diminui durante o estágio de veludo (Barrozo et al., 2001; Pereira et al., 2020), contribuindo para o ciclo reprodutivo estendido e permitindo que os machos copulem em qualquer fase do ciclo de chifres. Dada essa condição, é plausível considerar que machos com chifre em velame contribuirão menos que os machos com chifre desencapado, devido à incapacidade de competir por fêmeas (Lincoln, 1992b). Nesse contexto, a existência de fêmeas em estado reprodutivo contínuo também pode explicar a permanência do chifre desencapado nos machos por períodos prolongados (mais de um ano) (Barrozo et al., 2001; Bisbal, 1994; Frädrich, 1987; Macnamara e Eldridge, 1987; Merino et al., 1997; Pinder, 1992; Pinder e Leeuwenberger, 1997), para ter vantagem no acesso as fêmeas (Frädrich, 1987; MacNamara e Eldridge, 1987; Bisbal, 1994).

Segundo Contreras-Verteramo et al. (2016), o veado-de-cauda-branca de San Luis Potosí (22 ° N) aparentemente possui um pico sazonal da secreção de testosterona, cujos níveis mais altos foram registrados de julho a fevereiro (verão - inverno) quando o chifre se encontra mineralizado. O valor mais baixo foi encontrado entre março e junho (primavera - verão), quando o chifre cai e o novo chifre em velame cresce. No entanto, essa espécie contrasta com a espécie do norte do México, onde animais com chifre mineralizado são vistos no período de outubro a fevereiro (outono-inverno) e mesmo em latitudes mais altas, onde o período de maiores concentrações de testosterona é de outubro a dezembro (inverno). Além disso, as espécies de San Luis Potosi podem apresentar um período fértil muito mais amplo, diferentemente do veado-de-cauda-branca de latitudes mais altas (Gallina-Tessaro et al., 2019).

No caso do veado-Muntjac de Reeves (*Muntiacus reevesi*) residente na região da Inglaterra (latitude ~ 52 ° N), o ciclo de chifres exibe um alto grau de sincronia entre os machos adultos (Chapman e Chapman, 1982), apesar da ausência de variação sazonal no tamanho corporal, pescoço circunferência ou volume do testículo e uma pequena variação sazonal nos níveis de testosterona (Chapman e Harris, 1991). Esses últimos autores observaram uma redução de 23% no tamanho médio dos testículos em machos com chifre em velame, mas a pequena redução no tamanho dos testículos não foi associada à redução de tamanho nos órgãos reprodutivos (por exemplo, diâmetro médio dos túbulos seminíferos), e ao pequeno declínio na abundância de espermatozóides durante o período dos chifres em velame.

Quando as características reprodutivas do muntjac de Reeves são avaliadas em regiões nativas (Taiwan, 22 ° N), uma variação sazonal clara nos níveis de testosterona é observada com correlação durante as mudanças nas fases do chifre (Pei et al., 2009). Segundo esses autores, o ciclo de chifres pode estar ligado ao fotoperíodo e as mudanças sazonais menos bem definidas nos níveis de testosterona encontradas por Chapman e Harris (1991) provavelmente se devem ao estresse, uma vez que os indivíduos em seu estudo foram obtidos pela caça.

Ao contrário do muntjac de Reeves, o macho Javan Muntjak (*Muntiacus muntjac muntjac*) (11 ° N) tem um ciclo de chifre assíncrono e o chifre está em

diferentes fases entre os machos (S. Wahyuni*, comunicação pessoal, 11 de abril de 2020). Além disso, de acordo com este autor, a flutuação da testosterona está associada ao ciclo do chifre, mas não depende do fotoperíodo (dados não publicados).

Para o cervo-de-Eld, apenas a motilidade espermática progressiva se reduz durante o estado de chifre em velame, mas espermatozóides móveis foram coletados ao longo do ano. Também foi relatado um declínio de <25% do volume testicular no cervo-chital, que não apresentou azospermia mesmo quando alcançou o menor tamanho do volume testicular (Loudon e Curlewis, 1988). Além disso, enquanto o cervo-muntjac mantém a espermatogênese durante o ano todo, evidenciada por evidências histológicas (Chapman e Harris, 1991), o cervo-chital tem a espermatogênese limitada quando o volume testicular se encontra no menor tamanho, sendo que os espermatozóides móveis coletados podem refletir o armazenamento espermático.

Segundo Lincoln (1985), um declínio no volume testicular de > 75% do máximo volume sazonal está geralmente associado à parada completa na espermatogênese, mas em espécies subtropicais como o muntjac de Reeves, a fase de quiescência do ciclo reprodutivo provavelmente não é observada porque a produção de testosterona pode nunca ser baixa o suficiente para provocar a diminuição da espermatogênese durante fase de chifre em velame (Lin et al., 2014; Pei et al., 1995). Portanto, as espécies podem se reproduzir em qualquer fase do ciclo de chifre, uma vez que permanecem reprodutivamente ativas o ano todo, sem variação na quantidade ou qualidade dos espermatozóides (Pei et al., 2009). Segundo Monfort et al. (1993), os cervídeos subtropicais parecem diferir das espécies temperadas no grau em que a espermatogênese é interrompida durante a fase de regressão do ciclo testicular sazonal, mas até hoje apenas hipóteses foram levantadas para sugerir quais hormônios poderiam estar envolvidos no ciclo testicular dessas espécies.

2.11. Estudos com melatonina em cervídeos em cervídeos de regiões tropicais

Para apoiar a hipótese de que espécies tropicais e sub-tropicais não respondem ao fotoperíodo, essas espécies podem ser submetidas ao tratamento com melatonina (oral ou implante). Na literatura, poucos trabalhos foram realizados com o intuito de verificar a possibilidade dessas espécies responderem ao fotoperíodo.

Loudon e Curlewis (1988) mostraram que o cervo-Chital não respondeu ao tratamento com melatonina, e não foram observadas mudanças em relação ao desenvolvimento dos testículos, na circunferência de pescoço ou no crescimento e mineralização dos chifres (apesar de um indivíduo ter demonstrado um atraso na queda do chifre). Por outro lado, Mylrea (1992) indicou que os machos dessa espécie tratado com melatonina demonstraram queda sincronizada e antecipada do chifre

* Wahyuni, S (2020). Endereço eletrônico. Comunicação pessoal

entre os indivíduos. No entanto, salienta-se um detalhe importante nesses dois estudos envolvendo o tratamento com melatonina: o cervo-chital é um cervídeo originário da Ásia Tropical e em nenhum dos dois estudos o experimento foi realizado no local nativo da espécie (Inglaterra 52°N e Australia 37°S ao 15°S, respectivamente), o que pode comprometer o resultado desses experimentos já que a origem da espécie pode ter uma influência sobre suas estratégias reprodutivas.

Em cervídeos dependentes de fotoperíodo, o tratamento com melatonina modifica a sazonalidade reprodutiva, fazendo com que os indivíduos tratados sejam direcionados a estação de outono (dias curtos) quando o tratamento é realizado durante o verão e primavera (Asher et al., 1987; Bubenik e Smith, 1987; Lincoln, 1984; Loudon e Curlewis, 1988).

Tabela 1 Espécies neotropicais, sazonalidade reprodutiva, associação das características reprodutivas com fotoperíodo, latitude, localização geográfica das respectivas espécies.

Espécies	Sazonalidade reprodutiva	Fotoperíodo	Latitude	Localização geográfica	Referência
Veado-campeiro (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>)	Ciclo do chifre associado a testosterona (vida-livre); ciclo do chifre, testosterona (cativeiro)	?	5° - 41°S	América Latina	(Pereira <i>et al.</i> , 2005; Ungerfeld <i>et al.</i> , 2008) Tanaka et al. (dados não publicados)
Cervo-do-pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>)	Ciclo do chifre (vida-livre)	Não	8° - 34°S	América Latina	(Ramos, 2004)
Veado-catingueiro (<i>Mazama gouazoubira</i>)	Ciclo do chifre (vida-livre)	Não	1,5° - 34°S	América Latina	(Barrozo <i>et al.</i> , 2001; Black-Décima <i>et al.</i> , 2010)
Veado-mateiro (<i>Mazama americana</i>)	.*	Não	11°N – 15°S	América Latina	(Versiani <i>et al.</i> , 2009; Pereira <i>et al.</i> , 2020)
Veado-roxo (<i>Mazama nemorivaga</i>)	.*	Não	11°N - 16.5°S	América Latina	(Galindo <i>et al.</i> , 2019)
Veado-mateiro-pequeno (<i>Mazama bororo</i>)	.*	Não	23 - 28°S	Brasil (Paraná, São Paulo, Santa Catarina)	(Duarte <i>et al.</i> , 2016; Galindo <i>et al.</i> , 2019)
Veado-mão-curta (<i>Mazama nana</i>)	Ciclo do chifre (cativeiro)	Não	23°S - 30°S	Argentina; Brasil; Paraguai	(Galindo <i>et al.</i> , 2019)

Veado-da-cauda-branca (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Ciclo do chifre, (associado a testosterona), sêmen: Sul do Canadá, maioria da região Sul dos EUA Ciclo do chifre: Brazil, Mexico	Sul do Canadá, maioria da região Sul dos EUA	1°- 26°N 26° - 69°N	América Latina e do Norte	(Bubenik, 1983, 2006; Contreras-Moreno <i>et al.</i> , 2019; Fuller <i>et al.</i> , 2019)
Pudú-do-Sul (<i>Pudu puda</i>)	Ciclo do chifre (associado a testosterona)	Não	35°N - 46°S	Sul do Chile e sudoeste da Argentina	(Bubenik <i>et al.</i> , 1996; 2000)

*Sem nenhuma evidência de sazonalidade

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 2 Espécies tropicais, sazonalidade reprodutiva, associação das características reprodutivas com fotoperíodo, latitude, localização geográfica das respectivas espécies.

Espécies	Sazonalidade reprodutiva	Fotoperíodo	Latitude	Localização geográfica	Referência
Veado-chital (<i>Axis axis</i>)	Ciclo do chifre, sêmen	Não	6.5° - 29°N	Bangladesh; Bhutan; India; Nepal; Sri Lanka	(Loudon e Curlewis, 1988)
Cervo-rusa (<i>Rusa timorensis</i>)	.*	Região nativa: Não Translocação: ritmo “dias longos”	6.2°– 8.6°S	Indonésia (Bali, Jawa)	(Van Mourik e Stelmasiak, 1990)
Cervo-rusa Javan (<i>Rusa unicorn</i>)	Ciclo do chifre (testosterona)	Sim	33.7°N – 5.14°S	Continente asiático	(Savanth e Saseendran, 2012)
Cervo-de-Eld (<i>Cervus eldii thamin</i>)	Ciclo do chifre, sêmen	Sim	12.2° - 36°N	Continente asiático	(Monfort <i>et al.</i> , 1991, 1993)
Cervo-porco-indiano (<i>Axis porcinus</i>)	Ciclo do chifre (associado a testosterona)	Não	21.7° - 31.5°N	Bangladesh; Bhutan; Cambodia; India; Nepal; Pakistan	(Dinerstein, 1980; Geist, 1998)
Huemul (<i>Hippocamelus bisulcus</i>)	Ciclo de chifre, sêmen	Sim	32° - 36.8°S	Argentina; Chile	(Merkt, 1987; Rojas <i>et al.</i> , 2005)
Southern Red Muntjac, Barking deer (<i>Muntiacus muntjac</i>)	Ciclo do chifre (associado a testosterona)	Não	9.9°N – 10.1°S	Brunei Darussalam; Indonesia; Malaysia; Thailand	(Wahyuni <i>et al.</i> , 2018; comunicação pessoal, dados não publicados)

Muntjac Reeves (<i>Muntiacus reevesi</i>)	Ciclo do chifre (associado a testosterona), sincronia entre machos	Aparentemente	22.31 - 34.7°N	China; Taiwan	(Pei <i>et al.</i> , 2009; Lin <i>et al.</i> , 2014)
Swamp (<i>Rucervus duvaucelii</i>)	?	?	27.1° - 30.1°N	India; Nepal	-

*Sem nenhuma evidência de sazonalidade

Fonte: elaborado pelo autor.

3. REFERÊNCIAS

ABBOTT, M. J.; ULLREY, D. E.; KU, P. K.; SCHMITT, S. M.; ROMSOS, D. R.; TUCKER, H. A. Effect of Photoperiod on Growth and Fat Accretion in White-Tailed Doe Fawns. **The Journal of Wildlife Management**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 776, 1984. DOI: 10.2307/3801424.

ARENDT, J. **Melatonin and the Mammalian Pineal Gland**. Londres: Chapman Hall, 1995.

ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: Influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of Reproduction**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 13–22, 1998. DOI: 10.1530/ror.0.0030013.

ARENDT, J. The Pineal Gland and Pineal Tumours. **Endotext** , [S. l.], n. 8, p. 1–33, 2011.

ARENDT, J.; SYMONS, A. M.; LAUD, C. A.; PRYDE, S. J. Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 395–400, 1983. DOI: 10.1677/joe.0.0970395.

ASDELL, S. A. Patterns of mammalian reproduction. **Patterns of mammalian reproduction.**, [S. l.], 1946.

ASHER, G. W. Reproductive cycles of deer. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 124, n. 3–4, p. 170–175, 2011. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.026>.

ASHER, G. W. Deer. In: NOAKES, D. E.; PARKINSON, T. J.; ENGLAND, G. C. W. (org.). **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 693–700. DOI: 10.1016/b978-0-7020-7233-8.00039-2.

ASHER, G. W.; DAY, A. M.; BARRELL, G. K. Annual cycle of liveweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 353–362, 1987. DOI: 10.1530/jrf.0.0790353.

ASHER, G. W.; FISHER, M. W.; FENNESSY, P. F. Environmental constraints on reproductive performance of farmed deer. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 42, n. 1–4, p. 35–44, 1996. DOI: 10.1016/0378-4320(96)01501-1.

ASHER, G. W.; MONFORT, S. L.; WEMMER, C. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, [S. l.], v. 54, n. Whitehead, p. 143–156, 1999. DOI: 10.1530/biosciprocs.4.011.

AUNG, M.; MCSHEA, W. J.; HTUNG, S.; THAN, A.; SOE, T. M.; MONFORT, S.; WEMMER, C. Ecology and social organization of a tropical deer (*Cervus Eldi Thamin*). **Journal of Mammalogy**, [S. l.], v. 82, n. 3, p. 836–847, 2001. DOI: 10.1644/1545-1542(2001)082<0836:easooa>2.0.co;2.

AXELROD, J. The pineal gland: A neurochemical transducer. **Science**, [S. l.], v. 184, n. 4144, p. 1341–1348, 1974. DOI: 10.1126/science.184.4144.1341.

BARRIO, J. Taruka *Hippocamelus antisensis* (d'Orbigny 1834). In: DUARTE, J. M. B.; GONZALES, S. (org.). **Neotropical Cervidology**. Jaboticabal: Funep, 2010. p. 77–88.

BARRIO, J. *Hippocamelus antisensis* (Artiodactyla: Cervidae). **Mammalian Species**, [S. l.], v. 45, p. 49–59, 2013.

BARROZO, L. A.; TONIOLO, G. H.; DUARTE, J. M. B.; PINHO, M. P.; OLIVEIRA, J. A. Padrão anual de variação da testosterona sérica, volume testicular e aspectos seminais de veados-catigueiros (*Mazama gouazoubira*) em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S. l.], v. 25, p. 210–211, 2001.

BARTNESS, T. J.; GOLDMAN, B. D. Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. **Experientia**, [S. l.], v. 45, p. 939–945, 1989.

BARTNESS, T. J.; POWERS, J. B.; HASTINGS, M. H.; BITTMAN, E. L.; GOLDMAN, B. D. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: What has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? **Journal of Pineal Research**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 161–190, 1993. DOI: 10.1111/j.1600-079X.1993.tb00903.x.

BARTOŠ, L.; BUBENIK, G. A. Relationships between rank-related behaviour, antler cycle timing and antler growth in deer: Behavioural aspects. **Animal Production Science**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 303–310, 2011. DOI: 10.1071/AN10195.

BARTOŠ, L.; REYES, E.; SCHAMS, D.; BUBENIK, G.; LOBOS, A. Rank dependent seasonal levels of IGF-1, cortisol and reproductive hormones in male pudu (*Pudu puda*). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [S. l.], v. 120, n. 2, p. 373–378, 1998. DOI: 10.1016/S1095-6433(98)10038-7.

BECCA VIN, C.; MALPAUX, B.; TILLET, Y. Effect of oestradiol and photoperiod on TH mRNA concentrations in A15 and A12 dopamine cell groups in the ewe. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 59–66, 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2826.1998.00175.x.

BEDENBAUGH, M. N.; BOWDRIDGE, E. C.; HILEMAN, S. M. Role of neurokinin B in ovine puberty. **Domestic Animal Endocrinology**, [S. l.], p. 106442, 2020. DOI: 10.1016/j.domaniend.2020.106442. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106442>.

BERGALLO, H. G.; DA ROCHA, F. D.; ALVES, M. A. S.; SLUYS, M. V. **A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro**. [s.l.] : EDUERJ, 2000. v. 1 Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Carlos_Rocha22/publication/285189379_Repteis/links/565c530608aefe619b252625/Repteis.pdf. Acesso em: 17 mar. 2020.

BISBAL, F. J. Biología poblacional del venado matacán (*Mazama spp.*) (Artiodactyla: Cervidae) en Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 305–313, 1994.

BITTMAN, E. L.; KARSCH, F. J.; HOPKINS, J. W. Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: Regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. **Endocrinology**, [S. l.], v. 113, n. 1, p. 329–336, 1983. DOI: 10.1210/endo-113-1-329.

BLACK-DÉCIMA, P. Home range, social structure, and scent marking behavior in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in a large enclosure. **Mastozoología Neotropical / J. Neotrop. Mammal**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 5–14, 2000.

BLACK-DÉCIMA, P. A.; ROSSI, R. V; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. Brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) (Fisher 1814). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. (org.). **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: Funep, 2010. a. p. 255–270.

BLACK-DÉCIMA, P. A.; VOGLIOTTI, A. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2016. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/29620/22154584>. Acesso em: 4 jan. 2019.

BLACK-DÉCIMA, P.; ROSSI, R. V; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; JULIÁ, J. P. Brown Brocket Deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In: **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. [s.l: s.n.]. p. 190–201.

BLANVILLAIN, C.; BERTHIER, J. L.; BOMSEL-DEMONTTOY, M. C.; SEMPÉRÉ, A. J.; OLBRICHT, G.; SCHWARZENBERGER, F. Analysis of reproductive data and measurement of fecal progesterone metabolites to monitor the ovarian function in the Pudu, *Pudu puda* (Artiodactyla, Cervidae) Produce a guide of French Polynesian Birds View project Save several critically endangered birds from extinction View project. **Mammalia**, [S. l.], v. 61, n. 4, p. 589–602, 1997. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/281350775>. Acesso em: 24 mar. 2020.

BLOUCH, R. A. Reproductive seasonality of white tailed deer on the Colombian Llanos. In: WEMMER, C. M. (org.). **Biology and Management of the Cervidae**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 339–344.

BORJIGIN, J.; LI, X.; SNYDER, S. H. THE PINEAL GLAND AND MELATONIN: Molecular and Pharmacologic Regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, [S. l.], v. 39, p. 53–65, 1999. Disponível em: www.annualreviews.org. Acesso em: 19 mar. 2020.

BORJIGIN, J.; ZHANG, L. S.; CALINESCU, A. A. Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. **Molecular Cell Endocrinology**, [S. l.], v. 349, n. 1, p. 1–16, 2012. DOI: 10.1038/jid.2014.371.

BRANAN, W. V.; MARCHINTON, R. L. Reproductive ecology of White-tailed and red brocket deer in Suriname. In: WEMMER, C. (org.). **Biology and Management of the Cervidae**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 334–351.

BRONSON, F. H. Mammalian Reproduction: An Ecological Perspective 1. **Biology of Reproduction**, [S. l.], 1985. DOI: 10.1095/biolreprod32.1.1.

BRONSON, F. H. Mammalian reproductive strategies: Genes, photoperiod and latitude. **Reproduction Nutrition Developpement**, [S. l.], v. 28, n. 2 B, p. 335–347, 1988. DOI: 10.1051/rnd:19880301.

BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 776–786, 1994. DOI: 10.1095/biolreprod51.4.776. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod51.4.776>.

BROWN, R. D.; COWAN, R. L.; KAVANAUGH, J. F. Effect of pinealectomy on seasonal androgen titers, antler growth and feed intake in white-tailed deer. **Journal of Animal Science**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 435–440, 1978.

BUBENIK, G. A. Shift of seasonal cycle in white-tailed deer by oral administration of melatonin. **Journal of Experimental Zoology**, [S. l.], v. 225, n. 1, p. 155–156, 1983. DOI: 10.1002/jez.1402250119.

BUBENIK, G. A. Regulation of seasonal endocrine rhythms in male boreal cervids. In: ASSENMACHER, I.; BOISSIN, J. (org.). **Endocrine Regulation as Adaptive Mechanisms IO the Environment**. France. p. 461–474.

BUBENIK, G. A. Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. **NeuroSignals**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 350–366, 2001. DOI: 10.1159/000046903. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11721091>. Acesso em: 17 mar. 2020.

BUBENIK, G. A. Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle—a review. **Veterinarski Arhiv**, [S. l.], v. 76, p. 275–285, 2006. Disponível em: <http://www.vef.hr/vetarhiv/papers/2006-76-7-30.pdf>.

BUBENIK, G. A.; BROWN, R. D.; SCHAMS, D. Antler cycle and endocrine parameters in male axis deer (*Axis axis*): Seasonal levels of LH, FSH, testosterone, and prolactin and results of GnRH and ACTH challenge tests. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, [S. l.], v. 99, n. 4, p. 645–650, 1991. DOI: 10.1016/0300-9629(91)90144-2.

BUBENIK, G. A.; BUBENIK, A. B.; FRANK, A. Außersaisonale Brunft beim Edelhirsch (*Cervus elaphus maral*). **Zeitschrift für Jagdwissenschaft**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 129–133, 1985. DOI: 10.1007/BF02265741.

BUBENIK, G. A.; MORRIS, J. M.; SCHAMS, D.; CLAUS, A. Photoperiodicity and circannual levels of LH, FSH, and testosterone in normal and castrated male, white-tailed deer. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 60, n. 6, p. 788–793, 1982. DOI: 10.1139/y82-110.

BUBENIK, G. A.; REYES, E.; SCHAMS, D.; LOBOS, A.; BARTOŠ, L. Seasonal levels of LH, FSH, testosterone and prolactin in adult male pudu (*Pudu pudu*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, [S. l.], n. 4, p. 417–420, 1996. DOI: 10.1016/S0305-0491(96)00163-0.

BUBENIK, G. A.; REYES, E.; SCHAMS, D.; LOBOS, A.; BARTOŠ, L. Pudú, the smallest deer of the world: 10 years of endocrine studies of Southern pudu (*Pudu pudu*) in Chile. **European Journal of Wildlife Research**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 129–138, 2000.

BUBENIK, G. A.; REYES, E.; SCHAMS, D.; LOBOS, A.; BARTOŠ, L.; KOERNER, F. Effect of antiandrogen cyproterone acetate on the development of the antler cycle in Southern pudu (*Pudu pudu*). **Journal of Experimental Zoology**, [S. l.], v. 292, n. 4, p. 393–401, 2002. DOI: 10.1002/jez.10046.

BUBENIK, G. A.; SMITH, P. S. Circadian and circannual rhythms of melatonin in plasma of male white-tailed deer and the effect of oral administration of melatonin. **Journal of Experimental Zoology**, [S. l.], v. 241, n. 1, p. 81–89, 1987. DOI: 10.1002/jez.1402410110.

BUBENIK, G. A.; SMITH, P. S.; SCHAMS, D. The effect of orally administered melatonin on the seasonality of deer pelage exchange, antler development, LH, FSH, Prolactin, Testosterone, T3, T4, Cortisol, and Alkaline Phosphatase. **Journal of Pineal Research**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 331–349, 1986. DOI: 10.1111/j.1600-079X.1986.tb00756.x.

CAJOCHEN, C.; MÜNCH, M.; KOBIALKA, S.; KRÄUCHI, K.; STEINER, R.; OELHAFEN, P.; ORGÜL, S.; WIRZ-JUSTICE, A. High sensitivity of human melatonin, alertness, thermoregulation, and heart rate to short wavelength light. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 1311–1316, 2005. DOI: 10.1210/jc.2004-0957.

CARDINALI, D. P.; PÉVET, P. Basic aspects of melatonin action. **Sleep Medicine Reviews**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 175–190, 1998. DOI: 10.1016/S1087-0792(98)90020-X.

CARTER, D. S.; GOLDMAN, B. D. Progonadal Role of the Pineal in the Djungarian Hamster (*Phodopus sungorus sungorus*): Mediation by Melatonin*. **Endocrinology**, [S. l.], v. 113, n. 4, p. 1268–1273, 1983. a. DOI: 10.1210/endo-113-4-1268. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-113-4-1268>. Acesso em: 19 mar. 2020.

CARTER, D. S.; GOLDMAN, B. D. Antigonadal Effects of Timed Melatonin Infusion in Pinelectomized Male Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): Duration is the Critical Parameter*. **Endocrinology**, [S. l.], v. 113, n. 4, p. 1261–1267, 1983. b. DOI: 10.1210/endo-113-4-1261. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-113-4-1261>. Acesso em: 19 mar. 2020.

CHALIVOIX, S.; BAGNOLINI, A.; CARATY, A.; COGNIÉ, J.; MALPAUX, B.; DUFOURNY, L. Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 110–118, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2009.01939.x.

CHAPMAN, D. I.; CHAPMAN, Norma G. The antler cycle of adult reeves' muntjac. **Acta Theriologica**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 107–114, 1982. DOI: 10.4098/AT.arch.82-8. Disponível em: <http://rcin.org.pl/ibs/dlibra/docmetadata?id=11020&from=publication>.

CHAPMAN, N. G.; HARRIS, S. Evidence that the seasonal antler cycle of adult Reeves' muntjac (*Muntiacus reevesi*) is not associated with reproductive quiescence. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 92, n. 2, p. 361–369, 1991. DOI: 10.1530/jrf.0.0920361. Disponível em: <http://www.reproduction-online.org/content/92/2/361.abstract>.

COLLEDGE, W. H. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 115–121, 2009. DOI: 10.1016/j.tem.2008.10.005.

CONTRERAS-MORENO, F. M.; HIDALGO-MIHART, M. G.; JESUS-DE LA CRUZ, A.; JUÁREZ-LÓPEZ, R.; BRAVATA-DE LA CRUZ, Y.; CHAHÍN-PERDOMO, A. Seasonal antler cycle in white-tailed deer in Campeche wetlands in Southeastern Mexico. **European Journal of Wildlife Research**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1007/s10344-019-1291-5.

CONTRERAS-VERTERAMO, C. A.; GALLINA-TESSARO, S. A.; ALVARADO-SÁNCHEZ, B.; RANGEL-LUCIO, J. A. Patrón reproductivo de los machos de venado cola blanca en la región Huasteca de los Estados de Veracruz y San Luis Potosí. In: XXXIII SIMPOSIO SOBRE FAUNA SILVESTRE 2016, Mexico. **Anais [...]**. Mexico

CONTRERAS, J.; LISSE, T.; BOUZIDI, C.; CAVANAUGH, A.; MATYNIA, A.; RIEGER, S. Short-wavelength violet light (420nm) stimulates melanopsin-dependent acute alertness responses in zebrafish. **bioRxiv**, [S. l.], p. 1–42, 2019. DOI: 10.1101/825257.

CZEISLER, C. A. et al. Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. **Science**, [S. l.], v. 284, n. 5423, p. 2177–2181, 1999. DOI: 10.1126/science.284.5423.2177.

DARDENTE, H. Does a melatonin-dependent circadian oscillator in the pars tuberalis drive prolactin seasonal rhythmicity? **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 657–666, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2007.01564.x.

DE TASSIGNY, X. D.; COLLEDGE, W. H. The role of Kisspeptin signaling in reproduction. **Physiology**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 207–217, 2010. DOI: 10.1152/physiol.00009.2010.

DESROZIER, E.; MIKKELSEN, J.; SIMONNEAUX, V.; KELLER, M.; TILLET, Y.; CARATY, A.; FRANCESCHINI, I. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 1101–1112, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2010.02053.x.

DINERSTEIN, E. An ecological survey of the Royal Karnali-Bardia Wildlife Reserve, Nepal. Part III: Ungulate populations. **Biological Conservation**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 5–37, 1980. DOI: 10.1016/0006-3207(80)90063-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006320780900634>. Acesso em: 31 mar. 2020.

DO AMARAL, F. G.; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 472–479, 2018. DOI: 10.20945/2359-3997000000066.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação dos cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: Funep, 1996.

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Tecnologia para a propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção. In: DUARTE, J. M. B. (org.). **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal: Funep, 1997. p. 228–238.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 17–22, 2008. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.07.009.

DUARTE, J. M. B.; TALARICO, A. C.; VOGLIOTTI, A.; GARCIA, J. E.; OLIVEIRA, M. L.; MALDONADO, J. E.; GONZÁLEZ, S. Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama bororo*. **Oryx**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 656–664, 2016. DOI: 10.1017/S0030605316000405.

DUARTE, J. M. B.; VOGLIOTTI, A.; ZANETTI, E. S.; DE OLIVEIRA, L. M.; TIEPOLO, L. M.; RODRIGUES, L. F.; DE ALMEIDA, L. B. **Avaliação do risco de extinção do Veado-catingueiro) Mazama gouazoubira Avaliação do Estado de Conservação dos Ungulados**. Jaboticabal.

DUPRÉ, S. M. et al. Identification of melatonin-regulated genes in the ovine pituitary pars tuberalis, a target site for seasonal hormone control. **Endocrinology**, [S. l.], v. 149, n. 11, p. 5527–5539, 2008. DOI: 10.1210/en.2008-0834.

DUPRÉ, S. M. et al. The identification of a conserved Eya3 signal and prolactin-releasing factors in the long day response of a seasonal mammal. **Current biology : CB**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 829–835, 2010. DOI: 10.1016/j.cub.2010.02.066.The.

FERREGUETTI, A. C.; TOMÁS, W. M.; BERGALLO, H. G. Density, occupancy, and activity pattern of two sympatric deer (*Mazama*) in the Atlantic Forest, Brazil. **Journal of Mammalogy**, [S. l.], v. 96, n. 6, p. 1245–1254, 2015. DOI: 10.1093/jmammal/gyv132.

FITZGERALD, K. T. The structure and function of the pars tuberalis of the vertebrate adenohypophysis. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 383–399, 1979. DOI: 10.1016/0016-6480(79)90012-1.

FRÄDRICH, H. Beobachtungen am Pampashirsch. ceitalic *Blastoceros bezoarticus/ceitalic* L 1758. **Zoological Garten**, [S. l.], v. 51, p. 7–32, 1981.

FRÄDRICH, H. The husbandry of tropical and temperate cervids in the West Berlin zoo. In: WEMMER, C. (org.). **Biology and Management of the Cervidae**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 422–428.

FRENCH, C. E.; MCEWEN, L. C.; MAGRUDER, N. D.; INGRAM, R. H.; SWIFT, R. W. Nutrient Requirements for Growth and Antler Development in the White-Tailed Deer. **The Journal of Wildlife Management**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 221–232, 1956. DOI: 10.2307/3796954.

FULLER, T. K.; SILVA, A. M.; MONTALVO, V. H.; SÁENZ-BOLAÑOS, C.; CARRILLO J, E. Reproduction of white-tailed deer in a seasonally dry tropical forest of Costa Rica: a test of aseasonality. **Journal of Mammalogy**, [S. l.], n. X, p. 1–7, 2019. DOI: 10.1093/jmammal/gyz173.

GALINDO-LEAL, C.; WEBER, M. **El venado de la Sierra Madre Occidental – ecología, manejo y conservación**. Mexico: Ediciones Culturales, SA, 1998.

GALINDO, D.; SPONTON, L. D.; ROLDAN, M.; SANDOVAL, E.; DUARTE, J. M. B. Fecal androgen metabolites and antler cycle annual variations of captive Brazilian dwarf brocket deer (*Mazama nana*) and Amazonian brown brocket deer (*Mazama nemorivaga*) in southeast Brazil. **ASPRA - VII Congress. SPERMOVA**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 66, 2019.

GALLINA-TESSARO, S.; LÓPEZ-TELLO, E.; MANDUJANO, S. Recent studies of White-tailed deer in the Neotropics. In: GALLINA-TESSARO, S. A. (org.). **Ecology and Conservation of Tropical Ungulates in Latin America**. [s.l.] : Springer, 2019. p. 371–393. DOI: 10.1007/978-3-030-28868-6.

GALLINA, S. O.; MANDUJANO, S. A.; BELLO, J. O.; LÓPEZ-ARÉVALO, H. F.; WEBER, M. A. White-tailed deer *Odocoileus virginianus* (Zimmermann 1780). In: **Neotropical Cervidology**. [s.l.: s.n.]. p. 101–118.

GAYOT, M.; HENRY, O.; DUBOST, G.; SABATIER, D. Comparative diet of the two forest cervids of the genus *Mazama* in French Guiana. **Journal of Tropical Ecology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 31–43, 2004. DOI: 10.1017/S0266467404006157.

GEIST, V. **Deer of the World: Their Evolution, Behaviour, and Ecology** . 1. ed. Mechanicsburg: Stackpole Books, 1998. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=bcWZX-IMEVkc&pg=PA55&lpg=PA55&dq=geist+hog+deer&source=bl&ots=TMLSPGcvDG&sig=ACfU3U2Kh8vuWJPPNF2I_nO4yWVqbVileQ&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwjYys7b1cToAhURlrkGHS4JBhAQ6AEwEnoECAgQAQ#v=onepage&q=geist_hog_deer&f=false. Acesso em: 31 mar. 2020.

GOLDMAN, B. D. **Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement** *Journal of Biological Rhythms*, 2001. DOI: 10.1177/074873001129001980.

GOODMAN, R. L.; LEHMAN, M. N. Kisspeptin neurons from mice to men: Similarities and differences. **Endocrinology**, [S. l.], v. 153, n. 11, p. 5105–5118, 2012. DOI: 10.1210/en.2012-1550.

GOSS, R. J. The deciduous nature of deer antlers. *In: Mechanisms of hard tissue destruction*. [s.l: s.n.]. p. 339–369.

GOSS, R. J. Photoperiodic control of antler cycles in deer. II. Alterations in amplitude. **Journal of Experimental Zoology**, [S. l.], v. 171, n. 2, p. 223–234, 1969. a. DOI: 10.1002/jez.1401710210.

GOSS, R. J. Photoperiodic control of antler cycles in deer. I. Phase shift and frequency changes. **Journal of Experimental Zoology**, [S. l.], v. 170, n. 3, p. 311–324, 1969. b. DOI: 10.1002/jez.1401700308.

GOSS, R. J. Problems in antlerogenesis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, [S. l.], v. 69, p. 227–238, 1970.

GOSS, R. J. **Deer Antlers: Regeneration, Function and Evolution**. Nova Iorque: Academic Press, 1983.

GOTTSCH, M. L.; CUNNINGHAM, M. J.; SMITH, J. T.; POPA, S. M.; ACOHIDO, B. V.; CROWLEY, W. F.; SEMINARA, S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. A Role for Kisspeptins in the Regulation of Gonadotropin Secretion in the Mouse. **Endocrinology**, [S. l.], v. 145, n. 9, p. 4073–4077, 2004. DOI: 10.1210/en.2004-0431. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2004-0431>. Acesso em: 24 mar. 2020.

GRUBAUGH, W.; SHARP, D. C.; BERGLUND, L. A.; MCDOWELL, K. J.; KILMER, D. M.; PECK, L. S.; SEAMANS, K. W. Effects of pinealectomy in Pony mares. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, [S. l.], v. 32, p. 293–5, 1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6962863>. Acesso em: 20 mar. 2020.

GUERRA, M.; BLÁZQUEZ, J. L.; PERUZZO, B.; PELÁEZ, B.; RODRÍGUEZ, S.; TORANZO, D.; PASTOR, F.; RODRÍGUEZ, E. M. Cell organization of the rat pars tuberalis. Evidence for open communication between pars tuberalis cells, cerebrospinal fluid and tanycytes. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 339, n. 2, p. 359–381, 2010. DOI: 10.1007/s00441-009-0885-8.

HAZLERIGG, D. G.; ANDERSSON, H.; JOHNSTON, J. D.; LINCOLN, G. Molecular Characterization of the Long-Day Response in the Soay Sheep, a Seasonal Mammal. **Current Biology**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 334–339, 2004. DOI: 10.1016/j.cub.2004.01.057.

HAZLERIGG, D. G.; HASTINGS, M. H.; MORGAN, P. J. Production of a prolactin releasing factor by the ovine pars tuberalis. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 489–492, 1996. DOI: 10.1046/j.1365-2826.1996.04971.x.

HERBISON, Al E. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). **Brain Research Reviews**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 277–287, 2008. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.006. Estrogen.

HINEY, J. K.; SRIVASTAVA, V. K.; LES DEES, W. Insulin-like growth factor-1 stimulation of hypothalamic KiSS-1 gene expression is mediated by Akt: Effect of alcohol. **Neuroscience**, [S. l.], v. 166, n. 2, p. 625–632, 2010. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.12.030. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.030>.

- HINEY, J. K.; SRIVASTAVA, V. K.; PINE, M. D.; DEES, W. L. Insulin-Like Growth Factor-I activates KiSS-1 Gene expression in the brain of the prepubertal female rat. **Reproduction Development**, [S. l.], v. 150, p. 376–384, 2009.
- HURTADO-GONZALES, J. L.; BODMER, R. E. Reproductive biology of female Amazonian brocket deer in northeastern Peru. **European Journal of Wildlife Research**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 171–177, 2006. DOI: 10.1007/s10344-006-0034-6.
- JACKSON, J. E.; LANGGUTH, A. Ecology and status of the pampas deer in the Argentinian Pampas and Uruguay. In: WEMMER, C. (org.). **Biology and management of the Cervidae**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 402–409.
- JACZEWSKI, Z. The effect of changes in length of daylight on the growth of antlers in deer (*Cervus elaphus* L.). **Folia Biology**, [S. l.], p. 133–143, 1954.
- JANZEN, D. H. **Costa Rican natural history**. [s.l.] : University of Chicago Press, 1983.
- JULIÁ, J. P.; PERIS, S. J. Do precipitation and food affect the reproduction of brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (G. Fischer 1814) in conditions of semi-captivity? **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, [S. l.], v. 82, n. 3, p. 629–635, 2010. DOI: 10.1590/S0001-37652010000300010.
- KALSBECK, A.; PERREAU-LENZ, S.; BUIJS, R. M. A NETWORK OF (AUTONOMIC) CLOCK OUTPUTS. **Chronobiology International**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 521–535, 2006. DOI: 10.1080/07420520600651073.
- KARSCH, F. J.; BITTMAN, E. L.; FOSTER, D. L.; GOODMAN, R. L.; LEGAN, S. J.; ROBINSON, J. E. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. **Recent Progress in Hormone Research**, [S. l.], v. 40, p. 185–232, 1984. DOI: 10.1016/b978-0-12-571140-1.50010-4.
- KARSCH, J. Nightly Duration of Pineal Response Melatonin Secretion Determines the Reproductive Downloaded from <https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/30/3/585/2766638> by North Dakota State University user on 19 September 2019 to Inhibitory Length in th. [S. l.], p. 585–593, 1984.
- KENNAWAY, D. J.; GILMORE, T. A.; SEAMARK, R. F. Effect of Melatonin Feeding on Serum Prolactin and Gonadotropin Levels and the Onset of Seasonal Estrous Cyclicity in Sheep. **Endocrinology**, [S. l.], v. 110, n. 5, p. 1766–1772, 1982. DOI: 10.1210/endo-110-5-1766. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-110-5-1766>. Acesso em: 20 mar. 2020.
- KLEIN, D. C.; WELLER, J. L. Indole metabolism in the pineal gland: A circadian rhythm in N-acetyltransferase. **Science**, [S. l.], v. 169, n. 3950, p. 1093–1095, 1970. DOI: 10.1126/science.169.3950.1093.
- KLEIN, D. C.; WELLER, J. L.; MOORE, R. Y. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 68, n. 12, p. 3107–3110, 1971. DOI: 10.1073/pnas.68.12.3107.
- KLEIN, E. H. Phenology of Breeding and Antler Growth in White-Tailed Deer in Honduras. **The Journal of Wildlife Management**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 826, 1982. DOI: 10.2307/3808584.
- KOZIOŁ, K.; BRODA, D.; ROMEROWICZ-MISIELAK, M.; NOWAK, S.; KOZIOROWSKI, M. Melatonin concentration in peripheral blood and melatonin receptors (MT1 and MT2) in the testis and epididymis of male roe deer during active spermatogenesis. **Theriogenology**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.03.025. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X20301916>. Acesso em: 24 mar. 2020.
- LEEUEWENBERGER, F.; OLIVEIRA-CABRAL, I.; LARA-RESENDE, S. **Gray brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the Brazilian savanna**. IUCN Deer Specialist Group News, , 1999.
- LEGAN, S. J.; KARSCH, F. J. Importance of Retinal Photoreceptors to the Photoperiodic Control of Seasonal Breeding in the Ewe 2. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 316–325, 1983. DOI: 10.1095/biolreprod29.2.316.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 80, n. 10, p. 2587, 1958. DOI: 10.1021/ja01543a060.

LI, Q.; ROA, A.; CLARKE, I. J.; SMITH, J. T. Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: Possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor. **Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 96, n. 3, p. 212–221, 2012. DOI: 10.1159/000335998.

LIN, C. C.; PEI, K. J. C.; WANG, P. S.; LIU, B. T. Evidence of higher levels of testosterone during the velvet period in muntjac than in other cervids. **Theriogenology**, [S. l.], v. 81, n. 3, p. 403–406, 2014. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.10.011.

LINCOLN, G. A. Growth in red deer stags. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 71, p. 7–15, 1984.

LINCOLN, G. A. Seasonal breeding in deer. In: FENNESSY, P. F.; DREW, K. R. (org.). **Biology of Deer Production**. Wellington: Royal Society of New Zealand Wellington Bulletin, 1985. p. 165–179.

LINCOLN, G. A. Seasonal cycles in testicular activity in Mouflon, Soay sheep and domesticated breeds of sheep: breeding seasons modified by domestication. **Zoological Journal of the Linnean Society**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 137–147, 1989. DOI: 10.1111/j.1096-3642.1989.tb02307.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/zoolinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1096-3642.1989.tb02307.x>. Acesso em: 20 mar. 2020.

LINCOLN, G. A. Advances in pineal research: photoperiod, pineal and seasonality in large mammals. In: ARENDT, J. (org.). **Advances in Pineal Research**. Londres: John Libbey, 1991. p. 211–218.

LINCOLN, G. A. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay. **Science**, [S. l.], v. 28, p. 203–217, 1992. a.

LINCOLN, G. A. Biology of Seasonal Breeding in Deer. In: BROWN, R. D. (org.). **The Biology of Deer**. New York: Springer, 1992. b. v. 30p. 565–574. DOI: 10.1007/978-1-4612-2782-3_131. Disponível em: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-2782-3_131 http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-2782-3_131#page-1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/690> http://link.springer.com/10.1007/978-1-4612-2782-3_131.

LINCOLN, G. A.; CLARKE, I. J. Photoperiodically-Induced Cycles in the Secretion of Prolactin in Hypothalamo-Pituitary Disconnected Rams: Evidence for Translation of the Melatonin Signal in the Pituitary Gland. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 251–260, 1994. DOI: 10.1111/j.1365-2826.1994.tb00580.x.

LINCOLN, G. A.; EBLING, F. J. P. Effect of constant-release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 241–253, 1985. DOI: 10.1530/jrf.0.0730241.

LINCOLN, G. A.; FRASER, H. M.; FLETCHER, T. J. Induction of early rutting in male red deer (*Cervus elaphus*) by melatonin and its dependence on LHRH. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 339–343, 1984. DOI: 10.1530/jrf.0.0720339.

LINCOLN, G. A.; SHORT, R. V. **Seasonal breeding: nature's contraceptive**. [s.l.] : Academic Press, INC., 1980. v. 36 DOI: 10.1016/b978-0-12-571136-4.50007-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-571136-4.50007-3>.

LINCOLN, G. A.; TYLER, N. J. C. Role of gonadal hormones in the regulation of the seasonal antler cycle in female reindeer, *Rangifer tarandus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 129–138, 1994. DOI: 10.1530/jrf.0.1150167.

LINCOLN, G.; MESSENGER, S.; ANDERSSON, H.; HAZLERIGG, D. Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: Evidence for an internal coincidence timer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 99, n. 21, p. 13890–13895, 2002. DOI: 10.1073/pnas.212517599.

LOPONTE, D.; CORRIALE, M. J. Patterns of Resource Use and Isotopic Niche Overlap Among Guanaco (*Lama guanicoe*), Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*) and Marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*) in the Pampas. Ecological, Paleoenvironmental and Archaeological Implications. **Journal Environmental Archaeology**, [S. l.], p. 1–34, 2019. DOI: 10.1080/14614103.2019.1585646. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=yenv20>. Acesso em: 8 abr. 2020.

LOUDON, A. S.; CURLEWIS, J. D. Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (*Axis axis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 729–38, 1988. DOI: 10.1530/jrf.0.0830729. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3411563>.

LOUDON, A. S. I. Photoperiod and the regulation of annual and circannual cycles of food intake. **Proceedings of the Nutrition Society**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 495–507, 1994. DOI: 10.1079/pns19940060.

LOUDON, A. S. I.; BRINKLOW, B. R. Reproduction in Deer: Adaptations for Life in Seasonal Environments. In: **The Biology of Deer**. [s.l.] : Springer New York, 1992. p. 261–278. DOI: 10.1007/978-1-4612-2782-3_61.

LYNCH, G. R.; WHITE, S. E.; GRUNDEL, R.; BERGER, M. S. Effects of photoperiod, melatonin administration and thyroid block on spontaneous daily torpor and temperature regulation in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. **Journal of Comparative Physiology B**, [S. l.], v. 125, n. 2, p. 157–163, 1978. DOI: 10.1007/BF00686752.

MACDONALD-BEYERS, K.; LABISKY, R. F. Influence of flood waters on survival, reproduction, and habitat use of white-tailed deer in the Florida Everglades. **Wetlands**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 659–666, 2005. DOI: 10.1672/0277-5212(2005)025[0659:IOFWOS]2.0.CO;2.

MACNAMARA, M.; ELDRIDGE, W. Behavior and reproduction captive pudu (*Pudu puda*) and red brocket (*Mazama americana*), a descriptive and comparative analysis. In: WEMMER, C. (org.). **Biology and Management of the Cervidae**. Washington DC: Smithsonian Institution, 1987. p. 371–386.

MALPAUX, B.; THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. **Reproduction Nutrition Development**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 355–366, 1999. DOI: 10.1051/rnd:19990308.

MALPAUX, B.; VIGUÉ, C.; SKINNER, D. C.; THIÉRY, J. C.; PELLETIER, J.; CHEMINEAU, P. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 42, n. 1–4, p. 109–117, 1996. DOI: 10.1016/0378-4320(96)01505-9.

MAYOR, P.; BODMER, R. E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-PLANA, C. Reproductive biology of the wild red brocket deer (*Mazama americana*) female in the Peruvian Amazon. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 128, n. 1–4, p. 123–128, 2011. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2011.09.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.09.009>.

MAZUR, P. E. **Seasonal plasma androgen level and its relation to antler growth and seasonal feed consumption in male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)**. 1973. The Pennsylvania University, [S. l.], 1973.

MCMILLIN, J. M.; SEAL, U. S.; KEENLYNE, K. D.; ERICKSON, A. W.; JONES, J. E. Annual testosterone rhythm in the adult white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*). **Endocrinology**, [S. l.], v. 94, n. 4, p. 1034–1040, 1974. DOI: 10.1210/endo-94-4-1034.

MERINO, M. L.; GONZALES, S.; LEEYWENBERG, F.; RODRIGUES, F. H. G.; PINDER, L.; TÓMAS, W. M. Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*). In: DUARTE, J. M. B. (org.). **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, 1997. p. 42–58.

MERKT, J. R. Reproductive seasonability and grouping patterns of the north andean deer or taruca *Hippocamelus antisensis* in southern Peru. In: WEMMER, C. (org.). **Biology and Management of the Cervidae**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 288–401.

MIDDLETON, B.; ARENDT, J.; STONE, B. M. Human circadian rhythms in constant dim light (8 lux) with knowledge of clock time. **Journal of Sleep Research**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 69–76, 1996. DOI: 10.1046/j.1365-2869.1996.d01-67.x.

MIRARCHI, R. E.; SCANLON, P. F.; KIRKPATRICK, R. L. Annual changes in spermatozoan production and associated organs of white-tailed deer. **The Journal of Wildlife Management**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 92–99, 1977.

MISHRA, H. J.; WEMMER, C. **Biology and management of the cervidae**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1987.

MONFORT, S. L.; BROWN, J. L.; BUSH, M.; WOOD, T. C.; WEMMER, C.; VARGAS, A.; WILLIAMSON, L. R.; MONTALI, R. J.; WILDT, D. E. Circannual inter-relationships among reproductive hormones, gross morphometry, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 98, p. 471–480, 1993.

MONFORT, S. L.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Episodic and seasonal rhythms of cortisol secretion in male Eld's deer (*Cervus eldi thamin*). **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 138, p. 41–49, 1993. DOI: 10.1677/joe.0.1380041.

MONFORT, S. L.; MARTINET, C.; WILDT, D. E. Urinary steroid metabolite profiles in female David's Deer (*Elaphurus davidianus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 78–85, 1991. a. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/pdf/20095121.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2020.

MONFORT, S. L.; MARTINET, C.; WILDT, D. E. URINARY STEROID METABOLITE PROFILES IN FEMALE PÉRE DAVID'S DEER (*Elaphurus davidianus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 78–85, 1991. b. Disponível em: <https://about.jstor.org/terms>. Acesso em: 18 mar. 2020.

MOORE, R. Y. Neural control of the pineal gland. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 73, n. 1–2, p. 125–130, 1995. DOI: 10.1016/0166-4328(96)00083-6.

MORGAN, P. J. The pars tuberalis: The missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 287–295, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2826.2000.00459.x.

MUNRO, C. J.; MCNATTY, P.; RENSHAW, L. Cica-annual rhythms of prolactin secretion in ewes and the effect of pinealectomy. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 84, p. 83–89, 1979.

MYLREA, G. E. **Natural and artificial breeding of farmed chital deer (*Axis axis*) in Australia**. 1992. University of Sydney, [S. l.], 1992.

NAKANE, Y.; YOSHIMURA, T. Universality and diversity in the signal transduction pathway that regulates seasonal reproduction in vertebrates. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 8, p. 1–7, 2014. DOI: 10.3389/fnins.2014.00115.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.1.1.

OGAWA, S.; PARHAR, I. S. Anatomy of the kisspeptin systems in teleosts. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 181, n. 1, p. 169–174, 2013. DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.08.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.08.023>.

PEI, J. C. K.; FORESMAN, K.; LIU, B. T.; HONG, L. H.; YU, J. Y. L. Testosterone Levels in Male Formosan Reeves' Muntjac: Uncoupling of the Reproductive and Antler Cycles. **Zoological Studies**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 120–124, 2009. Disponível em: <http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/48.1/120.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2020.

PEI, K.; TABER, R. D.; O'GARA, B. W.; WANG, Y. Breeding Cycle of the Formosan Reeves' Muntjac (*Muntiacus Reevesi* Micrurus) in northern taiwan, republic of china. **Mammalia**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 223–228, 1995. DOI: 10.1515/mamm.1995.59.2.223.

PEREIRA, R. J. G. Male reproduction. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. (org.). **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: Funep, 2010. p. 39–50.

PEREIRA, R. J. G.; CRIVELARO, R. M.; TANAKA, Y.; BLANK, M. H.; DUARTE, J. M. B. Asynchronous breeding in red brocket deer (*Mazama americana*) – Seasonal changes in male reproductive characteristics, seminal parameters, androgen levels and antler cycle. **Mammalian Biology**, [S. l.], 2020.

PEREIRA, R. J. G.; DUARTE, J. M. B.; NEGRÃO, J. A. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). **Theriogenology**, [S. l.], v. 63, n. 8, p. 2113–2125, 2005. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.014. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Jose_Duarte4/publication/7909708_Seasonal_changes_in_fecal_testosterone_concentrations_and_their_relationship_to_the_reproductive_behavior_antler_cycle_and_grouping_patterns_in_free-ranging_male_Pampas_deer_Ozotoceros_. Acesso em: 17 mar. 2020.

PEREIRA, R. J. G.; POLEGATO, B. F.; DE SOUZA, S.; NEGRÃO, J. A.; DUARTE, J. M. B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 387–399, 2006. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.02.019.

PEREIRA, R. J. G.; ZANETTI, E. S.; POLEGATO, B. F. Female Reproduction. In: DUARTE, J. M. B.; GONZALES, S. (org.). **Neotropical Cervidology**. Jaboticabal: FUNEP - IUCN, 2010. p. 45–57. DOI: 10.1016/B978-1-4377-0660-4.00040-5.

PINDER, L. Comportamento social e reprodutivos dos veados campeiro e catingueiro. In: CONGRESSO DE ETOLOGIA 1992, **Anais [...]**. : Anais do X Encontro Anual de Etologia, 1992. p. 167–173. Disponível em: <http://www.etologiabrasil.org.br/media/upload/eae/anais-1992.PDF>.

PINDER, L. **Niche overlap among brown brocket deer, pampas deer and cattle in the Pantanal of Brazil**. 1997. University of Florida, [S. l.], 1997.

PINDER, L.; LEEUWENBERGER, F. Veado-catingueiro. In: DUARTE, J. M. B. (org.). **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, 1997. p. 60–68.

RAMOS, H. G. C. C. O ciclo do chifre do cervo-do-pantanal: aspectos ecológicos e reprodutivos. [S. l.], p. 101, 2004.

REDFORD, K. H. **Biology and management of the Cervidae**. Washington DC.

REITER, R. J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 109–131, 1980. DOI: 10.1210/edrv-1-2-109.

REITER, R. J. Signal transduction mechanisms related to melatonin synthesis in the mammalian pineal gland. In: REITER, R. J.; LUKASZYK, A. (org.). **Advances in Pienal Research**. 4. ed. Londres: John Libbey, 1990. p. 27.

REITER, R. J. Melatonin: The chemical expression of darkness. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 79, p. C153–C158, 1991. DOI: 10.1016/0303-7207(91)90087-9.

REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**, [S. l.], v. 49, n. 8, p. 654–664, 1993. DOI: 10.1007/BF01923947. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF01923947>. Acesso em: 23 mar. 2020.

REITER, R. J.; MA, Q.; SHARMA, R. Melatonin in mitochondria: Mitigating clear and present dangers. **Physiology**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 86–95, 2020. DOI: 10.1152/physiol.00034.2019.

REITER, R. J.; RICHARDSON, B. A.; MATTHEWS, S. A.; LANE, S. J.; FERGUSON, B. N. Rhythms in immunoreactive melatonin in the retina and harderian gland of rats: Persistence after pinealectomy. **Life Sciences**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 1229–1236, 1983. DOI: 10.1016/0024-3205(83)90192-3.

REVEL, F. G.; MASSON-PÉVET, M.; PÉVET, P.; MIKKELSEN, J. D.; SIMONNEAUX, V. Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. **Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 1–14, 2009. DOI: 10.1159/000219588.

REYES, E.; BUBENIK, G. A.; SCHAMS, D.; LOBOS, A.; ENRIQUEZ, R. Seasonal changes of testicular parameters in southern pudu *Pudu pudu* in relationship to circannual variation of its reproductive hormones. **Acta Theriologica**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 25–35, 1997. DOI: 10.4098/AT.arch.97-4.

RITTER, P. et al. Melatonin suppression by melanopsin-weighted light in patients with bipolar i disorder compared to healthy controls. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 79–87, 2020. DOI: 10.1503/jpn.190005.

RODRIGUES, F. H. G. **Historia natural e biologia comportamental do veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) em cerrado do Brasil Central**. 1996. [s.n.], Campinas, 1996.

RODRÍGUEZ, M.; SOLÍS, V. Ciclo reproductivo del venado cola blanca en la Isla San Lucas, Costa Rica. In: SOLIS, V.; RODRÍGUEZ, M.; VAUGHAN, C. (org.). **Actas del primer taller nacional sobre el venado cola blanca a (*Odocoileus virginianus*) del Pacífico seco**. Heredia: Universidad Nacional, 1987. p. 31–32.

RODRÍGUEZ, M.; SOLÍS, V. Ciclo de vida del venado cola blanca en la Isla San Lucas, Costa Rica. In: VAUGHAN, C.; RODRÍGUEZ, M. S. (org.). **Ecología y manejo del venado cola blanca en México y Costa Rica**. Heredia: Editorial de la Universidad Nacional, 1994. p. 63–71.

ROJAS, M.; VENEGAS, F.; MONTIEL, E.; SERVELY, J. L.; VIGNON, X.; GUILLOMOT, M. Attempts at Applying Cloning to the Conservation of Species in Danger of Extinction. **International Journal of Morphology**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 329–336, 2005. DOI: 10.4067/s0717-95022005000400008.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de *Mazama ranfinesque*, 1817 do Brasil (*Artiodactyla, Cervidae*)**. 2000. Univesity of São Paulo, [S. l.], 2000.

SAVANTH, V. V; SASEENDRAN, P. C. Impact of testosterone on the antler stages in sambar deer (*Rusa unicolor*) stags. **Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 279–285, 2012.

SCHAMS, D.; BARTH, D. Annual profiles of reproductive hormones in peripheral plasma of the male roe deer (*Capreolus capreolus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 463–468, 1982. DOI: 10.1530/jrf.0.0660463. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6816927>.

SEMPÉRÉ, A. J. The Annual Antler Cycle of the European Roe Deer (*Capreolus capreolus*) in Relation to the Reproductive Cycle. In: **Horns, Pronghorns, and Antlers**. [s.l.] : Springer New York, 1990. p. 396–415. DOI: 10.1007/978-1-4613-8966-8_14.

SEMPÉRÉ, A. J.; MAUGET, R.; BUBENIK, G. A. Influence of photoperiod on the seasonal pattern of secretion of luteinizing hormone and testosterone and on the antler cycle in roe deer (*Capreolus capreolus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 95, n. 3, p. 693–700, 1992. DOI: 10.1530/jrf.0.0950693.

SIMONNEAUX, V. A Kiss to drive rhythms in reproduction. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 509–530, 2020. DOI: 10.1111/ejn.14287.

SIMONNEAUX, V.; ANSEL, L.; REVEL, F. G.; KLOSEN, P.; PÉVET, P.; MIKKELSEN, J. D. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. **Peptides**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 146–153, 2009. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.06.006.

SIMONNEAUX, V.; BUR, I.; ANCEL, C.; ANSEL, L.; KLOSEN, P. A kiss for daily and seasonal reproduction. **Progress in Brain Research**, [S. l.], v. 199, p. 423–437, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00024-1.

SMITH, J. T. et al. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: A novel medium for seasonal breeding in the sheep. **Endocrinology**, [S. l.], v. 149, n. 11, p. 5770–5782, 2008. DOI: 10.1210/en.2008-0581.

SMITH, J. T. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 75–84, 2012. DOI: 10.1016/j.domaniend.2011.11.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.11.003>.

SMITH, J. T.; CLAY, C. M.; CARATY, A.; CLARKE, I. J. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. **Endocrinology**, [S. l.], v. 148, n. 3, p. 1150–1157, 2007. DOI: 10.1210/en.2006-1435.

SNYDER, D. L.; COWAN, R. L.; HAGEN, D. R.; SCHANBACHER, B. D. Effect of pinealectomy on seasonal changes in antler growth and concentrations of testosterone and prolactin in White-tailed Deer. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 63–71, 1983. DOI: 10.1095/biolreprod29.1.63.

STALLINGS, J. R. Notes on the Reproductive Biology of the Grey Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*) in Paraguay. **Journal of Mammalogy**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 172–175, 1986. DOI: 10.2307/1381016.

SUTTIE, J. M.; KAY, R. N. B. Influence of plane of winter nutrition on plasma concentrations of prolactin and testosterone and their association with voluntary food intake in red deer stags (*Cervus elaphus*). **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 247–258, 1985. DOI: 10.1016/0378-4320(85)90030-2.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; QIN, L.; REITER, R. J. Melatonin: A mitochondrial targeting molecule involving mitochondrial protection and dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 17, n. 12, 2016. DOI: 10.3390/ijms17122124.

THIBAULT, C.; COUROT, M.; MARTINET, L.; MAULEON, P.; DU MESNIL DU BUISSON, F.; ORTAVANT, R.; PELLETIER, J.; SIGNORET, J. P. Regulation of breeding season and estrous cycles by light and external stimuli in some mammals. **Journal of Animal Science**, [S. l.], v. 25, p. 119–142, 1966. DOI: 10.2527/jas1966.25supplement119x.

THIELE, G.; HOLTORF, A.; STEINLECHNER, S.; REITER, R. J. The influence of different light irradiances on pineal N-acetyltransferase activity and melatonin levels in the cotton rat, *Sigmodon hispidus*. **Life Sciences**, [S. l.], v. 33, n. 16, p. 1543–1547, 1983. DOI: 10.1016/0024-3205(83)90694-X.

TOMÁS, W. M. Seasonality of the antler cycle of Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) from the Pantanal Wetland, Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 221–227, 1995. DOI: 10.1080/01650529509360960.

TOSINI, G.; MENAKER, M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. **Science**, [S. l.], v. 272, n. 5260, p. 419–421, 1996. DOI: 10.1126/science.272.5260.419.

UNFRIED, C.; ANSARI, N.; YASUO, S.; KORF, H. W.; VON GALL, C. Impact of melatonin and molecular clockwork components on the expression of thyrotropin β -chain (Tshb) and the Tsh receptor in the mouse pars tuberalis. **Endocrinology**, [S. l.], v. 150, n. 10, p. 4653–4662, 2009. DOI: 10.1210/en.2009-0609.

UNGERFELD, R.; DAMIÁN, J. P.; VILLAGRÁN, M.; GONZÁLEZ-PENSADO, S. X. Female effect on antlers of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Canadian Journal of Zoology**, [S. l.], v. 87, n. 8, p. 734–739, 2009. DOI: 10.1139/Z09-064.

UNGERFELD, R.; GONZÁLEZ-PENSADO, S.; BIELLI, A.; VILLAGRÁN, M.; OLAZABAL, D.; PÉREZ, W. Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): A review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 1–16, 2008. DOI: 10.1186/1751-0147-50-16.

VAN MOURIK, S.; STELMASIAK, T. Endocrine Mechanisms and Antler Cycles in Rusa Deer, *Cervus Rusa timorensis*. In: BUBENIK, G. A.; BUBENIK, A. (org.). **Horns, Pronghorns, and Antlers**. New York: Springer, 1990. p. 416–425.

VAN MOURIK, S.; STELMASIAK, T.; OUTCH, K. H. Seasonal variation in plasma testosterone, luteinizing hormone concentrations and LH-RH responsiveness in mature, male rusa deer (*Cervus rusa timorensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 347–351, 1986. DOI: 10.1016/0300-9629(86)90588-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0300962986905888>. Acesso em: 19 mar. 2020.

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**, [S. l.], v. 55, n. 5, p. 535–538, 2009. DOI: 10.1007/s10344-009-0278-z.

VIDAL, F.; SMITH-FLUECK, J. A. M.; FLUECK, W. T.; BARTOŠ, L. Variation in reproduction of a temperate deer, the southern pudu (*Pudu puda*). **Animal Production Science**, [S. l.], v. 52, n. 8, p. 735–740, 2012. DOI: 10.1071/AN11364.

VIGUIÉ, C.; THIBAUT, J.; THIÉRY, J. C.; TILLET, Y.; MALPAUX, B. Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: Temporal relationship to the changes in luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. **Endocrinology**, [S. l.], v. 138, n. 1, p. 499–506, 1997. DOI: 10.1210/endo.138.1.4865.

WAGNER, G. C.; JOHNSTON, J. D.; CLARKE, I. J.; LINCOLN, G. A.; HAZLERIGG, D. G. Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. **Endocrinology**, [S. l.], v. 149, n. 1, p. 32–39, 2008. DOI: 10.1210/en.2007-0658.

WAHYUNI, S.; GHOLIB, G.; ADNYANE, K. M.; AGIL, M.; HAMNY, H.; AGUNGPRIYONO, S.; YUSUF, T. L. Characterization of Seminiferous Epithelium Stages in the Wild Javan Muntjac (*Muntiacus muntjak muntjak*) Using the Tubular Morphology Method. **Veterinary Medicine International**, [S. l.], p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2018/3024532/>. Acesso em: 25 mar. 2020.

WAINWRIGHT, M. **The mammals of Costa Rica: a natural history and field guide**. New York: Cornell University Press, 2007.

WAYNE, N. L.; MALPAUX, B.; KARSCH, F. J. How does melatonin code for Day Length in the Ewe: Duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with a light-entrained sensitive Period? **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 39, p. 66–75, 1988. DOI: 10.1095/biolreprod39.1.66.

WEEMS, P.; SMITH, J.; CLARKE, I. J.; COOLEN, L. M.; GOODMAN, R. L.; LEHMAN, M. N. Effects of season and estradiol on KNDy neuron peptides, colocalization with D2 dopamine receptors, and dopaminergic inputs in the ewe. **Endocrinology**, [S. l.], v. 158, n. 4, p. 831–841, 2017. DOI: 10.1210/en.2016-1830.

WEEMS, P. W.; GOODMAN, R. L.; LEHMAN, M. N. Neural mechanisms controlling seasonal reproduction: principles derived from the sheep model and its comparison with hamsters. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 37, p. 43–51, 2015. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

WEHR, T. A. Melatonin and Seasonal Rhythms. **Journal of Biological Rhythms**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 518–527, 1997. DOI: 10.1177/074873049701200605.

WEST, N. O.; NORDAN, H. C. Hormonal regulation of reproduction and the antler cycle in the male Columbian black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). Part I. Seasonal changes in the histology of the reproductive organs, serum testosterone, sperm production, and the. **Canadian Journal of Zoology**, [S. l.], v. 54, n. 10, p. 1617–1636, 1976.

WHITEHEAD, G. K. **Whitehead encyclopedia of deer**. [s.l.] : Voyageur Press, 1993.

WILLIAMS, L. M.; HELLIWELL, R. J. A. Melatonin and seasonality in the sheep. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 33, n. 1–4, p. 159–182, 1993. DOI: 10.1016/0378-4320(93)90113-6.

WITTKOWSKI, W. H.; SCHULZE-BONHAGE, A. H.; BOCKERS, T. The pars tuberalis of the hypophysis: A modulator of the pars distalis? **Acta Endocrinologica**, [S. l.], v. 126, n. 4, p. 285–290, 1992. DOI: 10.1530/acta.0.1260285.

WOOD, S.; LOUDON, A. The pars tuberalis: The site of the circannual clock in mammals? **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 258, p. 222–235, 2018. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.06.029. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.06.029>.

YASUO, S.; KORF, H. W. The hypophysial pars tuberalis transduces photoperiodic signals via multiple pathways and messenger molecules. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 172, n. 1, p. 15–22, 2011. DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.11.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.11.006>.

YASUO, S.; YOSHIMURA, T.; EBIHARA, S.; KORF, H. W. Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 2885–2889, 2009. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0145-09.2009.

YELLON, S. M.; FOSTER, D. L. Alternate Photoperiods Time Puberty in the Female Lamb. **Endocrinology**, [S. l.], v. 116, n. 5, p. 2090–2097, 1985. DOI: 10.1210/endo-116-5-2090. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-116-5-2090>. Acesso em: 19 mar. 2020.

CAPÍTULO 2 – “Exogenous melatonin enhances testosterone secretion and sperm quality in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) bucks”¹

4. Abstract

Photoperiod is the main cues that controls seasonal reproduction in deer from temperate regions, like secretion of testosterone by the testes, neck enlargement and testes development. However, little is known about its effect on reproduction of tropical deer species. This research aimed to assess the indirect effect of photoperiod by giving oral melatonin for brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). Reproductive parameters such as testicular volume, neck circumference, semen quality, fecal androgen metabolites (FAM) were evaluated from Day 0 to Day 90, and melatonin treatment were performed during Day 0 to Day 60. In total, seven individuals were used in the study. Four animals were allocated to treated group (TG) and 3 to control group (CG). The neck circumference and some seminal parameters did not show any significant difference between CT and GT and along the experimental period. High FAM levels were observed for TG in days 7, 14, 21, 35, 84 and 91 ($p < 0.05$). The mean testicular volume reduced in Day 0 to Day 30 ($p < 0.05$) and to Day 0 to Day 90 ($p < 0.05$), with a slight increase in the mean testicular volume during Day 30 to Day 60 ($p > 0.05$). Sperm motility has the highest value on Day 60 compared to Day 0 ($p < 0.05$). Although not statistically different, membrane integrity and major defects tend to be higher and lower, respectively, on the TG than in the CG. For these parameters, incremental change (%) per individual showed that males from TG tend to have higher percentage during the melatonin treatment, which means that melatonin might have an effect during melatonin treatment. Those findings suggest that reproductive system of brown brocket deer might respond to drastic photoperiod change and melatonin seems to improve the seminal characteristics instead of controlling the seasonal reproduction in *M. gouazoubira* while inhabiting neotropics.

Keywords: photoperiod, testosterone, endocrinology, melatonin, tropical deer

5. Introduction

¹ Este capítulo se refere ao artigo extraído da dissertação, que foi redigido seguindo as normas da Revista Animal Reproduction Science.

The evolutionary history of deer in North America and in the neotropics is still somewhat obscure (Duarte et al., 2008). The occupation of deer in neotropical regions was allowed by the Panamanian land bridge (3,5 Mya) and by the absence of any other ruminants, which contributed to their success in South America (Webb, 2000). In this context, these species have also adapted their reproductive strategies to the new tropical environment. Presumably, deer species from tropical regions are aseasonal breeder, but surprisingly, even in this region, they can show some degree of reproductive seasonality reflected in seasonal variation of reproductive characteristics such as antler cycle, testosterone levels and fawning period, while other species have asynchronous antler cycle and gonadal function (Asher, 2011; Pereira et al., 2020, 2005; Versiani et al., 2009).

In general, it is believed that these species have possibly retained some seasonal characteristics from their ancestors pertained to temperate regions, where species show a high degree of reproductive seasonality in their reproductive traits (e.g. secondary sex characteristics) driven essentially by photoperiod variation (Bubenik et al., 1991). The reproduction is stimulated during decreasing daylength and reproductive features such as the antler cycle has an annual pattern linked to seasonal variation of testosterone levels, as well as the testicular volume, seminal production and other morphological parameters (e.g. neck circumference) (Jaczewski, 1954; Asher et al., 1987; Bubenik, 2006) which are synchronized among individuals and to seasons (Asher et al., 1987).

In fact, many authors do not know why tropical species retained some seasonal patterns, like the annual antler cycle (Asher, 2011; Monfort et al., 1993), presented by several tropical and neotropical species. In these regions, there is a slight variation in photoperiod, and for this reason it does not explain the existence of the seasonal characteristics. The white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) has a vast distribution in North and Latin America and the same species has adopted different reproductive strategies, ranging from a strong seasonal reproduction in northern regions and different degrees of seasonality in the tropics. Moreover, the pampas deer, apparently retained the seasonal antler cycle, which is absent in other neotropical species such as marsh deer (*Blastoceros dichotomus*) (Ramos, 2004) and the most brocket deer species (Barrozo et al., 2001; Bisbal, 1994; MacNamara and Eldridge, 1987; Pinder and Leeuwenberger, 1997; Schneider, 1996) especially brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and red brocket deer (*Mazama americana*). These latter species exhibit total lack of seasonality and synchrony in the replacement of antlers and apparently all these species do not have their antler cycle related to testosterone variation. In captivity, marsh deer and *Mazama spp* show asynchronous antler cycle among individuals and can breed in any time throughout the year (Pereira, 2010; Pereira et al., 2010; Ramos, 2004).

The neotropical species (neotropical white-tailed deer, pampas deer, marsh deer and *Mazama spp*) are classified as non-seasonal breeder, but some seasonal characteristics might be present, which have been observed in nature for brown brocket deer. In all over native regions (5°S and 35°S - Argentina, Bolivia, Paraguay

and Brazil - except in Amazon region) the species show some evidences of seasonality, reflected by seasonal births and antler cycle synchrony (Bláck-Décima et al., 2010). In nature from Brazilian regions, birth peaks occurs in different periods of the year in different regions: In Cerrado, fawns were more frequently observed in the field at the end of the rainy season (Leeuwenberg et al., 1999); In Pantanal, two peaks of birth concentrations were observed, the first right before the beginning of the rainy season, and the second after the annual period of flooding (Pinder, 1997). In wild, free ranging individuals of *Mazama gouazoubira* show some antler synchrony in Brazil and in Argentina (Black-Décima et al., 2010).

Those differences regarding anecdotal observation of births and antler cycle in captivity and in nature cast some doubts about their real reproductive pattern and still remains unknown if *M. gouazoubira* species are capable of responding to photoperiod, since studies conducted in captivity that point out the real insensibility to photoperiod in *Mazama gouazoubira* are based only on endocrine and morphologic data. In this sense, the lack of photoperiod response in animals can be assessed by melatonin treatment (Bubenik, 1983), but as far as we know, none of the neotropical species were submitted to melatonin treatment. Loudon and Curlewis (1988) showed no effect of melatonin in male axis deer (*Axis axis*), specie originated from tropical region of Asia continent. For *Axis axis*, there's a little or no seasonal photoperiodic entrainment of the antler and testicular cycles, but the authors stated that there is some possible long-term effect of melatonin treatment in antler cycle (Loudon and Curlewis, 1988). Mylrea (1992) has also stated that melatonin can shift the antler cycle, but both studies were performed in different locations and latitudes which is not the native origin of chital species (England 52°N and Australia 25°S, respectively), which somehow could alter the results.

Treatment with exogenous melatonin (orally or by subcutaneous injections) performed in deer species induces a physiological "short-day" period when they are treated during the non-breeding period (summer and spring) (Bubenik, 2006). Melatonin can alter normal timing of seasonal antler growth, an early peak in maximum mean testicular diameter and the earlier onset of sperm presence in ejaculate, rutting behavior, exchange pelage color, increased neck muscle development during and immediately after treatment and elevation of testosterone concentration (Adam and Atkinson, 1984; Asher et al., 1987; Bubenik, 2006, 1983; Bubenik et al., 1986).

In our investigation we aimed to assess if *M. gouazoubira* is capable of responding to photoperiod as their conspecific species from temperate regions and thus evaluate the potential reproductive seasonality of *M. gouazoubira* by addressing the following questions: a) Does the exogeneous melatonin affects the testicular volume, neck circumference and enhances the fecal androgens metabolites excretion during melatonin treatment? b) Does exogenous melatonin improve seminal parameters during melatonin treatment?

6. Material and Methods

6.1. Animals and Experimental design

Seven bucks were used in the study. The study was carried out at Deer Research and Conservation Center (www.fcav.unesp/nupecce) from São Paulo State University/Jaboticabal-SP (20° S). All individuals were kept in individual stall (4.0m x 2.0m) with olfactory and sound contact with conspecific females and males and were exposed to natural photoperiod fluctuation. They were fed a concentrated diet for horses (12% crude protein, 2% crude fat, 10% crude fiber, Purina Co., Paulinia, Sao Paulo, Brazil) provided 0,5 Kg once daily in the morning and approximately 1 kg/deer/day of perennial soybean (*Neonotonia wightii*), rami (*Boehmeria nivea*) or mulberry branches (*Morus alba*), provided according to their availability in the field. Water was offered *ad libitum*.

Four animals were allocated in the treated group and three in the control group. The experimental design was performed in: Day 0, Day 30, Day 60 and Day 90. In all those periods, the animals were anesthetized with an association of intramuscular xylazine hydrochloride (Rompun/Bayer, São Paulo, SP, Brazil; 1 mg/kg) and ketamine (Dopalen/Agribrands, Paulínia, SP, Brazil; 7 mg/ kg). During Day 0, Day 30, Day 60 and Day 90, neck girth, seminal parameters, antler phase and testicular volume were analyzed.

Table 1 Animals (A, B, C, D, E, F and G), age and reproductive history and their latitude of origin. Animals A, B, C and D were allocated to treated group and Animals E, F and G to control group.

Animal ID	Latitude of origin	Birth origin	Age (years)	Reproductive history	Control group	Treated group
A	15°S	Free range	~3.5	Unknown		X
B	27°S	Free range	~2	No		X
C	21°S	Free range	~2.5	No		X
D	21°S	Free range	~3.5	Yes		X
E	21°S	Free range	~5	Unknown	X	
F	21°S	Captive born	5	Yes	X	
G	21°S	Free range	~1.2	No	X	

6.2. Melatonin treatment

According to Bubenik (1983), oral melatonin presentation is reabsorbed slowly and thus it is closer to physiologic condition in ruminants. Two mg/day/animal of oral

melatonin (encapsulated powder presentation) (Kennaway and Seamark, 1980) which was acquired from a compounding pharmacy (Pharmatrix®) were offered to the animals embedded in a piece of banana. The treatment started on October 17th until December 16th of 2018 (for 61 days), respecting the minimum period of melatonin treatment in ruminants (5 weeks) (Poulton, 1988) during the spring/summer in order to mimic the non-breeding season of deer from temperate regions and when the light:dark ratio is higher than during winter and autumn from tropical regions. The melatonin was offered three hours before dark (~15 h pm), to simulate the total hours of darkness (~15 h in total) during autumn and winter from temperate regions as stated by Asher et al. (1987) and Bubenik et al., (1986).

6.3. Fecal androgens metabolites measurement, fecal collection and enzyme immunoassay

To assess the testosterone profile in both groups, fecal samples were collected thirty day before the melatonin treatment (Day -31) until Day 90. Fecal samples were collected once a week per male at 8h to 10h. The samples were stored in plastic bags identified with the animal name, date, and time of collection and then stored in a freezer at -20 °C until processing. The feces were oven-dried for 72 h at 56 °C and then pulverized with a rubber hammer (Hamasaki et al., 2001; Yamauchi et al., 1997) to avoid the variation among pellets of the same fecal sample (Tanaka et al. 2019). The protocol for the extraction of fecal steroid metabolites was based on the method described by Graham et al. (2001), where 0.5 g of the pulverized feces were weighed and 5 mL of 80% methanol added. The samples were vortexed for 30 seconds at high speed and subsequently subjected to a horizontal homogenizer (VDRL shakerTS; 2000^a, Biomixer) for 12 hours. Finally, the samples were centrifuged at 1500 rpm for 20 minutes and the supernatant was collected and transferred to a tube and stored at -20 °C. Aliquots of supernatants were diluted 1:16 for enzyme immunoassay (EIA) analysis, which were read at 405 nm using an automated plate reader (Multiskan MS, Labsystem, Helsinki, Finland). Accuracy of microplate reader is $\pm 0.001\text{--}0.0003$. Androgen metabolite concentrations were determined using the R156/7 antibody to fecal androgen metabolites (FAM). This antibody was chosen because of the high cross-reaction with excreted metabolites in *Mazama gouazoubira* — testosterone in feces (Polegato, 2004). The validation of hormonal measurement was based on the methodologies described according to Brown et al. (2004), by observing the parallel arrangement between the standard curve and the curve formed by the pool of fecal extracts prepared by serial dilution and significant recovery of exogenous testosterone ($y = 1.1552x + 68.689$, $R^2 = 0.9886$) added to fecal extracts. Interassay coefficients of variation for two separate controls were 8.2% (71.6% binding) and 6.2%

(37.3% binding) for testosterone. Intra-assay coefficients of variation were <10%. All fecal data are expressed on a dry-weight basis.

6.4. Gross morphometry

Morphometric measurements such as neck and testicular volume, antler stage and ejaculates were collected at Day 0, Day 30, Day 60 and Day 90. Neck was measured using a flexible tape, whereas automatic Vernier calipers were used to assess length and width of both testes. Testicular volume was later estimated by using the prolate spheroid formula $V = \frac{4}{3} \pi W.L.H$, where W= width, L=length, H=height. Antler status (velvet, hard antler or casting) were recorded throughout the study.

6.5. Electroejaculation and semen analysis

Immediately after gross morphometry, semen was collected using a standardized electroejaculation protocol (Duarte and Garcia, 1997). A sine-wave electrostimulator and rectal probe (P.T. Electronics, Boring, OR) were used to administer 10 stimuli given in a 3-s on-off pattern in one series consisting of 10 (250 mA) stimuli. One series was performed and aliquot of semen was collected and assessed for volume using an electronic micropipette. After collection of the ejaculate, the aliquot was diluted in TRIS-egg yolk extender (1:3 or 1:4 depending of the semen aspect), and placed in a water bath at 37°C. Next, sperm motility and forward progressive motility were subjectively determined by placing 10 µL of diluted semen between a pre-warmed glass slide and coverslip (37°C) and observing in light microscope (three separate fields – 400x magnification). Percentage of motile spermatozoa was depicted as percentage (0% - 100%) while forward progressive motility as scored from 0 to 5 (0 = no movement and 5 = rapid, steady forward progression) (CBRA, 1998). Then, both values were used to obtain the Sperm Motility Index ($SMI = [motility + (forward\ progressive\ motility \times 20)] \times 0.5$) (Howard, 1993).

To determine sperm concentration 5 µL of fresh semen were added to 1000 µL of 10% buffered formol saline (1:200) and spermatozoa were counted using an improved Neubauer hemocytometer (400x magnification). Total sperm motility count was calculated by multiplying semen volume, concentration and motility. Functional tests evaluation such as membrane and acrosome integrity were performed according to methodology described in Nichi (2009). Briefly, a smear was prepared by the addition of 5 µl of diluted semen to 5 µl of eosin-nigrosin solution incubated for 30 seconds. For acrosome integrity, we used fast-green/rose-bengal staining, and smear was prepared by the addition of 5 µl of diluted semen to 5 µl of stain solution, incubated

for 60 seconds. In both procedures, the smears were prepared in a pre-warmed (37°C) glass slide and 200 sperm were assessed, at x1000 magnification.

Sperm morphology was assessed by wet mount technique, with the evaluation of 200 spermatozoa. Sperm alterations were classified into major and minor defects according to Blom (1973) classification.

6.6. Statistical analysis

Experimental design was completely randomized with repeated measures (Split-plot design). The results regarding testicular volume, neck circumference, seminal parameters were analyzed using Mixed Linear Models. The sources of variation in the model were melatonin treatment, time measurement and treatment-time interactions. The individuals from the treated group were considered as the random effect of the model. The residues of the models met the assumptions of normality, according to the Cramer-von Mises test, and a significance level of 5% was adopted. FAM levels were compared between groups and days using a Friedman's test, and its interaction a Kruskal-Wallis test, a Dunn's post-hoc was used to compare significative medians. A probability of $p < 0.05$ was considered significant, for all tests. The analyzes were performed in SAS Windows and Software R using the "lme4" package (R CoreTeam, 2015;2020).

7. Results

The effect of melatonin on reproductive parameters did not have significant difference ($P > 0.05$) between Control and Treated group (except for FAM levels –which treated group has higher FAM levels than Control group – $p < 0.05$), but along Day 0, Day 30, Day 60 and Day 90, the testicular volume (Figure 3), sperm motility (Figure 3) and FAM levels (Figure 1) showed significant difference along the experimental period. There is no time effect (except for testicular volume and sperm motility index) or time by group interaction for control and treated group (except for FAM levels).

7.1. Melatonin effect in FAM levels along the study

To demonstrate the fecal androgens metabolites (FAM) pattern along the experimental period, FAM levels are shown in 7 days-based intervals, beginning at Day -28 to Day 91. There was effect of group $\times$ days interaction on FAM concentration

(ng/g); thus, Treated group showed higher FAM concentrations than Control group at days 7 (1257.82±672.20 vs 584.89±243.50), 14 (809.28±267.45 vs 469.67±64.10), 21 (828.94± 249.40 vs 444.52±86.51), 35 (752.60±115.75 vs 306.29±103.73), 83 (530.59±1793.97 vs 222.51±76.66) and 90 (971.81±1063.78 vs 484.63±234.36) (P = 0.0025; Figure 1). Individual graphs are represented in Figure 2.

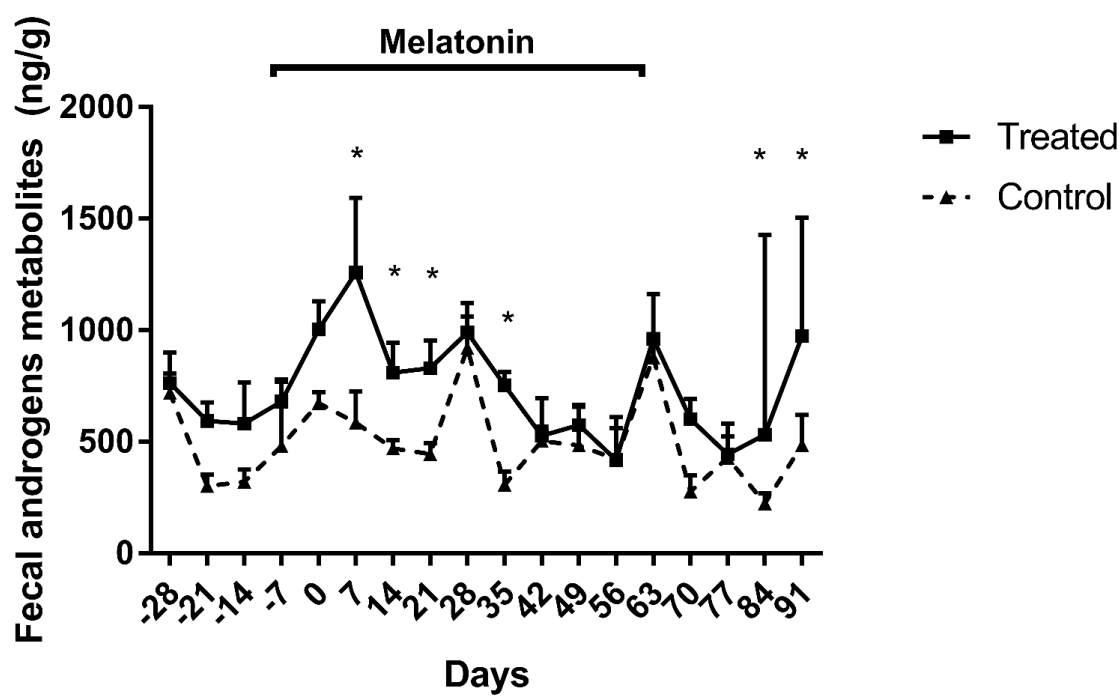


Figure 1 Fecal testosterone concentration in melatonin treated group (■) (n=4) and control group (-▲-) (n=3) in function of experimental days at study prior to melatonin treatment (since day -28 until -7) until post melatonin treatment (day 91). 7 days basis interval are presented as medians (squares and triangles) ± interquartile range (error bars). *Indicates significant difference between groups and days (P<0.05).

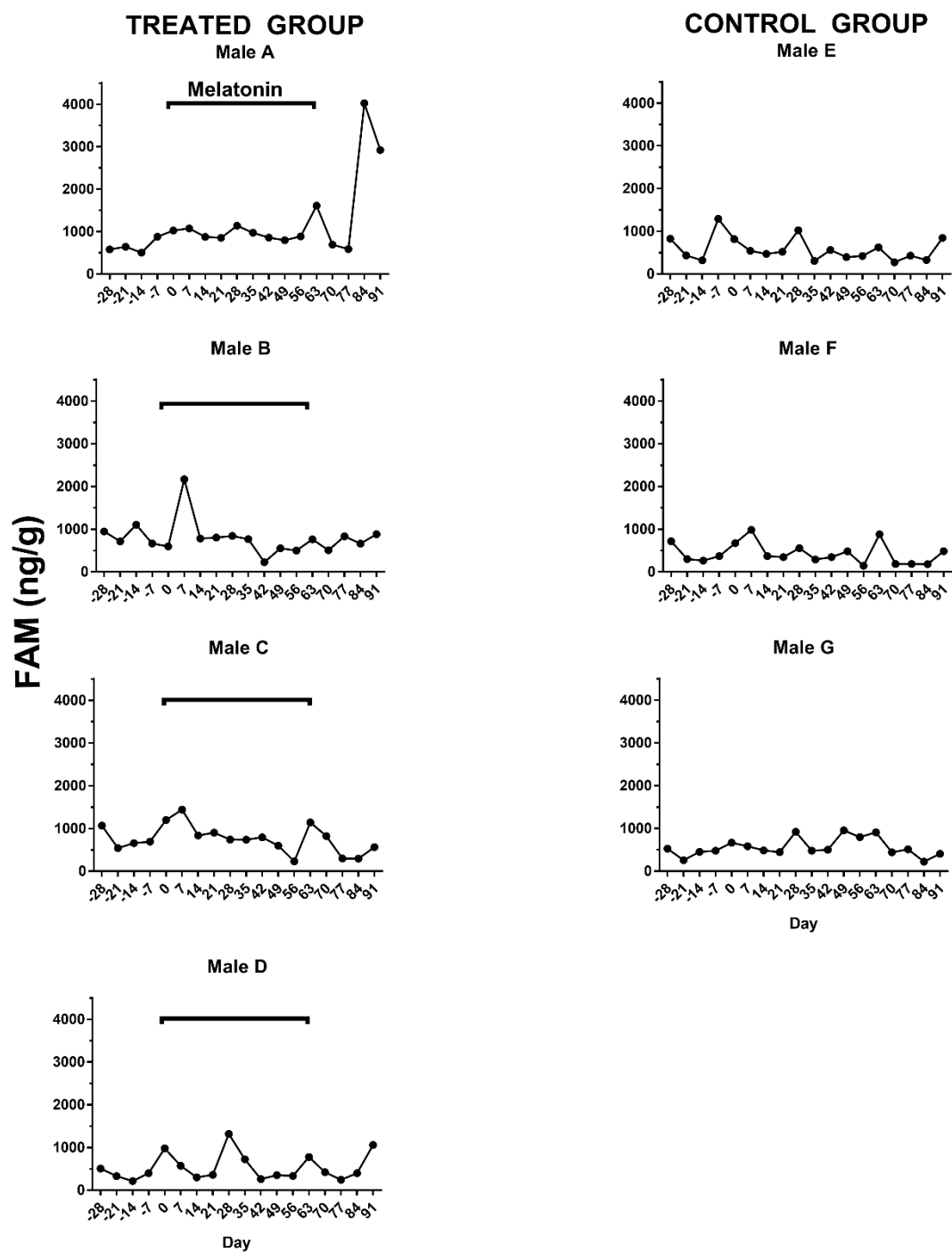


Figure 2 Individual FAM profile during pre-melatonin treatment (Day – 28) until post-treatment (Day 91). Black square bracket indicates melatonin period treatment (Day 0 to Day 60) in treated group.

7.2.Melatonin effect in testicular volume, neck circumference and other seminal parameters

The mean testicular volume in Day 60 is similar to Day 30 and Day 90 ($p>0.05$). We can observe that the mean testicular volume has reduced during Day 0 to Day 30 ($p<0.05$) and from Day 0 to Day 90 ($p<0.05$).

Sperm motility was higher in Day 60 than Day 0 ($p<0.05$), which is considered the period closest to melatonin treatment cessation. We have observed an improvement in some seminal characteristics such as membrane integrity (%) and a reduction in major defects (%) for the treated group along melatonin treatment (Day 0 to Day 60), which are summarized in the Figure 3.

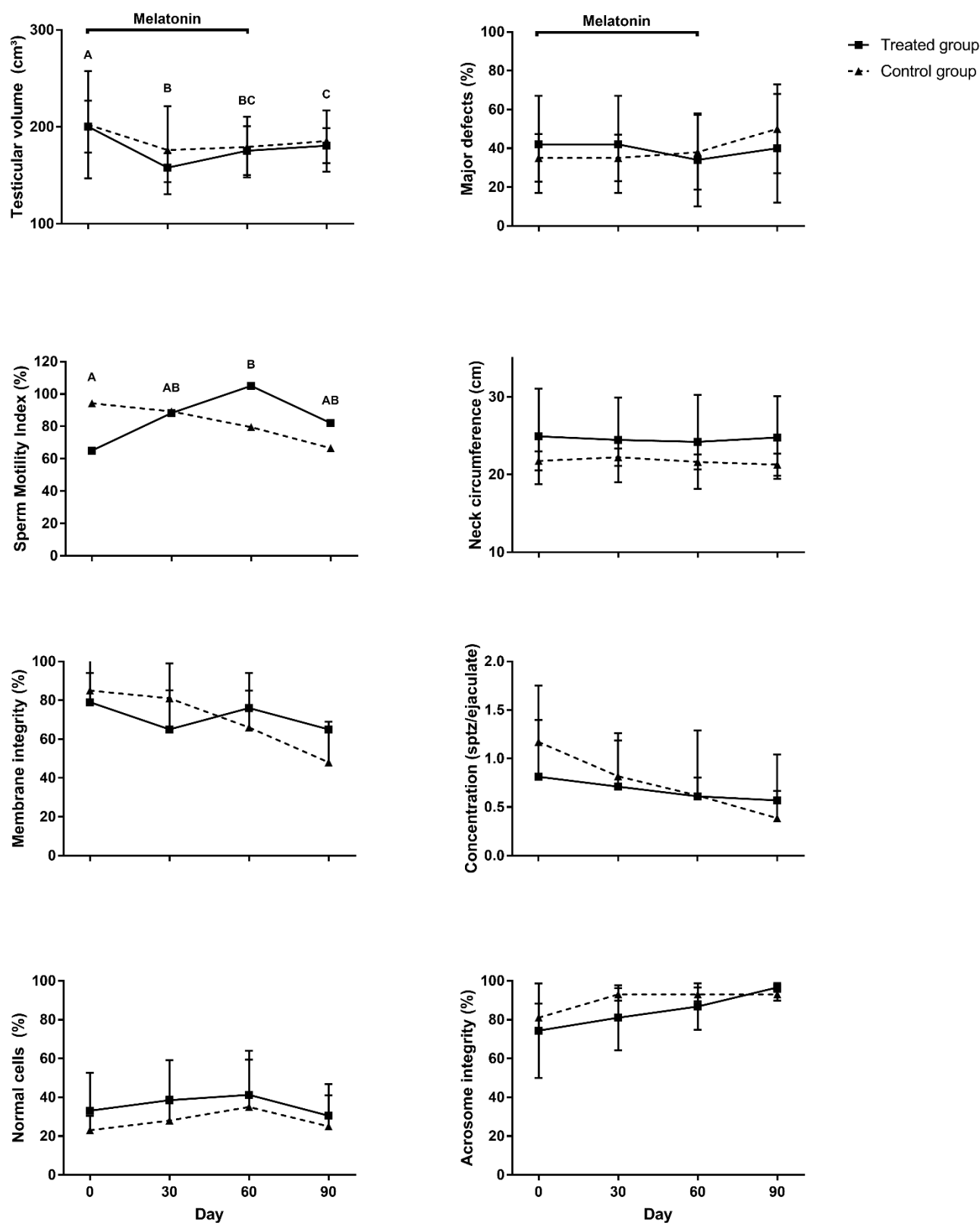


Figure 3 Graph lines represent the mean values of testicular volume (cm³), sperm motility (%), membrane integrity (%) and major defects (%) from treated (■) and control group (-▲-). Upper letters represent difference along time for treated group. For the mean testicular volume, the treated group showed a similar mean value in Day 30, Day 60 and Day 90, however the mean value of Day 0 differs from Day 30, Day 60 and Day 90 ($p < 0.05$). Although the mean testicular volume is higher on Day 0 than the following days (Day 30, Day 60 and Day 90), it is possible to observe a reduction in testicular volume until Day 90. During Day 30 to Day 60 and after the end of treatment (Day 60 to Day 90) there was a non-significant slight increase in the mean testicular volume. Mean sperm motility from treated group showed higher value in Day 60 than in Day 0, which is considered the period closest to melatonin cessation. Although not statistically significant, membrane integrity (%) and major defects show a possible effect of melatonin treatment ($p > 0.05$) in improving these seminal parameters during the treatment period (Day 0 to Day 60). Black square bracket indicates the period of melatonin treatment.

8. Discussion

The effect of exogenous melatonin upon deer reproduction in tropical regions remained unresolved for a long time, as such this study is the first to observe the reproductive parameters over a period of pre, during and post melatonin treatment in neotropical deer. We found that melatonin treatment resulted in increase in testosterone secretion during the first month of treatment and after treatment cessation, and importantly, it might be possible that this increase in FAM excretion affected reproductive parameters such as the seminal quality, despite the fact that some of the seminal characteristics was not statistically different due to reduced sample size and individual variability. Our results indicate that this hormone might have other roles in improving testicular function, aside from merely transcribing photoperiod to signal the onset of the breeding season as reported in studies in deer from temperate regions.

The increase in FAM levels observed in our study was the same pattern described in a photoperiodic short-day breeder white-tailed deer treated with oral melatonin (Bubenik et al., 1986), which is highly responsive to this treatment. In this species, oral melatonin stimulated testosterone secretion in the experimental group, and this is observed during the first month of melatonin treatment ($p < 0.05$) and after treatment cessation ($p > 0.05$). Bubenik et al. (1986) attributed this increase in testosterone levels associated with a decrease in prolactin secretion, which is sensitive to photoperiodic manipulation. In short day breeders, high levels of prolactin delay the LH-induced testosterone rise, as prolactin affect responsiveness of Leydig cells to LH, by blocking T production by direct action at the gonadal level (Bubenik et al., 1986). Although prolactin was not measured in our study, it is possible that prolactin secretion has been altered by exogenous melatonin at gonadal level and we also speculate that melatonin may affected the testosterone secretion by Leydig cells, since *in vitro* studies demonstrated a direct effect of exogenous melatonin in testosterone secretion by Leydig cells (Deng et al., 2018).

Our findings led us to believe that we cannot exclude the existence of photorresponsiveness in *M. gouazoubira*, since some tropical deer translocated to higher latitudes respond to photoperiod change by switching the reproductive cycle accordingly as we observe for *Axis axis* translocated to higher latitudes, which show a different reproductive cycle in these regions compared to when the reproductive cycle is assessed in native regions (Loudon and Curlewiss, 1988). The translocation is the best alternative to confirm the photorresponsiveness, as some tropical species is capable of responding to subtle photoperiod change (Monfort et al., 1993) and others, such as red brocket deer (*Mazama americana*) remains with the same reproductive pattern from native regions, which corresponds to a continuous breeding throughout the year, in higher latitudes (MacNamara and Eldridge 1987).

However, we hypothesize that the existence of possible photorresponsiveness in *M. gouazoubira* might be masked by the small photoperiod variation (maximal difference of 1.76 h of daylight) in neotropics. Studies performed in captivity show a

lack of photoperiod influence in *M. gouazoubira* while inhabiting neotropics, since testosterone profile of *M. gouazoubira* is characterized by an irregular and acyclic pattern, which from this perspective, it suggests that melatonin might not have an important role in controlling seasonal reproduction in these regions. Additionally, differently from temperate deer, which faces annually harsh environmental conditions across their lifetime and for this reason they use photoperiod cue to predict the short breeding season, *Mazama spp* show apparently an extended sexual activity due to favorable environmental factors along the year (e.g. food availability, stable temperature), which in terms of biological perspective, it would not be necessary to tight their reproduction to photoperiod variation (and consequently use melatonin to predict the breeding season). As a result, this likely might be followed by weak influence of this hormone in testosterone secretion and consequently in the secondary sexual organs, which explains the lack of seasonality in reproductive parameters of captive *Mazama*.

It is reasonable to assume that species of *Mazama Genus* while inhabiting neotropics, might not show seasonal testosterone secretion linked to photoperiod in neotropical regions as their temperate conspecifics in higher latitudes, because in an adaptive standpoint, the presence of an extended breeding season may lead to this endocrine pattern in *Mazama*, favoring males which reproductive potential was preserved independently of the antler phase and season (Pereira et al., 2020). The existence of females ready-to-breed over the year also elucidate the all year round reproductive potential and the retention of the hard antler more than a year in *M. gouazoubira* (Barrozo et al., 2001; Bisbal, 1994), which the presence of hard antler for longer periods can contribute more to successfully access females or territories (Lincoln, 1992).

Furthermore, unlike *Pudu puda* and *O. bezoarticus* and deer from temperate regions, the social rut is not present in *Mazama*, and the absence of this period reduces the inter-male competition to access the females, reducing the need of males with antler phases in synchrony (Chapman and Chapman, 1982), which is crucial for seasonal deer species from northern latitudes. Therefore, the maturation and casting of the antlers may follow an endogenous rhythm among individuals (Lincoln, 1985; Goss, 1976; Bedford and Marshall, 1942), relied mainly on the physiological process of antler cycle (Lincoln, 1992). Despite close phylogenetic root of this Genus to *P. puda* (Ruíz-García et al., 2007), we can observe that selective pressures affected the reproduction of neotropical species in different degrees, and the retention of some seasonal characteristics (e.g. the well-defined antler cycle and synchronous) observed in neotropical species such as *Odocoileus virginianus* (Contreras-Moreno et al., 2019) and *O. bezoarticus* (Pereira et al., 2005) are possibly related to their level of sociality (gregarious behavior and the presence of social hierarchy, which can result in unequal access to different resources among individuals (Ungerfeld et al., 2008), including the breeding success) and the length of the breeding season (e.g. females in estrous and presence of social rut). Taking these factors in consideration, the presence of some antler synchrony observed in free ranging *M. gouazoubira* may be only coincidental,

once they are solitary deer and do not share any of these characteristics showed by deer that live in groups.

For free-ranging individuals of *O. virginianus* from tropical regions (e.g. Campeche (19°N) – Mexico), despite the seasonal characteristics of the antler cycle, it is not associated with photoperiod since the development of velvet antler occurs during the period of increased daylight, contrary to what is described in temperate latitudes when the velvet stage takes place during the reduction in the daylength (Contreras-Moreno et al., 2019; Goss, 1983; Lincoln, 1992). According to Contreras-Moreno et al. (2019), this evidence suggest that the conditions that determines the reproductive cycle of the *O. virginianus* from Campeche could be related to resource availability. The association of reproductive cycle and resource supply has been also suggested by Mayor et al. (2011) who reported that *M. americana* species located in Northeastern Peruvian Amazon can show different seasonal patterns of conception rate (Hurtado-Gonzales and Bodmer, 2006) due to the variation of food supply in this region. Since variation of food availability is the main factor for the seasonal reproductive pattern (Goodman, 1999), *M. americana* could be considered an opportunist seasonal breeder, driven essentially by resource supply (Mayor et al., 2011). This classification can also include *M. gouazoubira*, since births correlates with the food supply for this species (Juliá and Peris, 2010) and we suggest that neotropical species may have developed the ability to synchronize their reproductive pattern with this environmental factor (e.g. food) rather than using the photoperiod signal associated to reproduction.

Regarding the testicular volume, the reduction induced by melatonin treatment observed in the treated group contrast with data described in deer from temperate regions, which experiences an enlargement in its volume (Bubenik, 2006) and with tropical deer *Axis axis*, whose testicular volume does not show any response to melatonin treatment (Loudon and Curlewiss, 1988). Our results are similar to what occurs in long day breeders such as rodents and some species of mustelids (Petterborgh and Reiter, 1980; Rust and Petersburg Meyer, 1969) treated with exogenous melatonin, which reproduction is driven during the lengthening day. However, the reduction observed in our study might not be associated with the type of reproductive system of *Mazama* species, but with an isolated case, because as far as we know, they can breed any time of the year in the tropics. Besides, even though not statistically different among Day 30, Day 60 and Day 90, there was a slight increase in the mean testicular volume in the middle of the melatonin treatment (Day 30 to Day 60) and after the end of treatment (Day 60 to Day 90). The period Day 30 to Day 60 is considered the period closest to melatonin treatment cessation and this result is similar to what it is found in fallow deer (*Dama dama*), which the mean testicular diameter was highest on the day closest to the cessation of melatonin treatment (Asher et al., 1987).

According to Buffoni et al. (2015), it is possible that the growth of testicular volume could not be associated with testosterone rise like it was observed for ram treated with melatonin (Buffoni et al., 2015). A possible explanation for the testicular volume enlargement in *M. gouazoubira* bucks could be due to a direct effect of melatonin in the proliferation of cells from testis. Studies *in vitro* showed that melatonin

(concentration of 1 μ M a 1nM) could have a stimulatory effect on testis cell growth and spermatogonia proliferation in non-seasonal and seasonal species, such as bovines and goats respectively, through melatonin receptors Mlt1 and Mlt2, which are present in Leydig and Sertoli cells (Frungieri et al., 2017; Yang et al., 2014). We suggest that melatonin could have stimulated the proliferation of the testis cells, but further studies are needed to confirm this possibility.

Despite this fact, it is not possible to affirm that the testicular volume of *M. gouazoubira* respond to photoperiod, since several studies have observed that the changes caused by melatonin treatment have parallel effects on several characteristics of the male deer, such as the circumference of neck, which did not show to be affected by melatonin treatment in our study. In the case of the fallow deer (*Dama dama*), the early increase in testicular volume was also accompanied by an increase in neck circumference and in anticipation of sperm production (Asher et al., 1987). Bubenik (1983) and Bubenik et al. (1986) observed changes in the mineralization of antler accompanied with the anticipation of increased testosterone levels and a pelage color exchange in the white-tailed deer bucks; Lincoln et al. (1984), demonstrated an increase in plasma testosterone concentration that was associated with the anticipation of antler mineralization.

Furthermore, we speculate that despite the high FAM levels found in our study, the possible little influence of melatonin in the reproduction of *M. gouazoubira* while in neotropics, is also supported by morphological evidences obtained in captivity, where this species does not show seasonal variation of testicular volume (Barrozo et al., 2001) as reported for *M. americana* as well (Pereira et al., 2020). According to Lincoln (1985) the reduction of testicular volume by up to 75% in relation to the maximum volume observed during the reproductive period is usually associated with a decrease or cessation in spermatogenesis in deer from temperate regions. However, neotropical deer species such as *M. gouazoubira* and *M. americana*, further do not present considerable reduction in testicular volume, they can maintain sperm production throughout the year, which differs from deer pertained to temperate regions where they experience azoospermia during the period of sexual arrest. Neotropical species such as southern Pudu, even with a reduction in the testicular average size during the velvet phase, the reduction was not associated with a decrease in spermatogenic activity (Chapman and Harris, 1991). In a study performed *in vitro* using Leydig cells from tropical deer *Muntiacus muntjak* showed that Leydig cells are capable of producing high amounts of testosterone during velvet phase, which allow the species to maintain a year-round capability of generating fertile sperm (Chiu-Lin et al., 2014). This probably would be the case of *Mazama Genus*, which as *M. muntjac*, testosterone levels might never be low enough to trigger the quiescent phase of the reproduction cycle (Chiu-Lin et al., 2014).

Due to continuous production of the ejaculate in *M. gouazoubira*, we decided to assess the melatonin effect in improving sperm quality (Buffoni et al., 2015; Jang et al., 2010) instead of assessing the anticipation of sperm production, which is observed in the majority of the studies involving melatonin in male deer from temperate regions (Asher et al., 1987). There are a number of species where, giving melatonin is

inconsequential in terms of reproduction and although melatonin may not change the neuroendocrine pituitary system in non-seasonal breeders, melatonin may still have peripheral reproductive actions (Reiter et al., 2013), such as upon testicular function. In sheep, Pool et al. (2020) observed that melatonin implant is capable of stimulating testosterone secretion in a seasonal and non-seasonal ovine breed, with increased sperm production, but with a lack in sperm quality after melatonin implantation. On the contrary, the melatonin implant improved seminal parameters (e.g. sperm motility) 5 weeks post implant withdraw in a highly seasonal ovine breed (Casao et al., 2010). In our study, we have observed that the sperm motility has the highest mean value in Day 60 ($p < 0.05$) for the treated group, which is considered the period closest to melatonin cessation. The high sperm motility observed in the end of melatonin treatment may be due to testosterone role in seminal quality, which requires a 60-day hiatus between peak androgen levels and optimal semen quality, to observe seminal improvement (Lincoln et al., 1987). Thus, the high FAM levels observed during the onset of melatonin period in this study support this hypothesis that this high FAM levels might have determined the high sperm motility in the males of our study some weeks after FAM peak. Hence, we cannot rule out the possible direct effect of melatonin in Sertoli cells (Pool et al., 2020), which might help to regulate the testosterone secretion. If we observe other seminal aspects such as the mean major defects and membrane integrity, our results show that these variables seem to be affected by protective role of melatonin in semen especially during the period of treatment. Incremental changes (%) (Supplemental material) also support the evidence that melatonin might improve these seminal characteristics, which was not observed in control group.

As *in vitro* additive, melatonin demonstrates to improve sperm quality in seasonal and non-seasonal breeders (Ashraf et al., 2013; Cebrián-Pérez et al., 2014), which are primarily attributed to its free scavenging properties (Reiter et al., 2000). Another evidence that the improvement of seminal parameters could be attributed to melatonin treatment is that some individuals from treated group had lower sperm motility prior to melatonin treatment onset (not demonstrated). As far as we know, this is the first study to assess the effect of oral melatonin in seminal parameters in neotropical deer.

In summary, although the melatonin group display improvement in testosterone secretion, but rather retained consistently the lack of seasonal in other parameters (such as neck circumference) and we followed rigidly the period and time of melatonin treatment based in previous works, we cannot conclusively affirm that the dose offered in our study extended the endogenous melatonin secretion, once no studies were performed to judge a dose that is not too large to flood the system and which effectively would extend the endogenous profile. Similarly, this detail also lacked in some studies with melatonin in tropical and temperate deer (Adam and Atkinson, 1984; Asher et al., 1987; Bubenik et al., 1983; Loudon and Curlewiss, 1987). According to Kokolis et al. (2000), depending on the dose, exogenous melatonin induce an increase of mean value of blood testosterone that can last for days or weeks, and we found that in our study, we observed that the FAM pattern (increase in days 7,14,28, 35) was the same pattern found for white-tailed deer treated with oral melatonin (Bubenik et al., 1986).

However, in boarder terms, we cannot clearly affirm that this treatment revealed the potential seasonality of this species by changing the neuroendocrine system in *M. gouazoubira*, but the melatonin dose used in our study strongly indicates that it is effective, at least in stimulating testosterone production. Hence, future studies are needed to verify if this dose used in our study or other doses modify the neuroendocrine pituitary system in *Mazama*. It would also be interesting to characterize the melatonin receptors in cell testis along the year, since in roe deer (*Capreolus capreolus*) these receptors are high during pre and rut period and decrease during post-rut (Koziol et al., 2020) and measure the melatonin concentration in seminal plasma after melatonin treatment during the non-breeding season, since this might reveal the possible role of this hormone in seminal parameters (Casao et al., 2013; Pool et al., 2020).

9. Conclusion

Melatonin effect in the neuroendocrine pituitary system remains disclosed, yet we can infer that melatonin stimulates FAM secretion and might promote an improvement in seminal quality in *Mazama gouazoubira*. Moreover, our findings suggest that melatonin might not be essential in controlling the seasonal reproduction in *Mazama* while inhabiting neotropical regions.

Acknowledgements

The authors are grateful to Professor Dr. Marcilio Nichi, Guilherme Batista do Nascimento for their help with statistical analysis and to the keepers for their assistance with the deer management.

10. References

- Adam, C.L., Atkinson, T., 1984. Effect of feeding melatonin to red deer (*Cervus elaphus*) on the onset of the breeding season. *J. Reprod. Fertil.* 72, 463–466. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0720463>
- Ahuja-Aguirre, C., Pérez-Gutiérrez, O., López-deBuen, L., Rojas-Maya, S., Montiel-Palacios, F., 2017. EARLY ONSET OF THE REPRODUCTIVE SEASON IN CAPTIVE WHITE-TAILED DEER (*ODOCOILEUS VIRGINIANUS VERAECRUCIS*) IN EASTERN MEXICO. *J. Zoo Wildl. Med.* 48, 1031–1038. <https://doi.org/10.1638/2016-0148.1>
- Asher, G.W., 2011. Reproductive cycles of deer. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.026>

- Asher, G.W., Day, A.M., Barrell, G.K., 1987. Annual cycle of liveweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J. Reprod. Fertil.* 79, 353–362. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0790353>
- Ashrafi, I., Kohram, H., Ardabili, F.F., 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 139, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.016>
- Barrozo, L.A., Toniolo, G.H., Duarte, J.M.B., Pinho, M.P., Oliveira, J.A., 2001. Padrão anual de variação da testosterona sérica, volume testicular e aspectos seminais de veados-catigueiros (*Mazama gouazoubira*) em cativeiro. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 25, 210–211.
- Bedford, T.D., Marshall, F.H.A., 1942. On the Incidence of the Breeding Season in Mammals after Transference to a new latitude. *R. Soc.* 861, 396–399.
- Bisbal, F.J., 1994. Biología poblacional del venado matacán (*Mazama spp.*) (Artiodactyla: Cervidae) en Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 42, 305–313.
- Black-Décima, P.A., Rossi, R. V, Vogliotti, A., Cartes, J.L., Maffei, L., Duarte, J.M.B., González, S., 2010. Brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) (Fisher 1814), in: Duarte, J.M.B., González, S. (Eds.), *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Funep, Jaboticabal, pp. 255–270.
- Blom, E., 1973. Ultrastrukturen af nogle karakteristiske sperimedefekter og forslag til et nyt klassificerings-system for tyrens spermiogram [The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram (author's transl)]. *Nord. veterinaermedicin* 25, 383–391.
- Braga, F.G., 2004. Influencia da agricultura na distribuição espacial de *Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758 (veado-campeiro), em Piraí do Sul, Paraná. UFPR, Piraí do Sul.
- Bubenik, G.A., 2006. Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle-a review. *Vet. Arh.* 76, 275–285.
- Bubenik, G.A., 1983. Shift of seasonal cycle in white-tailed deer by oral administration of melatonin. *J. Exp. Zool.* 225, 155–156. <https://doi.org/10.1002/jez.1402250119>
- Bubenik, G.A., Brown, R.D., Schams, D., 1991. Antler cycle and endocrine parameters in male axis deer (*Axis axis*): Seasonal levels of LH, FSH, testosterone, and prolactin and results of GnRH and ACTH challenge tests. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 99, 645–650. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90144-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90144-2)
- Bubenik, G.A., Smith, P.S., Schams, D., 1986. The effect of orally administered melatonin on the seasonality of deer pelage exchange, antler development, LH, FSH, Prolactin, Testosterone, T3, T4, Cortisol, and Alkaline Phosphatase. *J. Pineal Res.* 3, 331–349. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1986.tb00756.x>
- Buffoni, A., Vozzi, A., Gonzalez, D.M., Viegas, H., Latorraca, A., Hozbor, F., Ledesma, A., Abecia, J.A., 2015. Melatonin modifies scrotal circumference but not plasma testosterone concentrations and semen quality of rams during the seasonal anestrus at 43°S. *Biol. Rhythm Res.* 46, 785–795. <https://doi.org/10.1080/09291016.2015.1052649>
- Casao, A., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Muñio-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2013. The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.002>
- Casao, A., Vega, S., Palacín, I., Pérez-Pé, R., Laviña, A., Quintín, F.J., Sevilla, E., Abecia, J.A., Cebrián-Pérez, J.A., Forcada, F., Muñio-Blanco, T., 2010. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in rasa aragonesa rams. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 425–432. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01215.x>
- CBRA, 1998. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, 2nd ed. Belo Horizonte.
- Cebrián-Pérez, J.A., Casao, A., González-Arto, M., dos Santos Hamilton, T.R., Pérez-Pé, R., Muñio-Blanco, T., 2014. Melatonin in Sperm Biology: Breaking Paradigms. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 11–21. <https://doi.org/10.1111/rda.12378>
- Chapman, D.I., Chapman, N.G., 1982. The antler cycle of adult reeves' muntjac. *Acta Theriol. (Warsz)*. 27, 107–114. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.82-8>
- Chapman, N.G., Harris, S., 1991. Evidence that the seasonal antler cycle of adult Reeves' muntjac (*Muntiacus reevesi*) is not associated with reproductive quiescence. *J. Reprod. Fertil.* 92, 361–369. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0920361>

- Contreras-Moreno, F.M., Hidalgo-Mihart, M.G., Jesus-de la Cruz, A., Juárez-López, R., Bravata-de la Cruz, Y., Chahín-Perdomo, A., 2019. Seasonal antler cycle in white-tailed deer in Campeche wetlands in Southeastern Mexico. *Eur. J. Wildl. Res.* 65, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1291-5>
- Deng, S.L., Wang, Z.P., Jin, C., Kang, X.L., Batool, A., Zhang, Y., Li, X.Y., Wang, X.X., Chen, S.R., Chang, C.S., Cheng, C.Y., Lian, Z.X., Liu, Y.X., 2018. Melatonin promotes sheep Leydig cell testosterone secretion in a co-culture with Sertoli cells. *Theriogenology* 106, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.025>
- Duarte, J.M.B., Garcia, J.M., 1997. Tecnologia da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção., in: *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Funep, Jaboticabal, pp. 228–238.
- Duarte, J.M.B., González, S., Maldonado, J.E., 2008. The surprising evolutionary history of South American deer. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.009>
- Frungieri, M.B., Calandra, R.S., Rossi, S., 2017. Melatonin Induces the Expression of Cyclooxygenase 2 (Cox2) and Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase (L-PGDS) in Murine TM4 Sertoli Cells, in: *CONICET*. Buenos Aires.
- Fuller, T.K., Silva, A.M., Montalvo, V.H., Sáenz-Bolaños, C., Carrillo J, E., 2019. Reproduction of white-tailed deer in a seasonally dry tropical forest of Costa Rica: a test of aseasonality. *J. Mammal.* 1–7. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyz173>
- Gallina, S.O., Mandujano, S.A., Bello, J.O., López-Arévalo, H.F., Weber, M.A., 2010. White-tailed deer *Odocoileus virginianus* (Zimmermann 1780)., in: *Neotropical Cervidology*. pp. 101–118.
- Goodman, R., 1999. Seasonal reproduction, mammals, in: Knobil, E.K., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego, pp. 341–352.
- Goss, R.J., 1983. *Deer Antlers: Regeneration, Function and Evolution*. Academic Press, Nova Iorque.
- Goss, R.J., 1976. Photoperiodic control of antler cycles in deer. III. Decreasing versus increasing day lengths. *J. Exp. Zool.* 197, 307–312. <https://doi.org/10.1002/jez.1401970302>
- Hamasaki, S., Yamauchi, K., Ohki, T., Murakami, M., Takahara, Y., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2001. Comparison of various reproductive status in Sika Deer (*Cervus nippon*) using fecal steroid analysis. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 195–198. <https://doi.org/10.1292/jvms.63.195>
- Howard, J.G., 1993. Semen collection and analysis in carnivores, in: Fowler, M.E. (Ed.), *Zoo & Wild Animal Medicine Current Therapy*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 390–399.
- Hurtado-Gonzales, J.L., Bodmer, R.E., 2006. Reproductive biology of female Amazonian brocket deer in northeastern Peru. *Eur. J. Wildl. Res.* 52, 171–177. <https://doi.org/10.1007/s10344-006-0034-6>
- Jackson, J.E., Langguth, A., 1987. Ecology and status of the pampas deer in the Argentinian Pampas and Uruguay., in: Wemmer, C. (Ed.), *Biology and Management of the Cervidae*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp. 402–409.
- Jaczewski, Z., 1954. The effect of changes in length of daylight on the growth of antlers in deer (*Cervus elaphus* L.). *Folia Biol.* 133–143.
- Jang, H.Y., Kim, Y.H., Kim, B.W., Park, I.C., Cheong, H.T., Kim, J.T., Park, C.K., Kong, H.S., Lee, H.K., Yang, B.K., 2010. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 943–950. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01466.x>
- Juliá, J.P., Peris, S.J., 2010. Do precipitation and food affect the reproduction of brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (G. Fischer 1814) in conditions of semi-captivity? *An. Acad. Bras. Cienc.* 82, 629–635. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652010000300010>
- Kennaway, D.J., Seamark, R.F., 1980. Circulating levels of melatonin following its oral administration or subcutaneous injection in sheep and goats. *Aust. J. Biol. Sci.* 33, 349–353. <https://doi.org/10.1071/BI9800349>
- Kokolis, N., Theodosiadou, E., Tsantarliotou, M., Rekkas, C., Goulas, P., Smokovitis, A., 2000. The effect of melatonin implants on blood testosterone and acrosin activity in spermatozoa of the ram. *Andrologia* 32, 107–114. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2000.00336.x>

- Kozioł, K., Broda, D., Romerowicz-Misielak, M., Nowak, S., Koziorowski, M., 2020. Melatonin concentration in peripheral blood and melatonin receptors (MT1 and MT2) in the testis and epididymis of male roe deer during active spermatogenesis. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.025>
- Leeuwenberger, F., Oliveira-Cabral, I., Lara-Resende, S., 1999. Gray brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the Brazilian savanna.
- Lin, C.-C., Pei, K.J.-C., Wang, P.S., Liu, B.-T., 2014. Evidence of higher levels of testosterone during the velvet period in muntjac than in other cervids. *Theriogenology* 81, 403–406. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.011>
- Lincoln, 1987, 1987. Long-term stimulatory effects of a continuous infusion of LHRH agonist on testicular function in male red deer (*Cervus elaphus*) in: *Reproduction* Volume 80 Issue 1 (1987). *Reproduction* 257–261.
- Lincoln, G.A., 1992. Biology of antlers. *J. Zool.* 226, 517–528. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1992.tb07495.x>
- Lincoln, G.A., 1985. Seasonal breeding in deer., in: Fennessy, P.F., Drew, K.R. (Eds.), *Biology of Deer Production*. Royal Society of New Zealand Wellington Bulletin, Wellington, pp. 165–179.
- Loudon, A.S., Curlewis, J.D., 1988. Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (*Axis axis*). *J. Reprod. Fertil.* 83, 729–38. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0830729>
- MacNamara, M., Eldridge, W., 1987. Behavior and reproduction captive pudu (*Pudu puda*) and red brocket (*Mazama americana*), a descriptive and comparative analysis., in: Wemmer, C. (Ed.), *Biology and Management of the Cervidae*. Smithsonian Institution, Washington DC, pp. 371–386.
- Mayor, P., Bodmer, R.E., López-Béjar, M., López-Plana, C., 2011. Reproductive biology of the wild red brocket deer (*Mazama americana*) female in the Peruvian Amazon. *Anim. Reprod. Sci.* 128, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.09.009>
- Merino, M.L., Gonzales, S., Leeywenberg, F., Rodrigues, F.H.G., Pinder, L., Tomás, W.M., 1997. Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), in: Duarte, J.M.B. (Ed.), *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastoceros, Ozotoceros e Mazama*. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Jaboticabal, pp. 42–58.
- Monfort, S.L., Brown, J.L., Bush, M., Wood, T.C., Wemmer, C., Vargas, A., Williamson, L.R., Montali, R.J., Wildt, D.E., 1993. Circannual inter-relationships among reproductive hormones, gross morphometry, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*) . *J. Reprod. Fertil.* 98, 471–480.
- Mylrea, G.E., 1992. Natural and artificial breeding of farmed chital deer (*Axis axis*) in Australia. University of Sydney.
- Nichi, M., 2009. Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.
- Pereira, R.J.G., 2010. Male reproduction., in: Duarte, J.M.B., González, S. (Eds.), *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Funep, Jaboticabal, pp. 39–50.
- Pereira, R.J.G., Crivelaro, R.M., Tanaka, Y., Blank, M.H., Duarte, J.M.B., 2020. Asynchronous breeding in red brocket deer (*Mazama americana*) – Seasonal changes in male reproductive characteristics, seminal parameters, androgen levels and antler cycle. Unpublished paper. *Mamm. Biol.*
- Pereira, R.J.G., Duarte, J.M.B., Negrão, J.A., 2005. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). *Theriogenology* 63, 2113–2125. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.014>
- Pereira, R.J.G., Zanetti, E.S., Polegato, B.F., 2010. Female Reproduction, in: Duarte, J.M.B., Gonzales, S. (Eds.), *Neotropical Cervidology*. FUNEP - IUCN, Jaboticabal, pp. 45–57. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0660-4.00040-5>
- Petterborg, L.J., Reiter, R.J., 1980. Effect of photoperiod and melatonin on testicular development in the white-footed mouse *Peromyscus leucopus*. *J. Reprod. Fertil.* 60, 209–212.

- Pinder, L., 1997. Niche overlap among brown brocket deer, pampas deer and cattle in the Pantanal of Brazil. University of Florida.
- Pinder, L., Leeuwenberger, F., 1997. Veado-catingueiro, in: Duarte, J.M.B. (Ed.), *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Jaboticabal, pp. 60–68.
- Polegato, B.F., 2004. Validação de método endócrino não invasivo para o monitoramento da fisiologia reprodutiva e da atividade dos glicocorticoides em cervídeos neotropicais. Universidade Estadual Paulista.
- Pool, K.R., Rickard, J.P., Pini, T., de Graaf, S.P., 2020. Exogenous melatonin advances the ram breeding season and increases testicular function. *Sci. Rep.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66594-6>
- Poulton, A.L., 1988. The proposed use of melatonin in controlled sheep breeding. *Aust. J. Biol. Sci.* 41, 87–96. <https://doi.org/10.1071/BI9880087>
- R CoreTeam, 2020. R: A language and environment for statistical computing. [WWW Document]. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Ramos, H.G.C. da C., 2004. O ciclo do chifre do cervo-do-pantanal: aspectos ecológicos e reprodutivos 101.
- Redford, K.H., 1987. *Biology and management of the Cervidae*. Washington DC.
- Reiter, R.J., Rosales-Corral, S.A., Manchester, L.C., Tan, D.X., 2013. Peripheral reproductive organ health and melatonin: Ready for prime time, *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms14047231>
- Reiter, R.J., Tan, D.-X., Osuna, C., Gitto, E., Karger, S., 2000. Actions of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress A Review, *J Biomed Sci*.
- Rodrigues, F.H.G., 1996. Historia natural e biologia comportamental do veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) em cerrado do Brasil Central. [s.n.], Campinas.
- Ruiz-García, M., Randi, E., Martínez-Agüero, M., Alvarez, D., 2007. Relaciones filogenéticas entre géneros de ciervos neotropicales (Artiodactyla: Cervidae) mediante secuenciación de ADN mitocondrial y marcadores microsatelitales. *Rev. Biol. Trop. (International J. Trop. Biol.* 55, 723–741.
- Rust, C.C., Meyer, R.K., 1969. Hair color, molt, and testis size in male, short-tailed weasels treated with melatonin. *Science* (80-.). 165, 921–922. <https://doi.org/10.1126/science.165.3896.921>
- Schneider, M., 1996. Densidade populacional, uso e estrutura dos habitats de cervídeos do gênero *Mazama* (Mammalia, Artiodactyla) na Estação Ecológica e Aracuri, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Sponton, L.F., Romero, M.R., Galindo, D.J., Sandoval, E.D., Duarte, J.M.B., 2017. Annual Variations in fecal androgens metabolites and antler cycle of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*), in: Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. São José dos Campos, pp. 110–111.
- Tanaka, Y., Sandoval, E.D.P., Duarte, J.M.B., 2019. Non-homogeneous distribution of steroids in fecal pellets: An example in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) with progesterone metabolites. *Gen. Comp. Endocrinol.* 282, 113206. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.06.010>
- Tomás, W.M., 1995. Seasonality of the antler cycle of Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) from the Pantanal Wetland, Brazil. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 30, 221–227. <https://doi.org/10.1080/01650529509360960>
- Tresguerres, J.F.A., Mendez, L.F.P., Lopez-Calderon, A., Esquilifino, A.I., 1984. Prolactin Inhibitory Hypothalamic-Pituitary-Testicular. *J. Endocrinol.* 105, 423–427.
- Ungerfeld, R., González-Pensado, S., Bielli, A., Villagrán, M., Olazabal, D., Pérez, W., 2008. Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): A review. *Acta Vet. Scand.* 50, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-16>
- Versiani, N.F., Pereira, R.J.G., Duarte, J.M.B., 2009. Annual variations in fecal androgen metabolites and antler cycle of captive red brocket bucks (*Mazama americana*) in Southeast Brazil. *Eur. J. Wildl. Res.* 55, 535–538. <https://doi.org/10.1007/s10344-009-0278-z>
- Webb, S.D., 2000. Evolutionary history of new world Cervidae, in: *Fossil Record, Behavioral Ecology, Systematics, and Conservation*. pp. 38–64.

- Yamauchi, K., Hamasaki, S., Takeuchi, Y., Mori, Y., 1997. Assessment of reproductive status of Sika deer by fecal steroid analysis. *J. Reprod. Dev.* 43, 221–226. <https://doi.org/10.1262/jrd.43.221>
- Yang, W.C., Tang, K.Q., Fu, C.Z., Riaz, H., Zhang, Q., Zan, L.S., 2014. Melatonin regulates the development and function of bovine Sertoli cells via its receptors MT1 and MT2. *Anim. Reprod. Sci.* 147, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.03.017>

11. Supplementary material

Incremental change (%) per individual among Days in sperm motility, membrane integrity and major defects

We calculated individual percentage difference of Treated and Control group for sperm motility, membrane integrity and major defects along the experimental period (Figure 4). For incremental change for each parameter, we considered that all individuals from Control and Treated Group started from 0% in order to equalize them for the following difference values. To calculate the percentage differences, the value of the given parameter from Day 30 was subtracted from Day 0, Day 60 to Day 30 and Day 90 to Day 60. All values are demonstrated in percentage (%). For male A, B and C, the major defects decline during the melatonin treatment which corresponds to D0 to D30 and D30 to D60, and these values increase during D60 to D90, which is the period of melatonin treatment cessation. For membrane integrity, the males A, B, D tend to increase during the melatonin period, and the highest percentage was observed at D30 to D60, and a reduction at D60 to D90. The Control group did not show any improvement in the membrane integrity during the same period. For sperm motility, males A, B and C showed an improvement in this parameter at D0 to D30, whereas the Control group tend to not show any pattern in any moment.

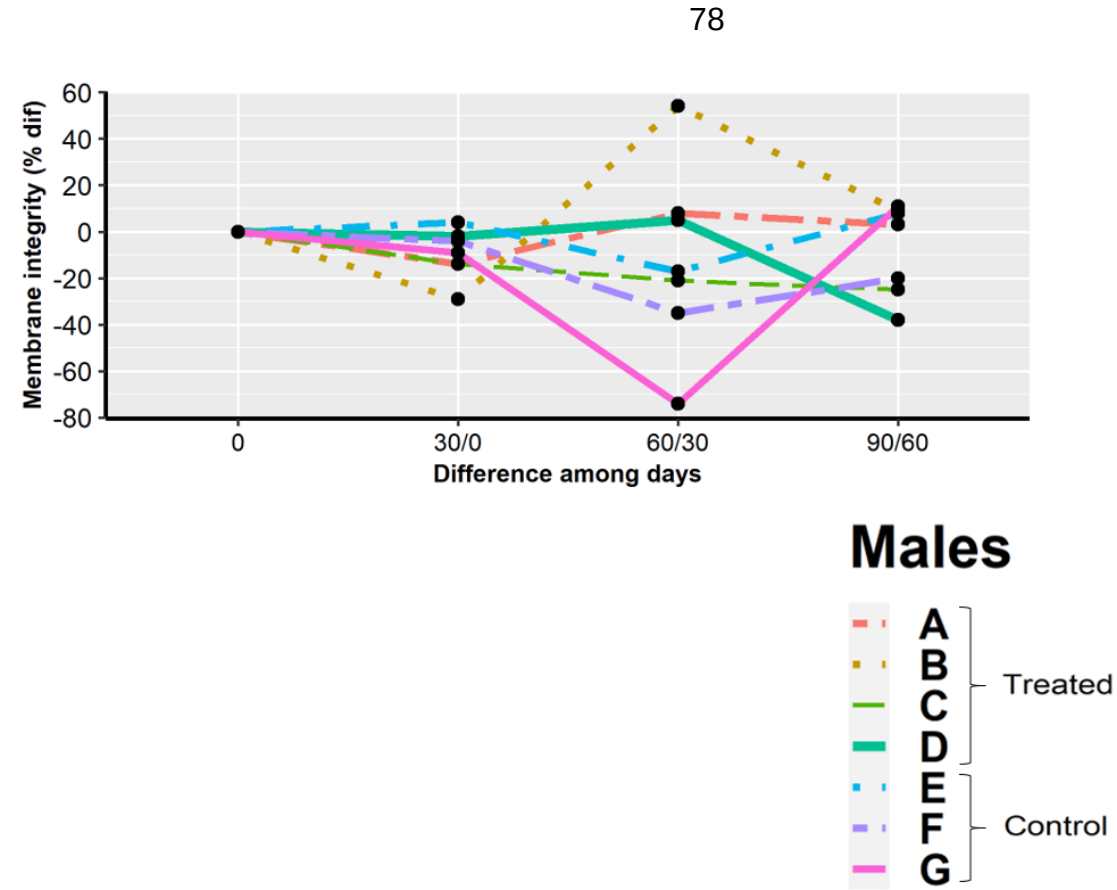
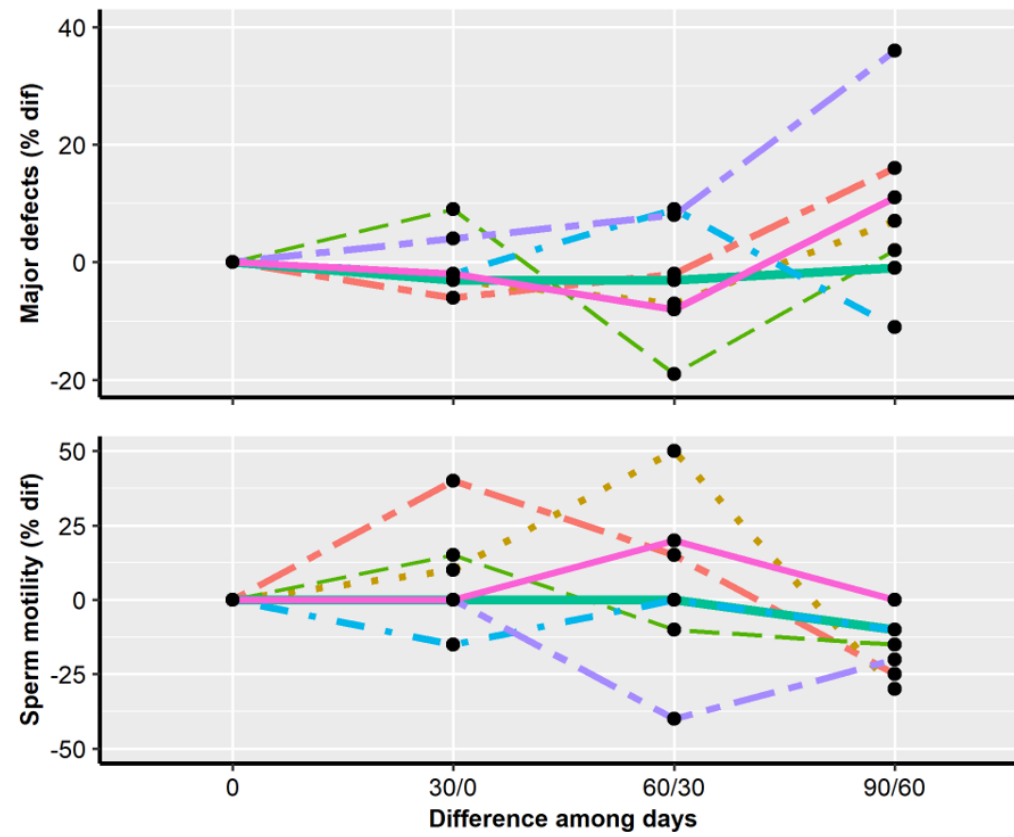


Figure 4 Differences in percentage among days/per individual from Treated and Control group. The major defects decline during the melatonin treatment which corresponds to 30/0 and 60/30, and these values increase during 90/60, which is the period of melatonin treatment cessation for male A, B and C. For membrane integrity, the values for males A, B, D tend to increase during the melatonin period, and the highest percentage was observed at 60/30, and a reduction at 90/60. The Control group did not show any improvement in the membrane integrity during the same period. For sperm motility, males A, B and C showed an improvement in this parameter at 30/0, whereas the Control group tend to not show any pattern

CAPÍTULO 3 – Considerações finais sobre a dissertação

De forma geral, o estudo traz um avanço no entendimento acerca da influência do fotoperíodo na reprodução de *M. gouazoubira*, permitindo sugerir que o fotoperíodo não tem efeito em seu ciclo reprodutivo.

No entanto, apesar dessa sugestão feita nesse presente estudo, sugerimos a execução de futuros trabalhos fisiológicos a níveis moleculares (como a descrição da presença receptores para melatonina nas células testiculares e espermáticas,, descrição do envolvimento da kisspeptina e seus receptores na estimulação de GnRH), a níveis endócrinos (perfil anual de prolactina e de melatonina, já que ambas podem ter influência no ciclo reprodutivo das espécies) e a níveis anatômicos (explorar a existência de células tronco neurais do hipotálamo que podem ser responsivas e estimuladas com fotoperíodo, como descrita em ovinos) para mostrar evidências claras de que essa espécie não é responsiva ao fotoperíodo.