

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRAUTERINA POR
VIDEOLAPAROSCOPIA EM VEADO-CATINGUEIRO
(*Mazama gouazoubira*) COM SÊMEN CONGELADO**

Ellen de Fátima Carvalho Peroni

Médica Veterinária

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRAUTERINA POR
VIDEOLAPAROSCOPIA EM VEADO-CATINGUEIRO
(*Mazama gouazoubira*) COM SÊMEN CONGELADO**

Ellen de Fátima Carvalho Peroni

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Coorientadora: Dra. Eveline dos Santos Zanetti

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

2013

Peroni, Ellen de Fátima Carvalho

P453i Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), com sêmen congelado / Ellen de Fátima Carvalho Peroni. – – Jaboticabal, 2013

ix, 56 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

Coorientadora: Eveline dos Santos Zanetti

Banca examinadora: Maria Emilia Franco Oliveira, Maria Denise Lopes

Bibliografia

1. Biotecnologia da reprodução. 2. Cervídeo neotropical. 3. Dispositivo intravaginal de progesterona. 4. Progestágenos fecais. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.294

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ellen de Fátima Carvalho Peroni - Nascida na cidade de Franca- São Paulo em 25 de janeiro de 1987, iniciou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade de Franca - UNIFRAN, em março de 2005. Durante a graduação desenvolveu trabalho de iniciação científica, como bolsista FAPESP, intitulado “Níveis séricos da troponina cardíaca I em cães com degeneração mixomatosa da valva mitral, submetidos à anuloplastia valvar mitral por plicatura externa” sob orientação do Prof. Dr. James Newton Bizetto Meira de Andrade. Em agosto de 2011 iniciou o mestrado em Medicina Veterinária com ênfase em reprodução animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e coorientação da Dra. Eveline dos Santos Zanetti, com bolsa FAPESP.

***"O segredo da mudança é focalizar toda
energia, não lutando contra o velho, mas
construindo o novo."***

Sócrates

Dedico

*Aos meus pais, Paulo e Liura, pelo amor,
apoio e presença constante em minha vida;*

e

Aos animais, em especial Pelúcia e Bebel.

AGRADECIMENTOS

ÀS INSTITUIÇÕES

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP pela estrutura e oportunidade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado e reserva técnica;

Ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da FCAV/UNESP pela estrutura, apoio técnico e por fornecer os animais para realização deste estudo;

Ao Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP, em especial Prof. Dr. José Antonio Visintin, Prof.^a Dra. Mayra Elena Ortiz D’Ávila Assumpção e a Dra. Camilla Mota Mendes, pela realização das análises de índice de fragmentação de DNA;

AOS PROFESSORES E PROFISSIONAIS

Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela orientação e confiança, por estar sempre presente, ajudando em todos os procedimentos de contenção e anestesia;

Dra. Eveline dos Santos Zanetti, pela coorientação, carinho, acolhimento, conselhos, respeito, dedicação e paciência, por toda ajuda na elaboração, desenvolvimento e finalização deste estudo;

Prof. Dr. Júlio Carlos Canola pela realização do diagnóstico de gestação das fêmeas;

Dra. Maria Emilia Franco Oliveira e Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano pela realização das ultrassonografias para análise folicular;

Antônio Carlos Lima de Andrade (Beterraba) e Gustavo Alan Siniscalchi, pela ajuda nas contenções, alimentação e carinho pelos “meus animais”;

João Boer, pela convivência e ajuda no laboratório;

AOS FAMILIARES

Meu Pai, pela inspiração, apoio e amor incondicional, por ser meu porto seguro e meu exemplo sempre;

Minha Mãe, pelo amor, dedicação, por todas as noites de estudo ao meu lado, pelo exemplo de força e dedicação a família;

Meus irmãos Paulinho e Vico e cunhadas Ana e Nai, pela companhia, amor, sorrisos e chatices;

Meus avós Wilma e Olwando, Orestes e Odília (*in memorian*), por estarem tão presentes mesmo ausentes, por apoiarem, entenderem e “não entenderem” tudo o que eu fiz;

Meus tios e tias, pelo exemplo de união e amor a família;

Minha madrinha Mara, pelas orações, conselhos, confiança e dedicação;

Meus primos Lele, Isa, Tafinha, Thaise, Yan, Carol, João Pedro, João Victor, Pedro, Paulinha, Neto, Maísa, Lívia e a pequena Valentina, por todos os momentos felizes que recarregam as minhas energias;

Meus primos Rubens e Arlete, por terem me acolhido com tanto carinho, pela preocupação e convivência;

Graça e Gaci, por todas as marmitas maravilhosas e por me ajudarem a por ordem nas minhas bagunças;

AOS AMIGOS

Fábio pela parceria, conselhos, paciência, por todas as risadas, pela companhia tantas meias noites para monitorar cio, pelo carinho, amor e respeito;

Fer e Kenia, pela amizade incondicional, “momentos pin-ups”, risadas e choros, por entenderem minha ausência e me amarem mesmo assim;

André (Deco), pela amizade e compreensão, por nunca se esquecer de mim e estar sempre disposto a me ajudar e animar;

Vand e Eve pelos conselhos, risadas, trekking e tantos “momentos minimamente felizes”!

Aninha, Onçona e Iara, pela amizade mesmo que distante em alguns momentos mas sempre prontas a me escutar, aconselhar a acalmar;

Chico, pelas cervejas que eu paguei (não?), pelas risadas, caminhadas, pela companhia, amizade, por ter um dos maiores corações que já conheci;

Pici, Barraka, Nazira, Janota e Júlia, pela amizade, ajuda nos procedimentos de contenção, análise seminal, dosagens hormonais, monitoramento de cios e cirurgias, pelos momentos de discussão de trabalhos, pelas festas e muitas risadas na reprodução;

Aos integrantes e ex-integrantes do NUPECCE, Pedro, Márcio, Max, Granada, Josi, Mirela, Livia, Marinão, Kokotinha, Janaína, Caju, Lincy, Mau-mau, Piauí, 100-nariz e Lumbriga, pela convivência no trabalho e momentos de descontração com chopes e batatas-fritas;

Ju e Rao por me acolherem com tanto carinho no início da minha estadia em Jabuka;

República Nazarena e agregados, em especial Janota, Sumô e Pará, pela parceria, amizade, bares da rodada e piadas oportunas;

República Biozona, integrantes, ex-integrantes e agregados, Spinha, Terezinha, Rafa, Tanga, Natalie, Bauru, Bizarro, Maria, Frede e Pixa, por me receberem na “família biozona” com tanto carinho, pela amizade e muitas risadas!

AOS ANIMAIS

Aos Cães Dara, Malu, Stallone e Melzinha, pela compressão e amor;

Aos veados catingueiros, especialmente Aninha, Fauna, Bebel, Pelúcia, Duda, Bis, Ice, Piauí e Sensato, por “serem” o material para este estudo, por me trazerem paz e desespero em tantos momentos.

APOIO FINANCEIRO

Esse projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo nº. 2011/03509-6, no período de agosto de 2011 a julho de 2013.

O presente trabalho está vinculado ao Projeto de Pesquisa Temático – Os veados cinza do Brasil (Mammalia; Cervidae; Mazama): A busca das variantes genéticas, morfologias e ecológicas para explicar a complexa taxonomia e evolução do grupo (Processo FAPESP nº 10/50748-3) avaliado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA) desta unidade de ensino, que certificou sua conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sobre processo número 180/11.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. A espécie <i>Mazama gouazoubira</i>	4
3.2. Protocolos de sincronização de estro.....	7
3.3. Técnicas de inseminação artificial	12
3.4. Avaliação do sêmen	14
3.5. Dosagem hormonal de progestágenos fecais.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Animais.....	17
4.2. Período e local de estudo.....	18
4.3. Período de adaptação.....	18
4.4. Processamento e avaliação do sêmen	18
4.4.1. Motilidade e vigor espermático.....	19
4.4.2. Morfologia espermática	20
4.4.3. Integridade de acrossoma.....	20
4.4.4. Integridade de membrana plasmática.....	21

4.4.5. Índice de Fragmentação de DNA (IFD)	21
4.4.6. Teste de termorresistência (TTR)	24
4.5. Controle do ciclo estral	24
4.6. Identificação do estro	24
4.7. Inseminação artificial por videolaparoscopia.....	25
4.8. Diagnóstico de gestação	27
4.9. Indução de luteólise	27
4.10. Dosagem hormonal de progestágenos fecais	29
4.10.1. Colheita de fezes.....	29
4.10.2. Processamento das fezes.....	29
5. RESULTADOS	32
5.1. Análise seminal	32
5.2. Monitoramento do estro e inseminação artificial	33
5.3. Concentração de progestágenos fecais.....	35
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÕES	44
8. IMPLICAÇÕES.....	44
9. REFERÊNCIAS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	Benzoato de estradiol
CIDR[®]	“Controlled internal drug release”
CL	Corpo lúteo
CO₂	Dióxido de carbono
DIP	Dispositivos intravaginais de progesterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EIA	Enzimaimunoensaio
EPM	Erro padrão da média
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio folículo estimulante
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IFD	Índice de fragmentação do DNA
IAUL	Inseminação artificial intrauterina laparoscópica
IAUTC	Inseminação artificial intrauterina transcervical
LAI	Intrauterine artificial insemination
LH	Hormônio luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
NUPECCE	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PGF2α	Prostaglandina F2 α
SCDA	Suscetibilidade da Cromatina à Desnaturação Ácida
TTR	Teste de termorresistência
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VE	Valerato de estradiol

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Exemplar fêmea da espécie *Mazama gouazoubira*; (B) Distribuição geográfica desta espécie.5
- Figura 2.** Gráficos de AlfaTYlog obtidos pelo Ensaio de Suscetibilidade da Cromatina à Desnaturação Ácida (SCDA) do sêmen de *Mazama gouazoubira*. (A) Controle negativo (B) Controle positivo (C) Mistura 1:1 dos controles negativo e positivo, respectivamente.23
- Figura 3.** (A1) Dispositivo de progesterona (A2) Aplicador do dispositivo de progesterona (B e C) Montagem do dispositivo no aplicador (D) Higienização da região perivulvar (E) Introdução do aplicador na vagina (F) Completa introdução do aplicador (G) Colocação do dispositivo no interior da vagina25
- Figura 4.** (A) Administração intra-venosa de fármacos anestésicos em uma fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* contida fisicamente (B) Animal intubado, mantido em plano anestésico em decúbito dorsal (C) Tricotomia da região abdominal (D) Anti-sepsia cirúrgica (E) Incisão da pele com o bisturi (F) Insuflação da cavidade abdominal com CO₂ após colocação de trocâter e posicionamento do animal a 45° (G) Acoplamento da micro-câmera à óptica após a segunda trocaterização (H) Introdução do aplicador de sêmen na bainha lateral (I) Introdução do sêmen, através da pipeta de inseminação, nos cornos uterinos (CD = corno direito; CE = corno esquerdo; PI = pipeta de inseminação).28
- Figura 5.** (A) Amostras de fezes secas sendo trituradas com martelo de borracha (B) Amostras já trituradas armazenadas em tubos previamente identificados (C) Extratos fecais armazenados em tubos individuais identificados (D) Procedimento de dosagem por enzaimunoensaio.31
- Figura 6.** Imagens ultrassonográficas por via transabdominal das quatro fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*, que não apresentaram estro comportamental após as inseminações artificiais. Setas indicam os embriões. (A) Fêmea 2 - procedimento 2, com 55 dias de gestação (B) Fêmea 4 - procedimento 4, com 46 dias de gestação (C) Fêmea 4 - procedimento 8, com 50 dias de gestação (D) Fêmea 5 - procedimento 9, com 47 dias de gestação34
- Figura 7.** Concentrações de progestágenos fecais após oito procedimentos de sincronização de estro e inseminação artificial (IA) em cinco fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*. Dia 1 = dia seguinte ao fim do tratamento de sincronização (retirada do dispositivo de progesterona). Barras pretas indicam estro comportamental e setas indicam o dia da IA.36
- Figura 8.** Concentrações médias ($\pm$ EPM) de progestágenos fecais nas fases de estro (dia do estro ou dia posterior ao estro comportamental em cada procedimento) e luteal (três últimos dias de colheita de cada procedimento), considerando os procedimentos de sincronização de estro/inseminação artificial no grupo total de animais (gestantes e não gestantes, n=7), no grupo dos animais gestantes (n=4) e no grupo dos animais não gestantes (n=3) da espécie *Mazama gouazoubira*. Letras diferentes (a e b) entre colunas de um mesmo grupo representam diferença significativa ($p < 0,05$) e letras diferentes (c e d) entre colunas de grupos diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de student.38
- Figura 9.** Concentração de progestágenos fecais de duas fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* submetidas a indução da luteólise após o diagnóstico de gestação. Seta indica o dia da aplicação de cloprostenol sódico. Barra indica estro comportamental. Cinza: Fêmea 2 - procedimento 2; Preto: Fêmea 4 - procedimento 4.39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedimentos de inseminação artificial (IA) realizados em algumas espécies de cervídeos (adaptado de Morrow et al. 2009)	9
Tabela 2. Identificação das fêmeas da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> utilizadas no estudo, assim como data e distribuição dos procedimentos de inseminação artificial realizados.....	17
Tabela 3. Avaliação comparativa de amostras de sêmen (Amostra 1, 2 e 3) de três animais de vida livre da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> com a finalidade de escolher a melhor para o uso nos procedimentos de inseminação artificial.	32
Tabela 4. Período de monitoramento do estro comportamental de cada fêmea da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> e a duração média do ciclo estral.....	33
Tabela 5. Dia do ciclo estral das fêmeas da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> no início do protocolo de sincronização (CIDR [®] por 8 dias associado a uma aplicação de cloprostenol no dia 8) e seus subsequentes resultados nos nove procedimentos de inseminação artificial.....	35

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRAUTERINA POR VIDEO LAPAROSCOPIA EM VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*) COM SÊMEN CONGELADO

RESUMO - A região neotropical passa por um período crítico em termos de perda de biodiversidade. Dentro deste contexto, há um crescente aumento do número de espécies de cervídeos neotropicais sofrendo redução em seu tamanho populacional, podendo ocasionar ausência de fluxo gênico e consequente diminuição da variabilidade genética e à endogamia, afetando o desempenho reprodutivo e aumentando o risco de extinção. Neste contexto, o uso das biotécnicas da reprodução nos animais silvestres será útil para programas de conservação das mais diversas espécies. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade da técnica de inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia (IAUL), com sêmen congelado, na espécie *M. gouazoubira*. Foram utilizadas cinco fêmeas adultas e dois machos adultos inteiros, da espécie *M. gouazoubira*, sendo que, quatro fêmeas foram submetidas a dois procedimentos de IAUL com intervalo aproximado de 5 meses e uma fêmea passou por um procedimento, totalizando nove inseminações. As fêmeas receberam um dispositivo intravaginal contendo 0,33g de progesterona, cuja permanência foi de oito dias. No momento da retirada do dispositivo, foi administrado 265µg (1mL) de cloprostenol sódico. Oito horas após a retirada do dispositivo as fêmeas passaram a ser monitoradas (com rufiões) quanto a manifestação do estro comportamental a cada seis horas. Os procedimentos de IAUL foram realizados 12-14 horas após início do estro e os animais receberam uma aplicação de 2,5mg (2mL) de hormônio luteinizante (LH). As inseminações foram realizadas com sêmen descongelado, na concentração de 50×10^6 espermatozoides/dose, envasados em palhetas de 0,25mL, com motilidade e vigor mínimos de 30% e 2, respectivamente, pós descongelação. A avaliação da presença do corpo lúteo (CL) funcional foi feita com a dosagem hormonal de metabólitos fecais de progesterona por um período de 20 dias após a retirada do dispositivo de progesterona. O diagnóstico da gestação foi realizado entre 45-55 dias após a IAUL, por ultrassonografia transabdominal. Apenas oito procedimentos de IAUL puderam ser avaliados quanto a porcentagem

de gestação devido ao óbito de uma fêmea logo após o segundo procedimento de inseminação, resultando em 50% (4/8) de gestação. O tempo médio entre a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e o início do estro comportamental foi de $73,5h \pm 6,9$ (50-98h), enquanto a duração média do estro foi de $27,7h \pm 2,2$ (18-36h). O tempo médio entre a retirada do dispositivo e a IAUL foi de $87,2h \pm 6,9$ (64-112h). Houve diferença significativa nas concentrações médias de progestágenos fecais entre o período de estro comportamental e o período médio da fase luteal, sugerindo a ocorrência de ovulação e presença de CL funcional. A IAUL com sêmen congelado, nas condições do presente experimento mostrou ser uma técnica eficiente para a espécie *M. gouazoubira*.

Palavras-chave: biotecnologia da reprodução, cervídeo neotropical, dispositivo intravaginal de progesterona, progestágenos fecais.

ARTIFICIAL INTRAUTERIN INSEMINATION BY VIDEOLAROSCOPY IN BROWN BROCKET DEER (*Mazama gouazoubira*) WITH FROZEN SEMEN

ABSTRACT – The neotropical region undergoes a critical period in terms of biodiversity loss. Within this context there is a rising increasing of neotropical deer species suffering a shrinking in its population. The population decreasing as well the gene flow absence can lead to the genetic variability reduction and endogamy, affecting the reproductive performance and increasing the extinction risk. In this context, the wild animal reproduction biotechnology knowledge might be useful to further conservation programs to several species. Thus, this work aim was evaluate the videolaparoscopic intrauterine artificial insemination technique (LAI), using frozen semen of *M. gouazoubira*. To the procedure, five adult females and two stags of *M. gouazoubira* were used. Four females were submitted two LAI procedures in a five months interval and one female suffered one procedure, totalizing nine inseminations. The females received an intravaginal device containing 0.33g of progesterone fortnight days. At the device removal time, 265µg (1mL) of sodium cloprostenol was i.m. administred. Eight hours later the females started being monitored (with teasers) regarding to the behavioral estrus every six hours. The LAI procedures were done 12-24 hours after the estrus beginning, when the animals received 2.5mg (2mL) of luteinizing hormone (LH). Inseminations were done using 0.25mL straws (50×10^6 espermatozoons/mL) of thawed semen, with minimal motility and vigor of 30% and 2, respectively, in the post thaw. The corpus luteum (CL) presence evaluation was done by progesterone fecal metabolites hormonal dosage. The gestation diagnostic was done from 45 to 55 days after LAI by transabdominal ultrasonography. Only eight LAI procedures were able to be evaluated regarding the gestation percentage due the death of one female just after the second insemination procedure, resulting in 50% (4/8) of gestation. The average time from the progesterone intravaginal device removal to the behavioral estrus beginning was $73.5h \pm 6.9$ (50-98h), while the average estrus length was $27.7h \pm 2.2$ (18-36h). The average time from the device removal to the LAI was $87.2h \pm 6.9$ (64-112h). There was significant difference in the fecal progestagens average concentrations between the behavioral estrus period and the luteal phase average period, suggesting the

ovulation occurrence and also the CL functional presence. The LAI using frozen semen, under the experimental conditions, presented to be an efficient technique to the *M. gouazoubira* specie.

Keywords: reproduction biotechnology, neotropical deer, progesterone intravaginal device, fecal progestagens.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A exploração de forma não sustentável do meio ambiente, prejudica os habitats e as populações que neles vivem (PIMENTEL et al., 2007). A perda de biodiversidade e os processos de fragmentação que o Brasil tem sofrido obrigam as espécies de animais a ficarem restritas a pequenos espaços, dificultando a sustentabilidade das populações de vida livre e provocando segregação entre populações, diminuição de troca gênica e diversidade genética, aumento da endogamia e maior risco de extinção (DUARTE, 2005). Segundo Roldan et al. (1998), populações isoladas têm pouca ou nenhuma troca de material genético entre elas, ocorre dessa forma o acasalamento de animais estreitamente relacionados, aumentando a homozigose e depressão endogâmica. A falta de diversidade genética aumenta os riscos de transmissão de doenças hereditárias, defeitos congênitos e problemas de fertilidade.

A conservação *in situ* é, sem dúvida, a melhor forma de conservar a fauna e a flora, porém, depende de fatores como o estabelecimento de políticas de governo e da educação ambiental, que podem ser atingidos apenas a longo prazo (WILSON, 1997). Por outro lado, a conservação *in situ* pode se tornar ineficiente em populações muito reduzidas ou quando a maioria dos indivíduos remanescentes está localizada em áreas desprotegidas. Nestas situações, a conservação *ex situ* pode ser a única alternativa para evitar a extinção desses animais (PRIMACK e RODRIGUES, 2002). Na tentativa de manter a diversidade genética, a colheita de materiais biológicos de animais que ainda não se encontram ameaçados de extinção é tão importante quanto em espécies ameaçadas, que geralmente já perderam a sua diversidade (DUARTE e GARCIA, 1995).

Durante as três últimas décadas, os bancos de germoplasma surgiram como uma estratégia eficaz para a conservação *ex situ* de material genético (WILSON, 1997; HIEMSTRA et al., 2006), favorecendo a preservação da diversidade genética de populações selvagens. A criopreservação e estocagem de gametas e embriões diminuem consideravelmente a necessidade de remover da natureza indivíduos geneticamente importantes (WILDT e WEMMER, 1999). Diminui, também, a

necessidade do transporte de animais adultos entre instituições (DUARTE e GARCIA, 1997) ou países, bem como problemas como o alto custo do transporte, o risco de óbito durante o mesmo e o tempo de quarentena (KRZYWINSKY, 1987). Os bancos genômicos, aliados às técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV) (COMIZZOLI et al., 2000) são fundamentais para os programas de conservação *in situ* e *ex situ* (HOLT E PICKARD, 1999). Em 1989, Wildt já considerava estas técnicas, juntamente com o monitoramento endócrino, úteis para a pesquisa básica, propagação animal e manutenção da diversidade genética.

Dentre estas técnicas, a TE e a IA são consideradas as mais promissoras para a conservação de espécies ameaçadas (PRIMACK e RODRIGUES, 2002), pois são mais eficientes, favorecem uma rápida disseminação de material genético (MORROW et al., 2009), possibilitam a contribuição genética igualitária para todos os indivíduos da próxima geração (JABBOUR et al., 1997) e ainda permitem a utilização de casais que apresentem incompatibilidade sexual (WILDT, 1989).

No entanto, o uso das biotecnologias da reprodução para preservação das espécies selvagens, incluindo cervídeos neotropicais, necessita de maior conhecimento sobre os aspectos básicos da biologia reprodutiva e de protocolos hormonais para controle do ciclo estral bem definidos, fatores decisivos para o sucesso das técnicas de reprodução assistida. Além disso, dificilmente os conhecimentos existentes para as espécies domésticas podem ser diretamente aplicados para as espécies selvagens (COMIZZOLI et al., 2000; WILDT et al., 1995). A IA em espécies de cervídeos comerciais é bastante estudada, porém esta tecnologia não é facilmente transferida para as espécies ameaçadas (ASHER et al., 1999). Segundo Asher et al. (2011), os cervídeos de pequeno porte estão claramente sub-representados nas pesquisas reprodutivas quando comparados aos cervídeos de produção, incluindo inúmeras espécies cujas populações são ameaçadas ou estão sob ameaça de extinção.

Desta forma, este estudo visa ampliar o conhecimento sobre a IA em cervídeos neotropicais, considerando o potencial desta técnica no auxílio da conservação e a deficiência de informações nestas espécies.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a viabilidade da técnica de inseminação artificial intrauterina videolaparoscópica com sêmen congelado na espécie *M. gouazoubira*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar amostras de sêmen descongeladas, de três animais, mantidas em botijões criogênicos para escolha de uma amostra de boa qualidade para utilização nos procedimentos de IA;

- Verificar a funcionalidade do CL através da dosagem de progestágenos fecais;

- Avaliar a eficiência do protocolo de sincronização de estro, através do acompanhamento do estro comportamental e das taxas de concepção.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A espécie *Mazama gouazoubira*

Os cervídeos estão descritos por 17 gêneros e 45 espécies (WALKER, 1991), pertencem a ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, infra-ordem Pecora, superfamília Cervoidea, família Cervidae, subfamília Odocoileinae e tribo Odocoileini (DUARTE e MERINO, 1997). Atualmente, são caracterizados pela diversidade notável na morfologia, fisiologia, ecologia e distribuição geográfica. Em particular, estratégias reprodutivas entre os cervídeos variam amplamente dentro e entre regiões (ASHER et al., 2011).

Podem ser encontrados na América, Europa, Ásia e norte da África (REDFORD e EISENBERG, 1992), além das regiões ocupadas por esses animais devido à introdução humana (NOWAK, 1991). Destas, 17 espécies são cervídeos neotropicais e segundo a classificação da IUCN (2012) uma espécie está classificada como ameaçada, nove como vulneráveis, uma como preocupante, três como dados deficientes e apenas três incluídas como pouco preocupantes. No Brasil, são descritas oito espécies de cervídeos: *Blastocerus dichotomus*, *Odocoileus virginianus*, *Ozotoceros bezoarticus* e cinco espécies do gênero *Mazama* (*M. americana*, *M. bororo*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga*) (REIS et al., 2010). Este gênero é representado por indivíduos de porte médio a pequeno, onde os machos apresentam chifres curtos, não ramificados e pontiagudos (EISENBERG e REDFORD, 1999). Segundo Tiepolo e Tomas (2006), a taxonomia desse gênero permanece incerta, e parece estar em plena evolução e diversificação (DUARTE e MERINO, 1997).

Dentro do gênero *Mazama*, escolheu-se o veado-catingueiro (*M. gouazoubira*) (Figura 1A) como modelo experimental por ser a espécie mais abundante no Brasil (DUARTE, 1996). Está classificada pela IUCN (2012) como “pouco preocupante”, embora as populações estejam em declínio onde entram em contato com a população humana. Nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, é

considerada em perigo e vulnerável, respectivamente (TIEPOLO e TOMAS, 2006). São animais de pequeno porte, com peso entre 13Kg e 20,5Kg, altura de 35-65 centímetros e comprimento variando de 910-1.034 centímetros (REDFORD e EISENBERG, 1992). Possuem coloração bastante variável, reflexo dos ambientes que ocupam (PINDER e LEEUWERBERG, 1997), podendo variar do cinza escuro ao marrom avermelhado, as orelhas são grandes e arredondadas e algumas partes do corpo são brancas (TIEPOLO e TOMAS, 2006), uma pinta branca acima dos olhos pode ser vista na maioria dos indivíduos dessa espécie. Ocupa vários tipos de habitats, desde cerrados fechados até áreas ocupadas pela agricultura, necessitando apenas que estejam disponíveis pequenas áreas florestadas para seu abrigo (PINDER e LEEUWENBERG, 1997). Sua distribuição vai desde o Sul do Uruguai até o Norte do estado do Mato Grosso no Brasil, e desde a cordilheira dos Andes até o Atlântico (BLACK-DECIMA et al., 2010) (Figura 1B), com exceção da floresta amazônica onde é substituído por *M. nemorivaga* (DUARTE, 1996).

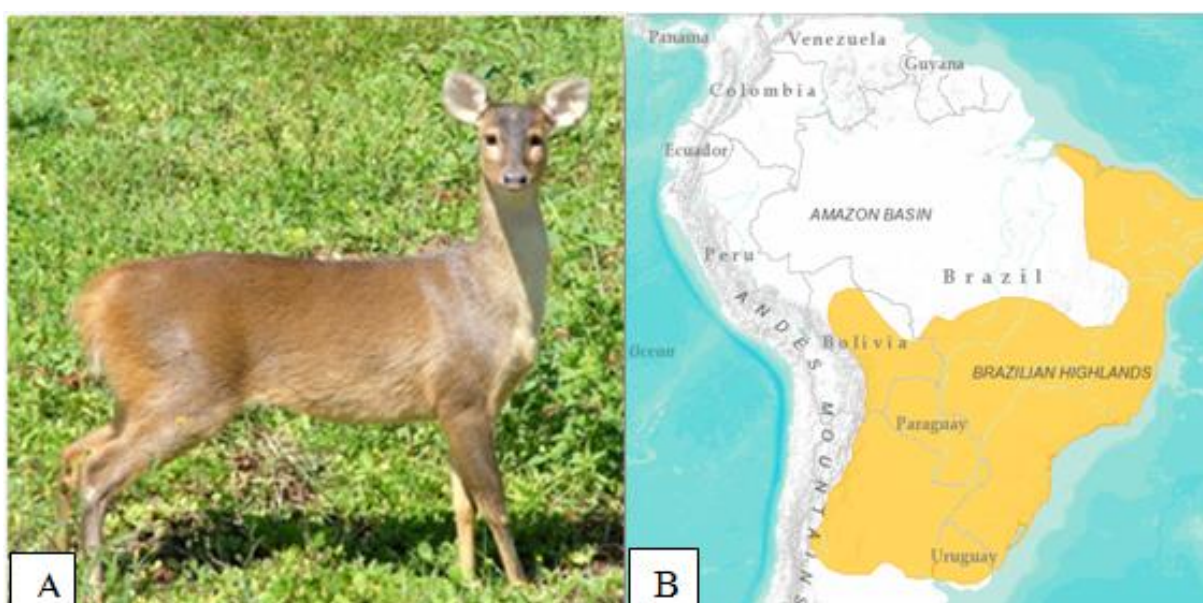


Figura 1. (A) Exemplar fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* (Foto: J.M.B. Duarte); **(B)** Distribuição geográfica desta espécie. (Fonte: IUCN 2012)

A reprodução dos cervídeos é afetada diretamente pela disponibilidade alimentar e nutricional ao longo do ano, porém a falta de um período criticamente pobre em termos de recursos alimentares permite a reprodução em todos os meses do ano para o veado-catingueiro, tanto nas savanas quanto nas florestas pluviais (PINDER e LEEUWENBERG, 1997; BARROZO et al., 2001; PEREIRA et al., 2010). Sua dieta inclui frutos, flores, fungos, gramíneas, leguminosas e outros tipos de arbustos e ervas (TIEPOLO e TOMAS, 2006). São solitários, reunindo-se ao sexo oposto apenas para acasalar (PINDER e LEEUWENBERG, 1997). As fêmeas da espécie são uníparas (TOMAS et al., 2010), embora a ocorrência de gêmeos tenha sido descrita por Sadleir (1987) e Whitehead (1993). Os filhotes nascem com pintas brancas no dorso e nas laterais do corpo (DUARTE e MERINO, 1997). O período de gestação é de 208 a 215 dias, com ocorrência de estro pós-parto, refletindo a falta de estacionalidade reprodutiva (PEREIRA et al., 2006a).

Segundo Pereira et al. (2010), as pesquisas sobre a reprodução de fêmeas de cervídeos neotropicais são poucas e, na sua maioria, são provenientes de animais criados em cativeiro ou de indivíduos translocados para regiões temperadas. Além disso, é importante ressaltar que a maior parte deste conhecimento é baseada em dados de observação, com escassos relatos empregando análises endócrinas do ciclo reprodutivo.

Em geral, as fêmeas de cervídeos atingem a maturidade sexual por volta dos 18 meses, dependendo da disponibilidade de alimentos (PUTMAN, 1988). Espécies menores do gênero *Mazama* podem atingir maturidade sexual mais cedo (PEREIRA et al., 2010). Não há muitas informações sobre o ciclo reprodutivo de *M. gouazoubira*. Em 1992, Muller e Duarte descreveram ciclos estrais de 21 dias em média. Santos et al. (2001) observaram que as durações dos ciclos desta espécie variaram de 18 a 30 dias (média $24 \pm 3,054$) com duração do estro entre 12 e 51,45 horas. Baseado em estudos comportamentais, Duarte e Garcia (1995) descreveram a duração do estro entre 24 a 36 horas. Por meio de análises comportamentais em conjunto com dosagens hormonais, Pereira et al. (2006a) encontraram períodos médios de $26,9 \pm 1,7$ dias de ciclo (21 a 37 dias), divididos, em média, $24,6 \pm 1,4$ dias de fase luteal (correspondente ao final da ovulação até a regressão do corpo lúteo – LOCATELLI e MERMILLOD, 2005) e $1,7 \pm 0,1$ dias de fase interluteal

(correspondente ao final do recrutamento e ovulação - LOCATELLI e MERMILLOD, 2005).

3.2. Protocolos de sincronização de estro

Os protocolos de sincronização de estro surgiram para controlar o comprimento do ciclo estral e a ovulação pela administração de progesterona exógena associada ou não à prostaglandina F2 α (PGF2 α , ou seus análogos sintéticos). As fontes exógenas de progesterona como implantes subcutâneos, esponjas e outros dispositivos intravaginais (DIP), inibem o pico de LH e bloqueiam a ovulação até a regressão do corpo lúteo (CL) e a retirada da progesterona exógena. A prostaglandina e seus análogos (como o cloprostenol) provocam a regressão do CL, permitindo a ovulação, podendo também ser utilizados em duas doses, sem associação com outros fármacos, para a sincronização do estro (MORROW et al., 2009; ASHER et al., 1993a).

O ciclo estral dos cervídeos é semelhante ao das espécies de ruminantes domésticos. Assim, os métodos de sincronização artificial do estro tendem a seguir procedimentos semelhantes aos utilizados para ovinos e bovinos (ASHER et al., 1993a). Porém, espécies selvagens são mais sensíveis ao estresse quando comparadas com animais domésticos e necessitam de redução da manipulação dos indivíduos (COMIZZOLI et al., 2000). Em cervídeos comerciais, a sincronização do estro tem sido geralmente adotada como uma alternativa mais eficiente e economicamente viável do que a detecção de estro natural (ASHER et al., 2000). Resultados variáveis foram relatados após a utilização de hormônios para sincronização da atividade ovariana em diversas espécies não domésticas (revisado por PUKAZHENTHI E WILDT, 2004).

Muitos estudos foram realizados com a utilização de DIP para avaliar a eficácia na sincronização de estro em cervídeos (ASHER et al., 2000). O uso de protocolo com DIP em *Dama dama* apresentou taxas de fertilidade mais altas quando comparado com duas aplicações de análogos de PGF2 α para induzir a

sincronização do estro (JABBOUR et al., 1993a) (Tabela 1). Em animais sazonais, como *D. dama* (MORROW et al., 1992) e *Cervus elaphus* (ASHER et al., 1992a), o uso de DIP por períodos entre 12 e 14 dias durante a época de reprodução, mostrou-se eficaz para a sincronização dos estros dentro de 48 horas após a retirada do dispositivo. Duarte e Garcia (1995) obtiveram a sincronização de estro em *M. gouazoubira*, 2 a 3 dias após o fim do protocolo que utilizou esponjas caseiras contendo 50 mg de acetato de medroxiprogesterona, por 14 dias.

Embora o uso de DIP por 11-14 dias seja frequente em animais sazonais (Tabela 1), longos períodos de inserção de progestágenos têm sido associados com menores taxas de concepção em *C. elaphus* (FENNESSY et al., 1990) e *D. dama* (JABBOUR et al., 1993a), pois a exposição à progesterona por períodos prolongados afeta negativamente os folículos antrais, reduzindo os índices de fertilidade (MCLEOD et al., 2001). Em *C. elaphus*, foi descrito o surgimento de duas ondas foliculares durante o tratamento com DIP do tipo “Controlled internal drug release” (CIDR®), por 14 dias. A primeira ocorreu cinco dias após a inserção do dispositivo, sendo que o folículo dominante pré existente regrediu dois dias após a inserção e, a segunda onda surgiu 11 dias após a inserção.

Também foi observado que o surgimento da segunda onda folicular foi mais variável do que a primeira, e que, portanto, o uso do CIDR® por menores períodos (sete dias), que atuaria no folículo dominante da primeira onda poderia resultar em melhor sincronia e maior fertilidade (MCCORKELL et al., 2007). Estudos na espécie *D. dama* já haviam confirmado essas observações verificando que tratamentos prolongados com progesterona (17 e 20 dias) resultavam em elevada porcentagem de animais em estro (100% e 94%, respectivamente), porém com baixas taxas de fertilidade (44 e 60%, respectivamente), já os tratamentos de curta duração (8 dias), resultavam em 50% de estros e 88% de fertilidade (MORROW et al., 1995). Zanetti et al., em 2010, obtiveram bons resultados (100%) na sincronização de estro da espécie *M. gouazoubira* utilizando protocolo de curta duração (8 dias) com CIDR® associado a uma aplicação de cloprostenol no momento da remoção do DIP, porém a fertilidade não foi avaliada neste estudo.

A associação de cloprostenol no final de tratamentos de progestágenos de curta duração (8 dias) são importantes pois asseguram a regressão do CL, uma vez

Tabela 1. Procedimentos de inseminação artificial (IA) realizados em algumas espécies de cervídeos (adaptado de Morrow et al. 2009)

Espécie	Protocolo	Tempo de IA ¹ (h)	Técnica de IA	Sêmen	% prenhes (Gestação/ IA)	Referência
<i>Cervus elaphus</i>	Acetato medroxiprogesterona 12 dias + eCG (dia 12) + Cloprostenol (dia 12)	48 – 55	IAUTC ²	Descongelado	36,8% (14/38)	Aller et al. 2009
	CIDR [®] 11 dias + eCG	10- 12 após estro	IAUTC	Descongelado	41,6% (10/24)	Bowers et al. 2004
	Estro natural	10- 12 após estro	IAUTC	Descongelado	29,4% (5/17)	
	CIDR [®] 14 dias + eCG	65	IAUTC	Descongelado	57% (4/7)	McCorkell et al. 2007
	CIDR [®] 15 dias + eCG	44 + 68	IAUTC	Descongelado	45% (9/20)	Fennessy et al. 1990
	CIDR [®] 12 dias + eCG	56	IAUL ³	Descongelado	56% (15/27)	
<i>Dama dama</i>	CIDR [®] 14 dias	65	IAUL	Descongelado	68% (169/249)	Asher et al. 1992b
	CIDR [®] 14 dias	60	IAUL	Descongelado	67% (24/36)	
	CIDR [®] 14 dias	70	IAUL	Descongelado	73% (29/40)	
	CIDR [®] 14 dias	69- 71	IAUL	Fresco	65% (66/102)	
	PGF2α (dia 14) ⁴	65	IAUL	Descongelado	53% (27/51)	
	Norgestomet 14 dias	72-73	IAUTC	Descongelado	32% (34/106)	Willard et al. 2002
	CIDR [®] 14 dias	65-68	IAUL	Descongelado	67,7%	Asher et al.1990b
	CIDR [®] 14 dias + PGF2α na inserção	65	IAUL	Fresco	67,5% (27/40)	Jabbour et al. 1993b
	CIDR [®] 14 dias + PGF2α na inserção	65	IAUL	Descongelado	65% (52/81)	
	Cloprostenol (dia 13) ⁴	61	Cervical	Descongelado	40,7% (11/27)	Jabbour et al. 1993a
	Cloprostenol (dia 13) ⁴ + eCG	49	Cervical	Descongelado	65,4% (17/26)	
	CIDR [®] 14 dias	55	Cervical	Descongelado	84,5% (22/26)	
	CIDR [®] 14 dias + eCG	49	Cervical	Descongelado	61,5% (16/26)	
	CIDR [®] 14 dias	55	Cervical	Fresco	76,3% (71/93)	

Axis axis	Norgestomet 10 dias+ VE (dia 0) + eCG (dia 10)	48-57	IAUTC	Fresco	30% (3/10)	Umapathy et al. 2007
	CIDR® 14 dias	48	IAUL	Fresco	28,5% (2/7)	Dradjat 2004
	CIDR® 14 dias	60	IAUL	Descongelado	25% (3/12)	
Odocoileus virginianus	Estro natural	10- 12	IAUTC	Descongelado	73% (33/45)	Jacobson et al. 1989
	CIDR® 14 dias + eCG	60	IAUTC	Fresco	40% (8/20)	Mellado et al. 2013
	CIDR® 14 dias + eCG	60	IAUL	Fresco	45% (113/251)	
	Estro natural	0, 12 ou 18	Cervical	Descongelado	75%	Magyar et al. 1989
	Estro natural	6, 24 ou 30	Cervical	Descongelado	60 %	
	CIDR® 14 dias + eCG	60	IAUTC	Descongelado	59% (21/34)	Gentry et al. 2012
	CIDR® 14 dias	60	IAUTC	Descongelado	43% (17/40)	
Cervus nippon	CIDR® 13 dias+ eCG	60	IAUL	Fresco	48,3% (14/29)	Willard et al. 1996
Mazama americana	CIDR® 10 dias+ cloprostenol (dia 10)+ eCG (dia 10)+ LH (após IA)	80	IAUL	Fresco	100% (1/1)	Zanetti et al. 2009
Mazama gouazoubira	Acetato medroxiprogesterona 14 dias	-	Vaginal	Descongelado	0% (0/1)	Duarte e Garcia 1995

¹tempo entre o fim do protocolo e o procedimento de IA, ²IAUTC = inseminação intrauterina transcervical, ³IAUL = inseminação intrauterina por laparoscopia,

⁴Dia do ciclo estral.

que a exposição aos progestágenos durante este curto período pode não ser suficiente para cessar seu desenvolvimento (MORROW et al., 1995). A presença do CL inibe o início do pico do hormônio luteinizante (LH) e, consequentemente, a ovulação.

A associação de gonadotrofina coriônica equina (eCG) aos DIPs são comumente utilizados em animais sazonais (Tabela 1) pois pode superar os efeitos do estresse do manejo, que reduz as taxas de ovulação, além de diminuir a diferença do tempo de ovulação entre os animais (FENESSY et al., 1990), porém a dose utilizada e a sensibilidade individual são determinantes para a ocorrência de múltiplas ovulações, o que não é interessante em espécies uníparas. Em *Odocoileus virginianus* o uso do eCG na retirada do CIDR® (14 dias) não resultou em melhores taxas de gestação quando comparado ao grupo sem eCG (GENTRY et al., 2012).

Em cervídeos o início do estro ocorre aproximadamente 44-58 horas após a retirada do DIP (inserido por 14 dias) (ASHER et al., 1992b; ASHER & THOMPSON, 1989; ASHER et al., 1993b), concomitantemente ao início do aumento do LH (ASHER e THOMPSON, 1989; BERG et al., 2008) este, por sua vez, atinge a amplitude máxima após 4-8 horas (ASHER e THOMPSON, 1989). A ovulação ocorre 24-30 horas após o início do estro, aproximadamente 12 horas após o pico de LH (ASHER et al., 1990a; BERG et al., 2008). Dessa forma, a ovulação ocorre aproximadamente entre 70-80 horas após a retirada do DIP (ASHER et al., 1993b).

No entanto, o pico de LH e a ocorrência das ovulações podem ser alterados pelos efeitos negativos do estresse, provocado pela manipulação dos animais, especialmente no caso de espécies selvagens. Altas concentrações de corticosteróides e progesterona, produzidos pela glândula adrenal (ASHER e THOMPSON, 1989), podem influenciar negativamente a secreção de GnRH hipotalâmico e inibir o pico pré-ovulatório de LH, como já descrito em bovinos (MONTEIRO et al., 2009) e ovinos (DOBSON e SMITH, 2000) desta forma, a administração de LH exógeno poderia ser realizada para induzir a ovulação em fêmeas que por várias razões não tem aumento de LH endógeno (D'OCCHIO et al., 1997).

3.3. Técnicas de inseminação artificial

Dentre as tecnologias de reprodução assistida a IA tem um grande potencial para ser utilizada em espécies selvagens (WILDT et al., 1997; WILDT, 1989), pois é uma das técnicas mais simples que possibilita o intercâmbio de material genético entre populações de cativeiro e vida livre, evitando a depressão endogâmica, a perda de variabilidade genética nas pequenas populações (ANDRABI e MAXWELL, 2007), e os riscos e desafios envolvidos nas translocações de animais para fins reprodutivos (PUKAZHENTHI e WILDT, 2004). No entanto, para que esta técnica seja realmente útil, são necessárias pesquisas que busquem entender o ciclo reprodutivo das fêmeas, formas eficazes de identificar e/ou controlar o estro e a ovulação, coletar sêmen com segurança e confiabilidade, determinar o padrão do ejaculado de cada espécie de interesse e formas eficientes de depositar o sêmen no momento e local ideal na fêmea (WILDT, 1989; ANDRABI e MAXWELL, 2007).

As técnicas de IA têm sido significativamente melhoradas, no entanto, existem grandes diferenças nas taxas de gestação entre as espécies, entre as técnicas de inseminação e entre a utilização de sêmen fresco ou congelado (ANDRABI e MAXWELL, 2007).

Diferentes técnicas de IA (vaginal, cervical e intrauterina) já foram utilizadas com variados graus de sucesso em diversas espécies de cervídeos (ASHER et al. 1993b) (Tabela 1). A IA intrauterina (realizada por via transcervical ou laparoscópica), é hoje em dia aplicada com sucesso em várias espécies não-domésticas, incluindo carnívoros, cervídeos, bovídeos, girafídeos e camelídeos (COMIZZOLI et al., 2000; ASHER et al., 2000; MORROW et al., 2009). É a técnica de eleição para a IA nas espécies selvagens, pois o local correto de deposição do sêmen não é conhecido para a maioria dos mamíferos de vida livre (COMIZZOLI et al., 2000).

A IA intrauterina transcervical (IAUTC) é a menos invasiva e de baixo custo, contudo, a aplicabilidade desta técnica é limitada devido a dificuldade de passagem pelo canal cervical, impedindo que o sêmen seja depositado no lúmen uterino. Isso torna necessário a utilização de doses mais altas de sêmen ($50-100 \times 10^6$

espermatozoides), nem sempre resultando em proporcionais taxas de prenhes (JACOBSON et al., 1989; MAGYAR et al., 1989). Em cervídeos brasileiros, a pequena abertura da cérvix, o comprimento e o grande número de anéis cervicais praticamente impossibilitam a deposição intrauterina do sêmen por via transcervical (DUARTE e GARCIA, 1995).

A IA intrauterina por laparoscopia (IAUL), inicialmente desenvolvida para pequenos ruminantes domésticos, é necessária quando não é possível a passagem do cateter através da cérvix (COMIZZOLI et al., 2000). Em 1993b, Asher et al. consideraram a IAUL o método preferido para inseminar as espécies *C. elaphus* e *D. dama*. É a técnica de eleição para grande parte das espécies não-domésticas, incluindo os cervídeos de pequeno porte (LEIBO e SONGSASEN, 2002), pois permite a colocação de quantidades relativamente pequenas de sêmen no lúmen uterino ($10\text{-}50 \times 10^6$ espermatozoides) e uso de sêmen congelado de forma eficaz (ASHER et al., 2000). Contudo, a técnica apresenta algumas limitações como a necessidade de anestesia do animal, treinamento na técnica de laparoscopia e custos dos equipamentos (WILLARD et al. 1998). Estas técnicas já foram descritas para várias espécies de cervídeos (Tabela 1).

Para a IA em tempo fixo (IATF), os melhores resultados têm sido obtidos quando a inseminação é realizada de 48-60 horas após o final do tratamento de sincronização (revisado por MORROW et al., 2009), já em protocolos com monitoramento de estro, as IAs são realizadas 10-18h após o início do estro (BOWERS et al., 2004; JACOBSON et al. 1989; MAGYAR et al., 1989; JABBOUR et al., 1993a) (Tabela 1). No entanto, é importante salientar que inúmeros fatores contribuem para o sucesso das diferentes técnicas de inseminação empregadas, entre eles a dose e a qualidade do sêmen; o método de sincronização e o tempo decorrente até a inseminação; a experiência dos técnicos e o estresse do manejo (MORROW et al., 2009).

3.4. Avaliação do sêmen

A avaliação *in vitro* do sêmen congelado é indispensável para a obtenção de resultados satisfatórios em qualquer procedimento de IA. Quanto mais precisa e completa for a avaliação de uma partida de sêmen, melhor poderá prever sua capacidade fecundante (LUZ et al., 2000). Enquanto a utilização de sêmen criopreservado para IA é realizada com sucesso em algumas espécies, a aplicação em outras pode ser problemática. As diferenças entre as espécies quanto à anatomia do trato feminino, mecanismos de transporte de espermatozoides e a determinação do momento correto da inseminação são determinantes para o uso de espermatozoides criopreservados (SADALLA FILHO, 2004).

A avaliação de motilidade e vigor é um método simples e prático usado rotineiramente, no entanto, quando utilizado isoladamente, não é capaz de detectar possíveis problemas decorrentes de falhas na criopreservação que causam lesões de membranas (LUZ et al., 2000). A fertilidade está diretamente relacionada à porcentagem de espermatozoides vivos e ativos (SHOJAEI et al., 2012). Na indústria de IA em bovinos, em que touros são selecionados por congelabilidade do sêmen, a qualidade do sêmen pós-descongelação é considerada muito boa quando apresenta 50-70% de motilidade (HIEMSTRA et al., 2006).

O teste de termorresistência (TTR) também é utilizado para avaliar a motilidade e vigor dos espermatozoides quando incubados a 37°C por determinado tempo e, desta forma prever a capacidade fertilizante do sêmen (BARNABE et al., 1981).

A análise da morfologia espermática tem sido apontada por muitos autores como uma importante ferramenta na seleção de um ejaculado (VERSTEGEN et al., 2002). A técnica na qual se utiliza microscopia de contraste de fase é considerada um método superior para avaliação de morfologia espermática de precisão em touros (FRENEAU et al., 2009). As anormalidades espermáticas podem afetar, isolada ou simultaneamente, as diferentes regiões da cabeça, peça intermediária e cauda (DERIVAUX, 1980). Quanto a sua classificação, primeiramente foram

separadas em patologias primárias, ocorridas durante a espermatogênese, e secundárias, resultado de condições não fisiológicas que afetam os espermatozoides após a espermatogênese. Posteriormente, as patologias espermáticas passaram a ser classificadas como defeitos maiores ou menores, caracterizados pela gravidade dos seus efeitos deletérios à fertilidade (NÖTHLING E IRONS, 2008).

Outros fatores que podem ser avaliados são a integridade do acrossoma, importante por conter enzimas envolvidas no processo de fecundação, responsáveis pela penetração do espermatozoide no oócito (GARNER e HAFEZ, 2004); a integridade da membrana plasmática, que confere vitalidade espermática (WHO, 2010) e é um dos atributos essenciais para prever a fertilidade (LUZ et al., 2000) e o índice de fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (IFD), que mensura a susceptibilidade do DNA à desnaturação e a fragmentação e é capaz de prever a subfertilidade ou infertilidade de machos, assim como a possibilidade de desenvolvimento embrionário após a aplicação de técnicas de reprodução assistida (D'OCCHIO et al., 2007; EVENSON et al., 2002; EVENSON e JOST, 2000).

3.5. Dosagem hormonal de progestágenos fecais

O monitoramento endócrino pode fornecer informações importantes e precisas sobre o sistema endócrino da fêmea para aplicação de biotécnicas reprodutivas, como o momento exato da ovulação para deposição do sêmen no útero, diagnosticar gestação e até mesmo prever o parto (WILDT, 1989; MORROW e MONFORT, 1998; ANDRABI e MAXWELL, 2007). O status endócrino pode ser avaliado quantitativamente ao longo do tempo medindo-se os hormônios hipofisários e gonadais ou seus metabólitos no sangue, urina e fezes. As dosagens de hormônios no sangue têm utilidade limitada em espécies selvagens, pois a colheita requer contenção física ou química, duas abordagens contraindicadas na rotina de espécies sensíveis ao estresse (WILDT, 1989). Assim, estudos a longo prazo, com colheitas repetidas de amostras de sangue, se tornam impraticáveis. Desta forma,

as análises não invasivas dos padrões endócrinos são as alternativas mais práticas para monitoramento da função ovariana e da gestação, eliminando o estresse associado com manipulação dos animais (SCHWARZENBERGER et al., 1996; MORROW e MONFORT, 1998; SCHWARZENBERGER, 2007).

As concentrações de esteróides nas fezes exibem um padrão semelhante ao plasma, porém com um tempo de atraso que, dependendo da espécie, pode ser de 12 horas até dois dias. Em ruminantes, o tempo de atraso é de, aproximadamente, 12 a 24 horas (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

A dosagem hormonal por enzimaímunoensaio (EIA), já foi realizada com sucesso em algumas espécies de cervídeos neotropicais para caracterizar o ciclo estral e a gestação (*M. gouazoubira* – PEREIRA et al. 2006a, *M. americana* - KREPSCHI et al. 2013, *B. dichotomus* – POLEGATO, 2008), caracterizar o ciclo de chifres (*O. bezoarticus* - PEREIRA et al. 2005, *M. americana* - VERSIANI et al., 2009) e avaliar o estresse (*M. gouazoubira*, *B. dichotomus* - CHRISTOFOLETTI et al., 2010, *O. bezoarticus* - PEREIRA et al., 2006b) . Além disso, as dosagens de progestágenos fecais foram úteis para o acompanhamento da funcionalidade do CL após protocolos de sincronização (*M. gouazoubira* – ZANETTI et al., 2010) e superovulação (*M. gouazoubira* – ZANETTI et al. 2012). Segundo Asher et al. (2011), o aumento da concentração de progesterona está associado com a formação do CL, após ovulação. No entanto, acompanhamentos comportamentais dos animais são sempre desejados para que os resultados endócrinos possam ser melhor interpretados (PEREIRA et al., 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizadas cinco fêmeas adultas (Tabela 2) e dois machos adultos inteiros da espécie *M. gouazoubira*, como rufiões. Quatro fêmeas foram submetidas a dois procedimentos de IA e uma foi submetida a apenas um, totalizando nove procedimentos de IA conforme Tabela 2. Todos os animais pertenciam ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus Jaboticabal.

Tabela 2. Identificação das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* utilizadas no estudo, assim como data e distribuição dos procedimentos de inseminação artificial realizados.

Fêmea	Idade aproximada	Origem (estado)	Histórico reprodutivo (NUPECCE)	Procedimento	Data da IA	Duração da IA (minutos) ²
1	6 anos	Paraná	Nulípara	1	28/08/2012	16
				7	28/01/2013	20
2	6 anos	São Paulo	Nulípara	2	01/09/2012	25
				5	23/01/2013	22
3	7 anos	Pará	Nulípara	3	05/09/2012	21
				6	25/01/2013	17
4	8 anos	São Paulo	Primípara	4	10/09/2012	18
				8	31/01/2013	23
5	2 anos	São Paulo	Nulípara ¹	9	04/02/2013	25

¹superovulação e colheita de oócitos quatro meses antes do procedimento de IA; ² Duração do procedimento de IA.

4.2. Período e local de estudo

Durante os meses de janeiro de 2012 a março de 2013, os animais foram mantidos em baias individuais (3,0m x 2,0m), com contato auditivo e olfativo e, expostos a variação natural de luminosidade. Receberam dieta composta por alimentos concentrados utilizados para equinos (Tec Horse[®]-Purina[®] ou Omolene[®]-Purina[®]), fornecida diariamente pela manhã, e alimento volumoso: soja perene (*Neonotomia wighti*), alfafa (*Medicago sativa*) ou ramos de amoreira (*Morus alba*), fornecidos de acordo com a sua disponibilidade no campo, em uma quantidade média de 1Kg/animal/dia, no final da tarde (sempre molhado, com intuito de adiar o murchamento e mantê-lo aceitável pelos animais por mais tempo). Água oferecida *ad libitum*.

4.3. Período de adaptação

O período de adaptação dos animais ao manejo foi realizado durante os meses que antecederam as inseminações (mínimo um mês antes). Neste período, um dos machos foi colocado em contato com cada uma das fêmeas e o comportamento dos animais foi observado durante aproximadamente 10 minutos diariamente. Desta forma, foi possível determinar o comportamento de estro das fêmeas, que foi considerado o período em que a fêmea permitiu a monta e permaneceu imóvel em posição quadrupedal. Quando as fêmeas estavam receptivas, a cópula foi interrompida com a retirada do macho da baia.

4.4. Processamento e avaliação do sêmen

Para definir o sêmen que seria utilizado nas IAs, foram selecionadas três partidas de sêmen de três machos de vida livre da espécie *M. gouazoubira* mantidas congeladas em botijões criogênicos no NUPECCE. Duas (1 e 2) provenientes da região do Pantanal-MS, na fazenda Nhumirim (sub-região da Nhecolândia), campo

experimental da Embrapa Pantanal, colhidas no mês de outubro de 2010, e uma partida (3) colhida no mês de setembro de 2011, proveniente de animal capturado em Guariba- SP, recém chegado ao cativeiro. Os ejaculados foram colhidos por eletroejaculação (DUARTE e GARCIA, 1995), após anestesia prévia dos animais com dardo anestésico contendo associação de 7,0 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Vetaset® - Fort Dodge - Brasil) e 1,0 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer - Brasil).

Após a colheita, uma alíquota do sêmen foi diluída em formol salina (1:200) para análise de concentração e morfologia (CBRA, 1998). Em seguida, o sêmen foi diluído com o meio Botu-Bov® (Biotec®, Botucatu, Brasil), analisado quanto a motilidade e vigor e ajustado para a concentração de 50×10^6 espermatozoides/palheta. Posteriormente, as partidas 1 e 2 foram envasadas em palhetas de 0,25mL, resfriadas por quatro horas na geladeira (4°C) e congeladas em vapor de nitrogênio líquido, com as palhetas posicionadas 2-3 cm acima do nível deste por 10 minutos, sendo então mergulhadas no mesmo (-196°C) (DUARTE e GARCIA, 1997). A partida 3 foi envasada da mesma forma descrita acima e congelada em congelador automático (TK 3000®, Tecnologia em Congelação LTDA, Brasil), com curva “P3S1”, desenvolvida para ovinos.

Optou-se pela realização de alguns testes comparativos entre as partidas, na tentativa de utilizar aquela com melhor qualidade. O primeiro critério de escolha dos três ejaculados foi o número mínimo de palhetas (15) que cada uma delas deveria ter para que fosse possível a realização de todas as inseminações com uma única partida de sêmen, na tentativa de evitar possíveis variações entre ejaculados, desta forma uma palheta de cada amostra foi descongelada em banho-maria a 37°C por 20 segundos e avaliada segundo os parâmetros:

4.4.1. Motilidade e vigor espermático

Colocou-se uma gota do sêmen pré-diluído (1:1) entre lâmina e lamínula e a motilidade foi avaliada em microscópio óptico com aumento de 400x (Axioplan, Carl Zeiss® - Germany) por meio da observação subjetiva direta da porcentagem de

espermatozoides móveis em relação ao total de espermatozoides presentes no campo óptico. O vigor foi analisado na mesma lâmina, classificado em uma escala de 0 a 5, sendo 0 a ausência de movimento progressivo e 5 movimento vigoroso e veloz dos espermatozoides.

4.4.2. Morfologia espermática

A morfologia espermática foi avaliada em 100 células, em câmara úmida formada entre lâmina e lamínula com a solução preparada para a avaliação da concentração (diluição 1:200 em formol salina). A avaliação microscópica foi feita em microscópio de contraste de fase (Olympus BX60[®], Olympus Corporation- Japan). As anormalidades foram classificadas em porcentagens de defeitos maiores e menores (BLOM, 1973). Quando foi observada uma anormalidade maior e menor simultaneamente, apenas a maior foi contabilizada.

4.4.3. Integridade de acrossoma

Para averiguar a presença ou ausência do acrossoma, utilizou-se corante simples para acrossoma (Fast Green/ Rosa Bengala), desenvolvido por Pope et al. (1991). Como o crioprotetor utilizado para proteger a célula espermática no processo de congelação impede a coloração do acrossoma, sugerindo a ausência de acrossoma nos espermatozoides, a amostra foi lavada com solução fisiológica a 0,9% e centrifugada a 800g por 8 minutos (Eppendorf[®] Centrifuge 5804R, Eppendorf do Brasil, LTDA. - Brasil). Após a ressuspensão da amostra no corante simples para acrossoma (1:1) e incubação por 120 segundos, realizou-se um esfregaço para avaliação em microscopia de luz, com objetiva de 100x (imersão) e avaliou-se 200 espermatozoides. O resultado foi apresentado como a porcentagem de

espermatozoides com o acrossoma íntegro (região acrossomal apresentando coloração lilás).

4.4.4. Integridade de membrana plasmática

A avaliação da vitalidade espermática ou integridade de membrana plasmática pode ser feita por meio de corantes ou do teste hiposmótico (WHO, 2010). Foi utilizado para esse teste a coloração com eosina-nigrosina, utilizando o kit comercial VitaScan[®] (Lucron Bioproducts, AB GENNEP, The Netherlands). Foram adicionados 10 µL de eosina a 10 µL de sêmen em um tubo tipo 'eppendorf'. Após 30 segundos foram adicionados 10 µL de nigrosina e após homogeneização foi realizado esfregaço em lâmina de vidro. Em microscópio de luz com objetiva de 100x (imersão) foram avaliados 200 espermatozoides. O resultado foi apresentado como a porcentagem de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra (não corados).

4.4.5. Índice de Fragmentação de DNA (IFD)

O ensaio para análise do Índice de Fragmentação do DNA foi realizado no Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Adaptou-se a técnica descrita por Boe-Hansen et al. (2005) e utilizou-se o citômetro de fluxo Guava EasyCyteTM Mini System[®] (Guava Technologies, Inc. – Hayward, CA – EUA) e o programa FlowJo[®] (Tree Star, Inc., Ashland, OR - EUA). Este teste é chamado de Suscetibilidade da Cromatina à Desnaturação Ácida (SCDA). Para realização calculou-se o volume de sêmen necessário para se obter 250.000 espermatozoides a partir da amostra descongelada. Posteriormente, esta alíquota foi

transferida para um criotubo, recongelada diretamente em nitrogênio líquido e armazenada a -196°C .

Inicialmente, realizou-se a validação do SCDA, uma vez que não há relatos do uso desta técnica para sêmen dessa espécie. Para isso descongelou-se uma palheta de sêmen em banho-maria a 37°C por 20 segundos que foi dividida em duas alíquotas de 50 μL cada. Considerou-se a alíquota 1 (fluorescência verde) como controle negativo, com células não suscetíveis à desnaturação ácida, e a alíquota 2 (fluorescência vermelha), que passou por um processo de fragmentação induzida, foi considerada como controle positivo, células susceptíveis à desnaturação ácida.

- Controle negativo: após a lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS), a amostra foi ressuspensa com 50 μL de PBS. Desta amostra, cinco microlitros foram colocadas em um tubo tipo 'eppendorf' contendo 45 μL de água (diluição 1:10), para avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer e o restante foi acrescido de 100 μL de detergente ácido e 50 μL de solução tampão TNE (Solução Tampão TNE (pH 7,4) - Tris HCl (0,01M), NaCl (0,15M), EDTA (1mM), água destilada (q.s.p)(500ml), incubado por 30 segundos, seguido de adição de 300 μL de laranja de acridina. O tubo foi então reservado pelo tempo necessário para a fragmentação da alíquota 2 (controle positivo) e a leitura foi realizada dentro do período permitido pela técnica (de 2 minutos até 4 horas após adição do laranja de acridina).

- Controle positivo: Realizou-se a lavagem em PBS e adicionou-se 50 μL de PBS e 100 μL de peróxido de hidrogênio 30%. Posteriormente, a solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 1,5 horas e após este período realizou-se o mesmo procedimento descrito para o controle negativo.

Para a validação, mensurou-se a quantidade de fragmentação de cada alíquota separada (controle negativo e controle positivo) e combinadas nas proporções de 1:1, 1:3 e 3:1. Desta forma, foi possível identificar as populações de células fragmentadas e não fragmentadas, cujas quantidades variaram de forma dependente e em consonância com as proporções das alíquotas. Após realização do SCDA, obteve-se histograma de AlfaTYlog com pico único para o controle negativo (Figura 2A) e para o controle positivo (Figura 2B) e dois picos para a mistura 1:1 (Figura 2C). Para determinar quais células foram positivas e quais foram negativas

para a fragmentação do DNA, estabeleceu-se como ponto de corte o ponto médio entre os dois picos. O AlfaTYlog foi obtido pela divisão da fluorescência vermelha pela fluorescência total (vermelho + verde) e permitiu a quantificação da extensão da desnaturação da estrutura da cromatina de cada espermatozoide.

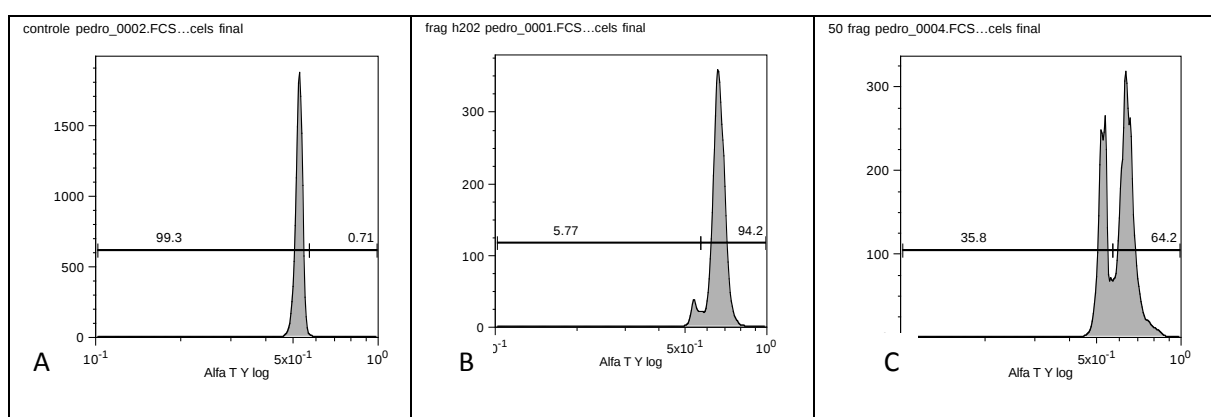


Figura 2. Gráficos de AlfaTYlog obtidos pelo Ensaio de Suscetibilidade da Cromatina à Desnaturação Ácida (SCDA) do sêmen de *Mazama gouazoubira*. **(A)** Controle negativo **(B)** Controle positivo **(C)** Mistura 1:1 dos controles negativo e positivo, respectivamente.

Após o teste de validação, as amostras foram descongeladas sobre mesa aquecedora a 37°C e lavadas pela adição 500 µL de PBS, centrifugadas e o sobrenadante descartado. Posteriormente, as amostras receberam 50 µL de solução tampão TNE e 100 µL de detergente ácido e foram incubadas por 30 segundos. Adicionou-se 300 µL de laranja de acridina e após dois minutos a leitura foi feita por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™[®]). Os dados foram exportados e analisados no programa FlowJo[®], baseados nos pontos de corte estabelecidos por meio da validação. O resultado foi obtido através da porcentagem de espermatozoides com estrutura de cromatina anormal (DNA fragmentado).

4.4.6. Teste de termorresistência (TTR)

O TTR foi realizado após descongelação das amostras em banho-maria a 37°C e avaliado a cada 30 minutos quanto a motilidade e vigor, conforme já descrito anteriormente, até que nenhuma amostra apresentasse mais espermatozoides vivos. Considerou-se que a melhor amostra neste teste foi a que obteve maior média de motilidade e vigor no período de avaliação (LUZ et al., 2000).

4.5. Controle do ciclo estral

Os procedimentos foram realizados durante os meses de agosto e setembro de 2012 e janeiro de 2013. Para sincronização do ciclo estral foi utilizado o protocolo descrito por Zanetti et al. (2010) para a espécie *M. gouazoubira*. Realizou-se a inserção do dispositivo intravaginal CIDR® (Controlled Internal Drug Release® - Pfizer® - EUA) contendo 0,33 gramas de progesterona (tipo-T, desenvolvido para ovinos e caprinos) (Figura 3) por 8 dias e, no momento da sua retirada, aplicou-se 265µg (1mL) de cloprostenol sódico (Ciosin® - Shering Plough Coopers®) por via intramuscular. A IA foi realizada 12-14 horas após o início do estro e imediatamente após o procedimento os animais receberam 2,5 mg (2 mL) de LH (Lutropin® - Tecnopec- Brasil) por via intramuscular. Os procedimentos acima foram realizados com contenção física (DUARTE et al., 2001) sempre as 16:00 horas. Um novo protocolo de sincronização para a segunda IA foi realizado aproximadamente cinco meses após o primeiro.

4.6. Identificação do estro

A partir de oito horas após o término do tratamento de sincronização, os sinais comportamentais do estro foram verificados colocando o macho em contato

com as fêmeas a cada seis horas (não permitindo a cópula) até que estas não permitissem mais a monta, momento que foi considerado final do estro comportamental. Posteriormente, as fêmeas voltaram a ser monitoradas a cada 24 horas (entre as 9:00 e 10:00 horas) para verificar possível retorno ao estro e não gestação ou até a confirmação da prenhez com o exame ultrassonográfico, aproximadamente 45 dias após o procedimento.

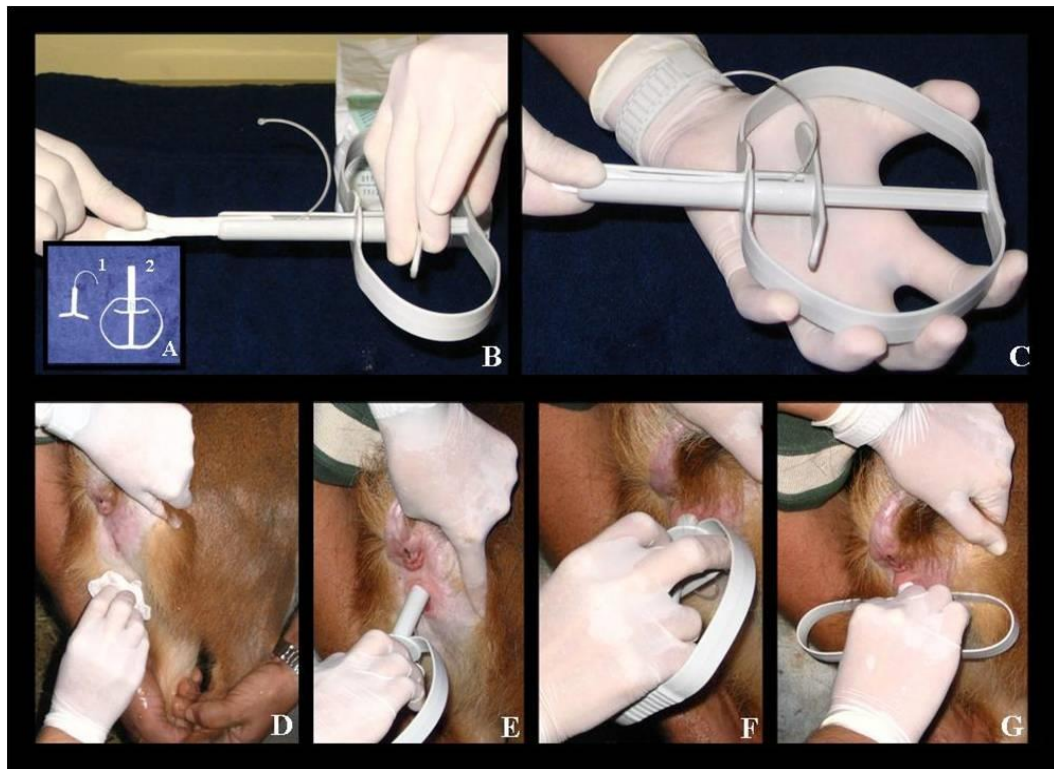


Figura 3. (A1) Dispositivo de progesterona (A2) Aplicador do dispositivo de progesterona (B e C) Montagem do dispositivo no aplicador (D) Higienização da região perivulvar (E) Introdução do aplicador na vagina (F) Completa introdução do aplicador (G) Colocação do dispositivo no interior da vagina (Fotos: E.S. Zanetti, V.V. Abril)

4.7. Inseminação artificial por videolaparoscopia

Para o procedimento de IA, as fêmeas foram submetidas a jejum sólido e hídrico de 12-14 horas, posteriormente anestesiadas com associação de 5,0 mg/Kg

de cloridrato de quetamina (Vetaset® - Fort Dodge - Brasil), 0,3 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer - Brasil) e 0,5 mg/Kg midazolan (Dormire® - Cristália - Brasil) por via intravenosa após contenção física (Figura 4A). Para o início do procedimento cirúrgico, os animais foram intubados e mantidos em plano anestésico com isoflurano (Forane® - Abbott - Brasil), com vaporizador calibrado para esse fármaco (HB® Hospitalar - Brasil). Após posicionamento da fêmea em decúbito dorsal, o acesso intra-venoso foi mantido no membro torácico (veia cefálica) com solução fisiológica 0,9% (Figura 4B), e realizou-se a preparação do campo cirúrgico com a tricotomia da região abdominal (Figura 4C), antisepsia cirúrgica (Iodo-povidona e Álcool 70%) (Figura 4D) e colocação de panos de campo estéreis (Zanetti et al. 2010). Em seguida realizou-se dois botões anestésicos com 1 mL de cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor (Hipolabor Farmacêutica® Ltda - Brasil), sendo um lateralmente a linha média (lado esquerdo), aproximadamente 5cm cranial a glândula mamária e outro aproximadamente 10 cm cranial a glândula na linha média para posterior realização de duas incisões na pele com o bisturi (cerca de 1,0 cm) nesses locais (Figura 4E). Para facilitar a visualização do útero, o animal foi reposicionado de modo que seus membros posteriores ficassem elevados aproximadamente 45°. Após a suspensão manual do abdômen, um trocáter com ponta piramidal e bainha rosqueável de 5mm de diâmetro com válvula para dióxido de carbono (CO₂) (Edlo®, Exatech Indústria e Comércio LTDA.- Brasil) foi introduzido na incisão lateral. Retirou-se o trocáter, e o abdômen foi insuflado com CO₂, numa velocidade de 8 L/min até a pressão de 5 mmHg (Figura 4F). Após a insuflação, outro trocáter com ponta piramidal e bainha rosqueável de 5mm de diâmetro foi introduzido na incisão da linha média do abdômen permitindo a passagem da óptica laparoscópica (30cm / 5mm / 30°- Hoffmann® - Alemanha), conectada ao cabo de fibra óptica, a fonte de luz xenógena e a micro-câmera (ZANETTI et al., 2009) (Figura 4G).

Após a localização dos cornos uterinos, uma palheta de sêmen foi descongelada (37°C por 20 segundos) e o sêmen foi avaliado imediatamente antes da IA de forma subjetiva quanto a motilidade e vigor, sempre pelo mesmo avaliador. Após a avaliação, um catéter de IA intrauterina (Transcap IVP® do Brasil Ltda, São Paulo), previamente aquecido, foi montado e inserido na bainha lateral (Figura 4H) e

o volume total da palheta (0,25mL) foi dividido igualmente entre os dois cornos uterinos (Figura 4I). Após a remoção das bainhas, o CO₂ foi retirado da cavidade por pressão manual e as incisões cirúrgicas da musculatura e da pele foram suturadas com fio nylon 2-0. Os animais receberam uma aplicação intramuscular de 40.000UI/Kg de penicilina benzatina (Pentabiotico reforçado® - Fort Dodge® –Brasil). A recuperação anestésica foi realizada em sala anexa ao centro cirúrgico.

4.8. Diagnóstico de gestação

As fêmeas que não retornaram ao estro após 45 dias da IA foram submetidas a um exame de ultrassonografia transabdominal para o diagnóstico de gestação. Para isto, entre 45 e 55 dias após o procedimento da IA as fêmeas foram contidas fisicamente e examinadas com uma probe convexa de 5 MHz e um aparelho Scanner 100LC Vet (Pie Medical Equipment B.V.- Holanda).

4.9. Indução de luteólise

As fêmeas que tiveram a gestação confirmada por ultrassom após a primeira IA, receberam imediatamente uma aplicação intramuscular de 265µg (1mL) de cloprostenol sódico (Ciosin® - Shering Plough Coopers®) para a indução da luteólise e absorção fetal. Este procedimento foi realizado para que as fêmeas pudessem ser submetidas a uma nova IA. Para confirmação da luteólise, o estro comportamental foi monitorado diariamente após a administração do cloprostenol. As fêmeas que tiveram a prenhez confirmada após a segunda IA, não foram submetidas a indução de luteólise, podendo manter a gestação até o final.

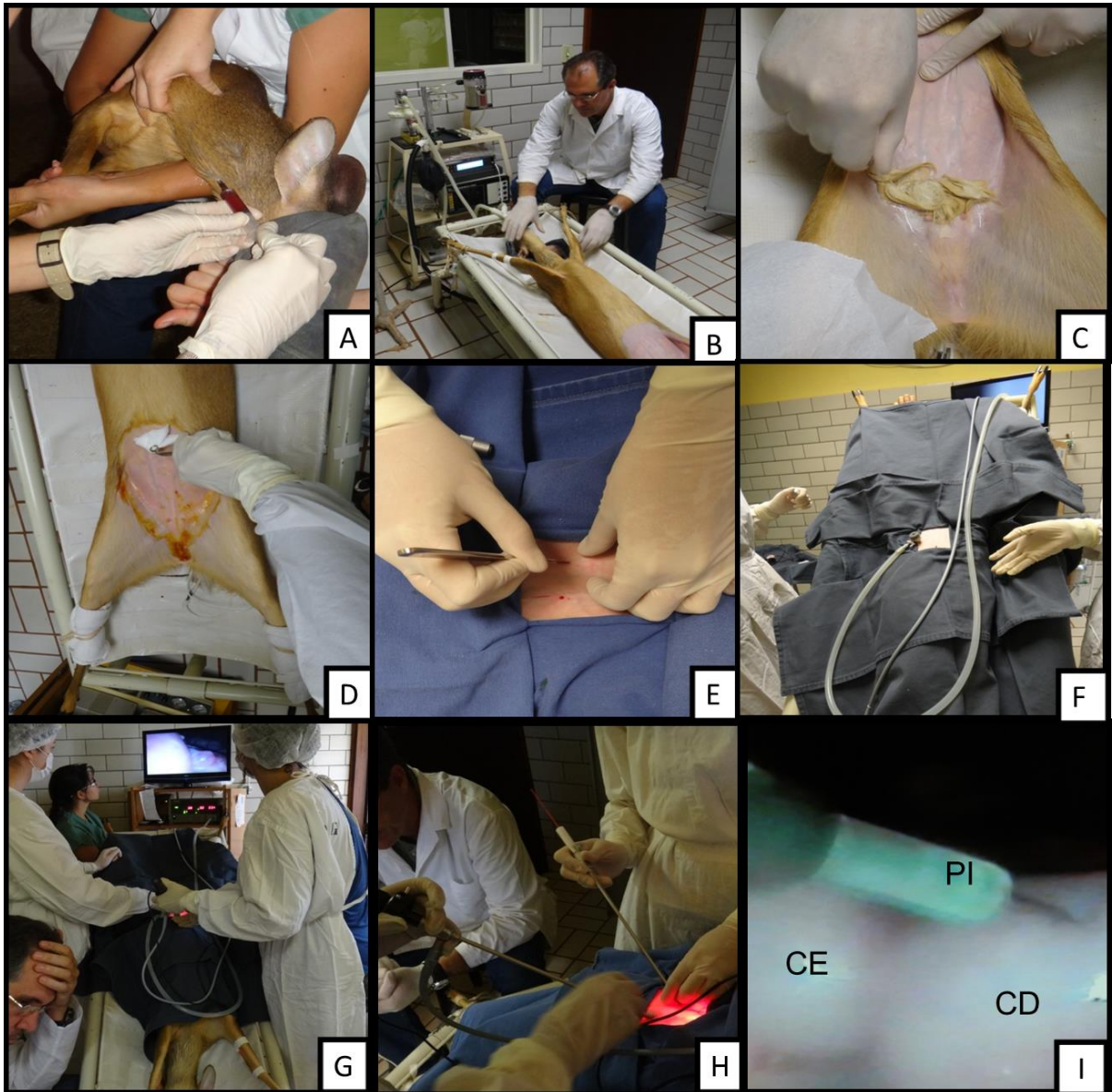


Figura 4. (A) Administração intra-venosa de fármacos anestésicos em uma fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* contida fisicamente (B) Animal intubado, mantido em plano anestésico em decúbito dorsal (C) Tricotomia da região abdominal (D) Anti-sepsia cirúrgica (E) Incisão da pele com o bisturi (F) Insuflação da cavidade abdominal com CO₂ após colocação de trocáter e posicionamento do animal a 45° (G) Acoplamento da micro-câmera à óptica após a segunda trocaterização (H) Introdução do aplicador de sêmen na bainha lateral (I) Introdução do sêmen, através da pipeta de inseminação, nos cornos uterinos (CD = corno direito; CE = corno esquerdo; PI = pipeta de inseminação) (Fotos: I. M. Tomazella).

4.10. Dosagem hormonal de progestágenos fecais

4.10.1. Colheita de fezes

Foram colhidas amostras de fezes de todas as fêmeas por um período de 20 dias após a retirada do dispositivo intravaginal CIDR[®] e durante sete dias após a indução da luteólise (item 4.9.). Para isso, as baias foram limpas diariamente às 18:00 horas e as fezes colhidas também diariamente entre as 9:00 e 10:00 horas, impedindo dessa forma, que as amostras tivessem sido defecadas a mais de 16 horas. No entanto, o aspecto das fezes foi analisado antes da colheita e as que sugeriam defecação recente (cíbalos claros, úmidos e brilhantes) foram preferidas devido ao seu período reduzido de exposição ao ambiente. Foram armazenadas em sacos plásticos, previamente identificadas com o nome do animal e data. Logo após a colheita, o material foi congelado (-20° C) e mantido nesta temperatura até o processamento.

4.10.2. Processamento das fezes

- Homogeneização: as amostras inicialmente foram secas em estufa (320-SE[®] - Fanem[®] Ltda - São Paulo - Brasil) a 56°C por aproximadamente 72 horas (YAMAUCHI et al., 1997; HAMASAKI et al., 2001) para diminuir a influência da água nas dosagens hormonais e favorecer a homogeneização destas nos casos de disfunções gastroentéricas, como diarreia e constipação (BROWN e WILDT, 1997). Posteriormente, foram trituradas com auxílio de um martelo de borracha (Figura 5A) e armazenadas em tubos identificados (Figura 5B).
- Extração dos metabólitos fecais: para a extração dos metabólitos fecais, pesou-se 0,5g de amostra processada e adicionou-se 5 mL de metanol 80%. Posteriormente as amostras foram agitadas em vortex por um minuto e colocadas em agitador multifuncional (VDRL Shaker TS-2000A, Biomixer) por 12 horas. Após esse

procedimento, as amostras passaram novamente pelo vortex por um minuto e foram centrifugadas a 377xg por 20 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C (GRAHAM et al. 2001) (Figura 5C).

- Validação das dosagens hormonais: o ensaio foi validado com os testes de paralelismo e dose resposta (BROWN et al. 2004), já realizados por Zanetti et al. (2010) para averiguar a eficácia das dosagens das progestinas fecais nas fezes de veado-catingueiro.

- Ensaio Imunoenzimático (EIA): as dosagens foram realizadas por EIA, no laboratório de endocrinologia do NUPECCE, utilizando o anticorpo CL425 (California University – Davis – CA - USA). Este anticorpo foi escolhido por apresentar alta reatividade cruzada com os metabólitos excretados nas fezes de *Mazama gouazoubira* - 5 α - e 5 β - pregnanes (POLEGATO, 2004). Todos os extratos fecais foram diluídos (1:250, 1:500 e 1:750) em tampão de diluição e dosados em duplicata (Figura 5D). Durante as dosagens hormonais foram utilizados como controles internos os coeficientes de variação interensaio, que asseguraram a acurácia, a repetibilidade e a comparabilidade dos dados obtidos com EIA. Os coeficientes de variação interensaio foram de 8,7% e 4,6%, para o controle com alta (28,8% de ligação média) e baixa (68,3% de ligação média) concentração de progestágenos, respectivamente. As concentrações de progestágenos foram expressas em nanograma por grama de fezes secas (ng/g fezes).

4.11. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A taxa de concepção (número de gestações/ número de IA) foi reportada em porcentagem (%).

Para análise dos dados, foi usado o teste t de Student para amostras independentes. Os valores da concentração de hormônios fecais foram submetidos à transformação logarítmica devido à heterogeneidade das variâncias (MORROW et

al., 1995). As análises foram feitas com programa Minitab Statistical Software® Release14.1 e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

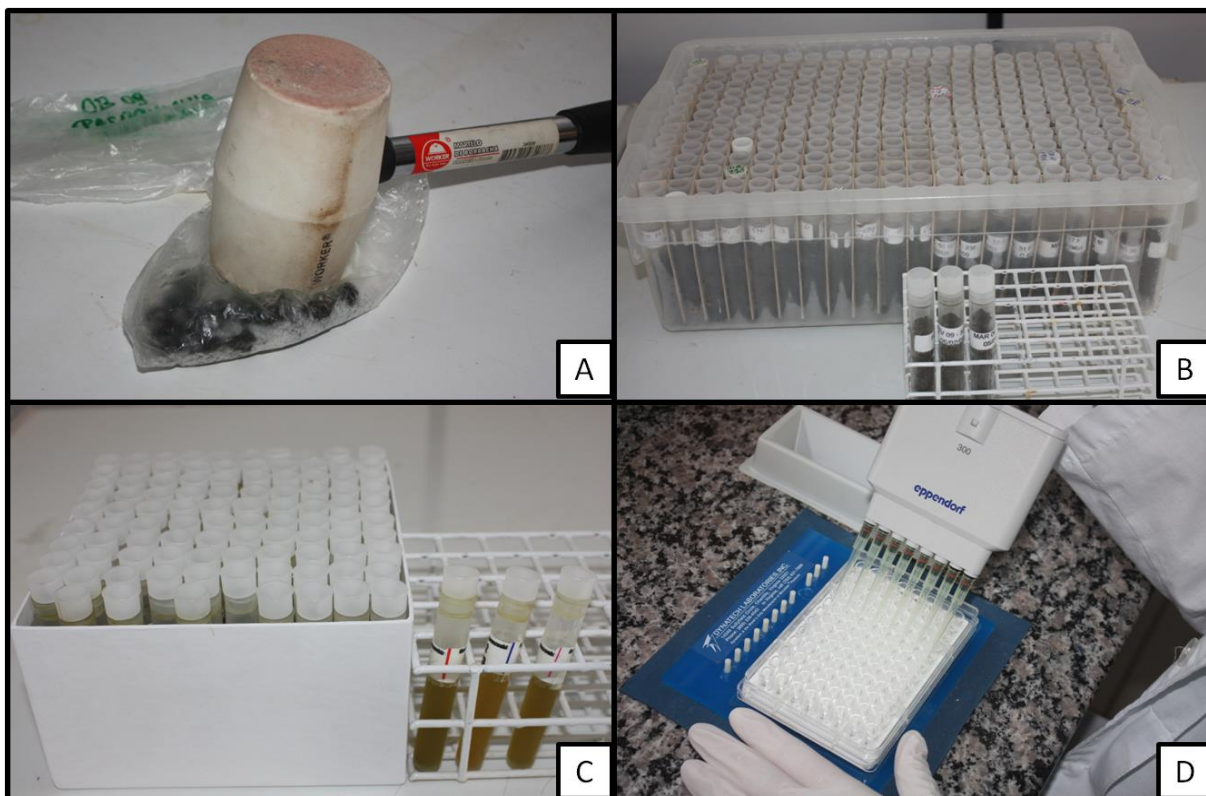


Figura 5. (A) Amostras de fezes secas sendo trituradas com martelo de borracha (B) Amostras já trituradas armazenadas em tubos previamente identificados (C) Extratos fecais armazenados em tubos individuais identificados (D) Procedimento de dosagem por enzimaímunoensaio.

5. RESULTADOS

5.1. Análise seminal

As análises de sêmen foram realizadas como pré-requisito na escolha da melhor partida a ser utilizada nos procedimentos de IA. Após a avaliação de todos os parâmetros, a partida 3 foi a escolhida por apresentar melhores resultados na maioria dos testes. Os resultados individuais seguem descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação comparativa de amostras de sêmen (**Amostra 1, 2 e 3**) de três animais de vida livre da espécie *Mazama gouazoubira* com a finalidade de escolher a melhor para o uso nos procedimentos de inseminação artificial.

		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Motilidade/ vigor	Pré-congelamento	30% / 2 ¹	80% / 4	80% / 4
	Pós-descongelamento	70% / 3	40% / 1	60% / 3
Defeitos maiores	Pré-congelamento	31%	11%	32%
	Pós-descongelamento	36%	11%	33%
Defeitos menores	Pré-congelamento	26%	31%	14%
	Pós-descongelamento	29%	71%	18%
Integridade do acrossoma	Pós-descongelamento	34%	34%	62%
Integridade de membrana plasmática	Pós-descongelamento	76%	67%	78%
Índice de fragmentação de DNA	Pós-descongelamento	0,3%	0,7%	0,5%
Teste de termorresistência	Média motilidade/ vigor (tempo avaliado)	34% / 2,2 (180 min.)	31% / 1,5 (180 min.)	44% / 2 (210 min.)

¹Análises feitas com sêmen resfriado por impossibilidade de avaliação do sêmen fresco no campo.

5.2. Monitoramento do estro e inseminação artificial

Durante o período de monitoramento das cinco fêmeas (máximo de 12 meses) antes do início do protocolo de sincronização, pode-se observar que nem todos os animais apresentaram manifestações de estro regulares. Não foi possível detectar estro comportamental natural da fêmea 5 (monitorada por quatro meses), enquanto a fêmea 4 apresentou apenas dois estros comportamentais naturais não consecutivos, durante os 12 meses de monitoramento, impossibilitando a determinação da duração do seu ciclo estral (período compreendido entre a observação de um estro comportamental e outro). A duração média do ciclo estral foi de $27,5 \pm 0,6$ dias (variação de 24-33 dias). Os resultados individuais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Período de monitoramento do estro comportamental de cada fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* e a duração média do ciclo estral.

Fêmea	Período de monitoramento (meses)	Estros observados	Estros por mês	Ciclos regulares observados	Duração média do ciclo estral dias (EPM)
1	9	5	0,55	2	32±(0,5)
2	12	10	0,83	8	27±(0,77)
3	12	10	0,83	7	26±(0,69)
4	12	2	0,16	-	-
5	4	0	0	-	-

Foram realizados nove procedimentos de IA, porém apenas oito foram avaliados quanto a taxa de gestação (Procedimentos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9), devido ao óbito da fêmea 3 logo após o sexto procedimento, por aspiração de conteúdo ruminal. Dos oito procedimentos avaliados quanto a taxa de gestação, três fêmeas (Fêmeas 2, 4 e 5) não apresentaram retorno ao estro após quatro procedimentos (2,

4, 8 e 9) e foram diagnosticadas como gestantes (Figura 6). Dessa forma, a taxa de concepção foi de 50% (4/8).

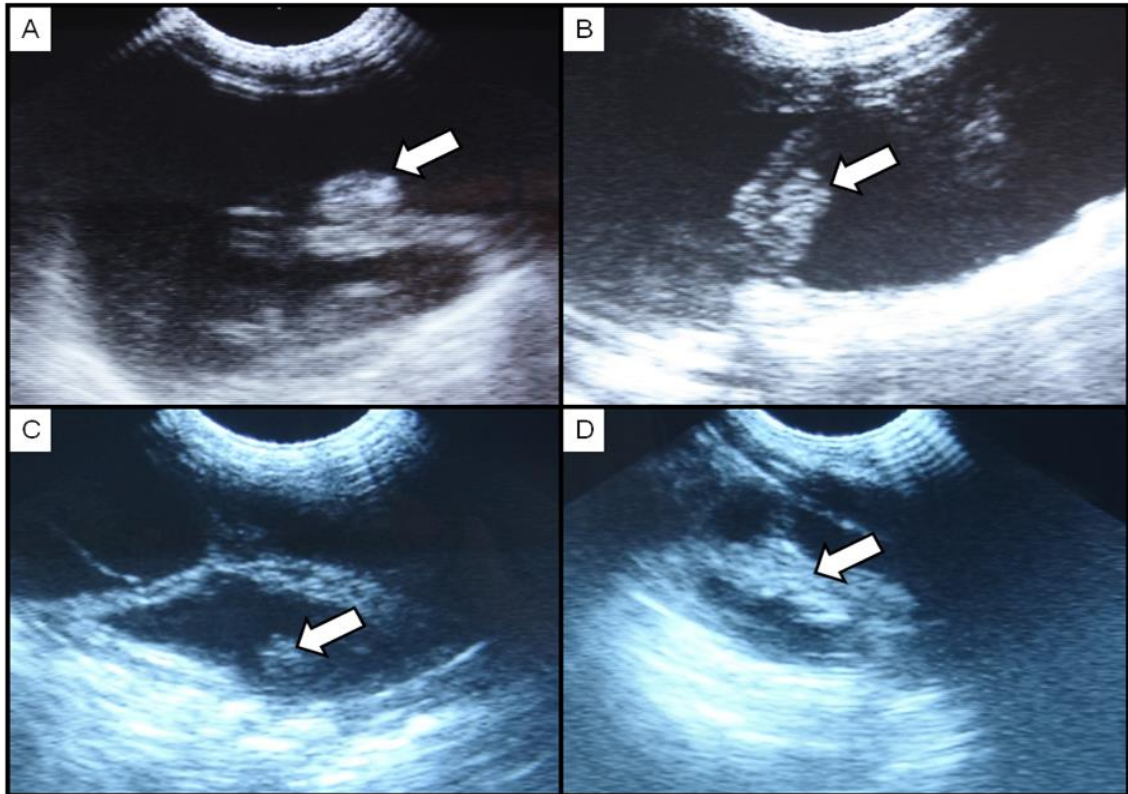


Figura 6. Imagens ultrassonográficas por via transabdominal das quatro fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*, que não apresentaram estro comportamental após as inseminações artificiais. Setas indicam os embriões. **(A)** Fêmea 2 - procedimento 2, com 55 dias de gestação **(B)** Fêmea 4 - procedimento 4, com 46 dias de gestação **(C)** Fêmea 4 - procedimento 8, com 50 dias de gestação **(D)** Fêmea 5 - procedimento 9, com 47 dias de gestação (Fotos: E. S. Zanetti).

O intervalo de tempo entre a retirada do implante de progesterona e o início do estro comportamental variou entre 50 e 98 horas, dessa forma, a sincronia, ou seja, o intervalo entre a primeira e a última fêmea a exibir o comportamento de estro, foi de 48 horas. A duração do estro comportamental pode ser avaliada em oito dos nove procedimentos e variou de 18 a 36h. A variação de tempo entre a retirada do implante e a IA foi de 64 a 112h. O tempo entre a retirada do dispositivo de progesterona e o início do estro comportamental não foi significativamente diferente

entre os animais gestantes e não gestantes, embora possa ser observado maior intervalo de tempo nos animais não gestantes. A duração do estro entre animais gestantes e não gestantes também não apresentou diferença significativa. As médias e os valores individuais estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Dia do ciclo estral das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* no início do protocolo de sincronização (CIDR® por 8 dias associado a uma aplicação de cloprostenol no dia 8) e seus subsequentes resultados nos nove procedimentos de inseminação artificial.

	Procedimento	Dia do ciclo ¹	Tempo para Início do estro ²	Tempo para IA ³	Duração do estro	Motilidade e vigor espermático ⁴
Não gestantes	1	5	68	81	18	40% e 3
	3	-	98	112	30	30% e 2
	5	-	98	112	30	30% e 2
	6	4	82	95	-	30% e 2
	7	14	62	75	30	30% e 3
	Média ± EPM	-	81,6 ± 7,4 ^a	95,0 ± 7,6	27,0 ± 3,0 ^a	30% ⁵ e 2 ⁵
Gestantes	2	-	98	112	30	40% e 2
	4	-	50	64	30	50% e 3
	8	-	50	64	36	40% e 3
	9	-	56	70	18	40% e 3
	Média ± EPM	-	63,5 ± 11,5 ^a	77,5 ± 11,5	28,5 ± 3,7 ^a	40% ⁵ e 3 ⁵
T ⁶	Média ± EPM	-	73,5h ± 6,9	87,2 ± 6,9	27,7h ± 2,2	-

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,05). ¹dia 0= estro comportamental, ²tempo entre a retirada do dispositivo de progesterona e início do estro comportamental (horas), ³tempo entre a retirada do dispositivo de progesterona e a inseminação artificial (horas), ⁴análise do sêmen após o descongelamento e imediatamente antes da inseminação artificial, ⁵ Moda, ⁶Média de todos os procedimentos.

5.3. Concentração de progestágenos fecais

O acompanhamento das concentrações de progestágenos fecais foi realizado após oito procedimentos de IA, pois a fêmea 3 foi a óbito após o procedimento 6, impedindo o seu monitoramento. Em todos os procedimentos analisados houve

queda nas concentrações de progestágenos fecais após a retirada da fonte exógena de progesterona (CIDR®) e esta queda foi coincidente com o período de estro comportamental das fêmeas. Após este período, houve aumento nas concentrações fecais de progestágenos (Figura 7).

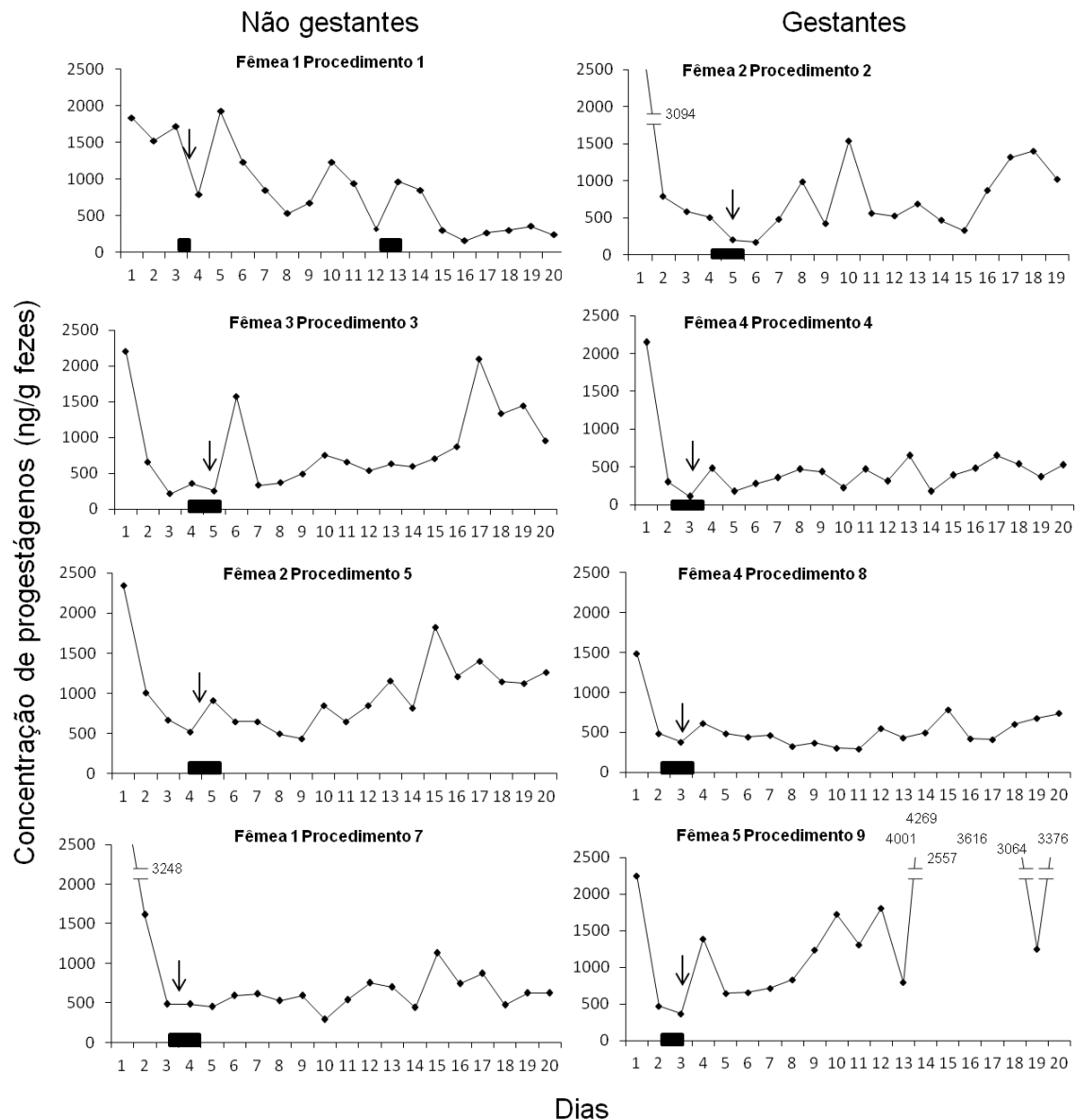


Figura 7. Concentrações de progestágenos fecais após oito procedimentos de sincronização de estro e inseminação artificial (IA) em cinco fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*. Dia 1 = dia seguinte ao fim do tratamento de sincronização (retirada do dispositivo de progesterona). Barras pretas indicam estro comportamental e setas indicam o dia da IA.

A concentração média de progestágenos fecais no período de estro comportamental foi calculada a partir dos menores valores de progesterona, apresentados neste período (valor do dia ou do dia posterior ao estro comportamental), de cada procedimento. As concentrações médias luteais de progestágenos fecais foram calculadas a partir dos três últimos dias de colheita de cada procedimento, correspondente ao período médio da fase luteal (Pereira et al, 2006a; Zanetti et al., 2010). Os procedimentos 1 (fêmea 1) e 6 (fêmea 3) foram excluídos destas médias, pois as fêmeas apresentaram repetição do comportamento de estro 10 dias após a IA (Figura 7) e óbito após o procedimento de IA, respectivamente.

Houve aumento significativo nos níveis de progestágenos fecais na fase luteal em relação ao período de estro comportamental. O mesmo ocorreu quando os valores dos períodos de estro e luteal foram calculados e comparados nos animais gestantes. No entanto não houve diferença significativa entre os períodos nos animais não gestantes, assim como não houve diferença entre animais gestantes e não gestantes quanto aos valores dos períodos de estro e luteal (Figura 8).

As fêmeas 2 e 4 com gestação confirmada na primeira IA (procedimentos 2 e 4), submetidas a indução de luteólise, apresentaram estro comportamental 96 e 48 horas após a aplicação de cloprostenol sódico, respectivamente. Na Figura 9 pode-se observar uma diminuição na concentração de progestágenos fecais, coincidente com o estro comportamental.

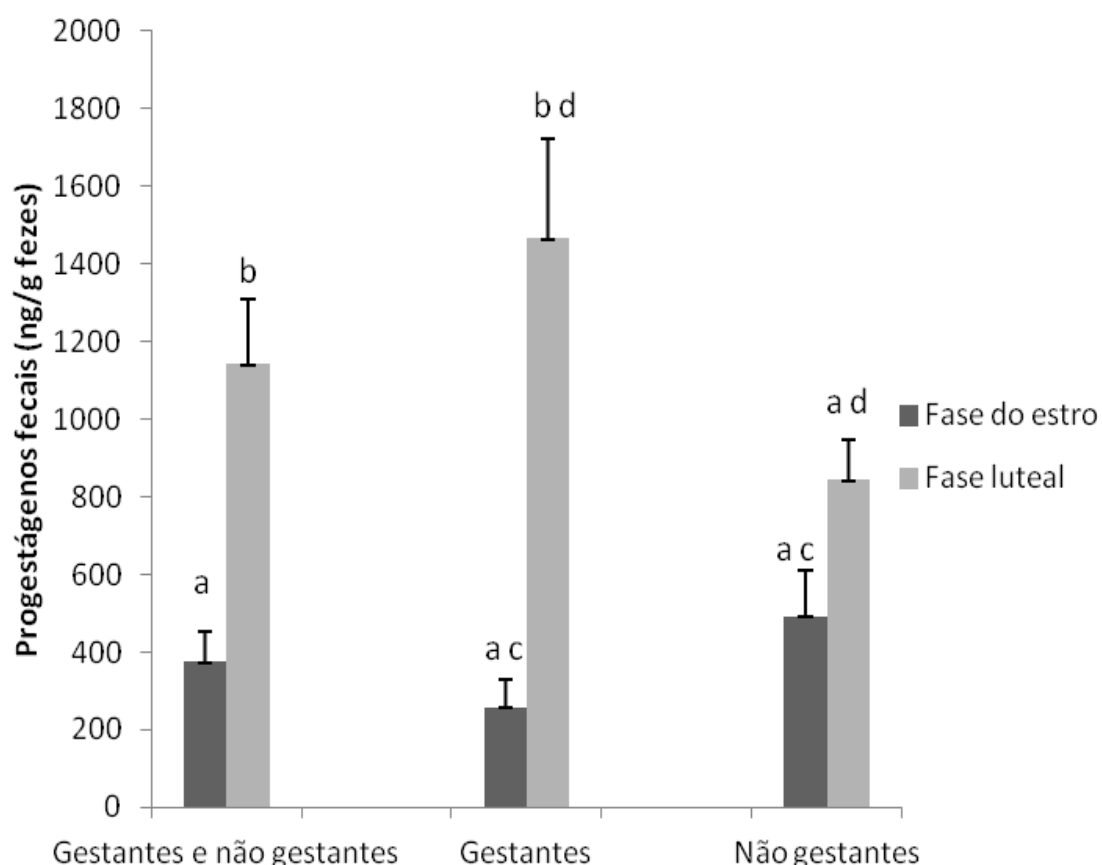


Figura 8. Concentrações médias ($\pm$ EPM) de progestágenos fecais nas fases de estro (dia do estro ou dia posterior ao estro comportamental em cada procedimento) e luteal (três últimos dias de colheita de cada procedimento), considerando os procedimentos de sincronização de estro/inseminação artificial no grupo total de animais (gestantes e não gestantes, $n=7$), no grupo dos animais gestantes ($n=4$) e no grupo dos animais não gestantes ($n=3$) da espécie *Mazama gouazoubira*. Letras diferentes (a e b) entre colunas de um mesmo grupo representam diferença significativa ($p < 0,05$) e letras diferentes (c e d) entre colunas de grupos diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de student.

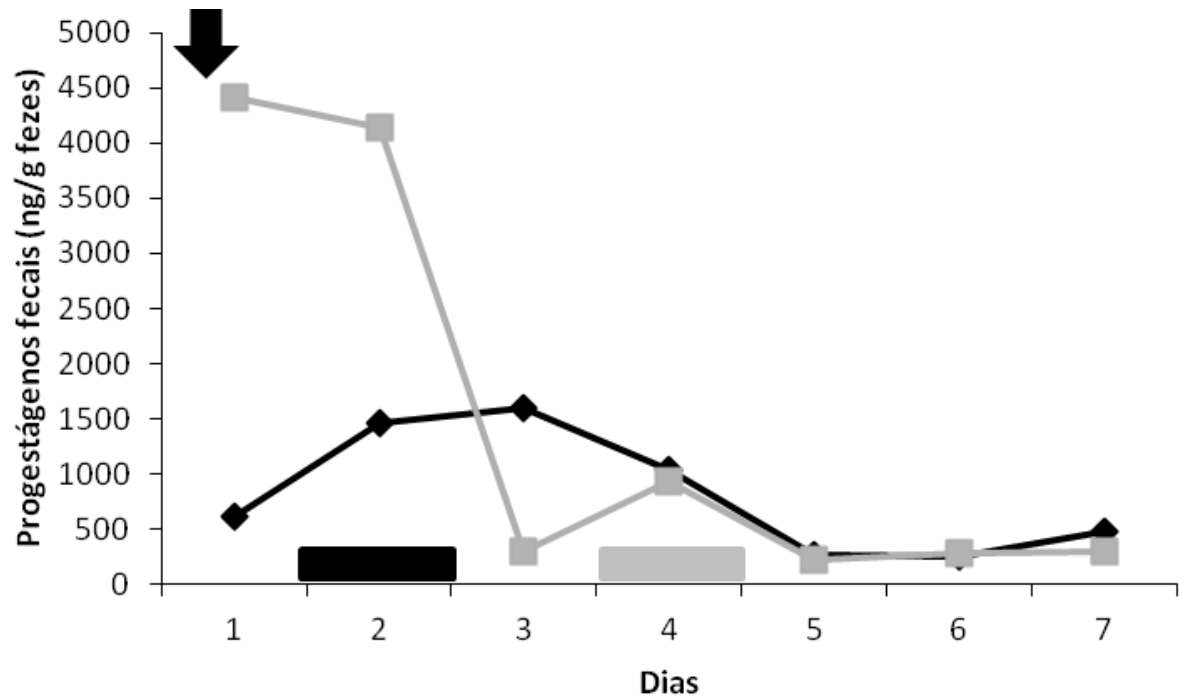


Figura 9. Concentração de progestágenos fecais de duas fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira* submetidas a indução da luteólise após o diagnóstico de gestação. Seta indica o dia da aplicação de cloprostenol sódico. Barra indica estro comportamental. Cinza: Fêmea 2 - procedimento 2; Preto: Fêmea 4 - procedimento 4.

6. DISCUSSÃO

Não há relatos da IA por videolaparoscopia na espécie *M. gouazoubira*. O único relato de IA descrito até o momento para esta espécie, utilizando sêmen congelado com deposição vaginal, não resultou em gestação (DUARTE e GARCIA, 1995). Resultados semelhantes ao presente estudo, utilizando a técnica de IAUL, foram relatados para a espécie *O. virginianus* (45%) e *D. dama* (56%), após protocolos de sincronização com CIDR® (12-14 dias) associados a eCG no final do tratamento (MELLADO et al., 2013; FENNESSY et al., 1990). Taxas de gestação superiores (65-73%) utilizando a mesma técnica foram relatadas para a espécie *D. dama*, após sincronização de estro com protocolos de CIDR® (14 dias) associados ou não a cloprostenol no início dos tratamentos (ASHER et al., 1992b; JABBOUR et al., 1993b; ASHER et al., 1990b). Estes procedimentos de IAUL foram realizados, no máximo, 70 horas após o término do tratamento de sincronização, desta forma, as altas taxas de gestação encontradas por estes autores podem indicar que, quanto maior o tempo decorrente entre o término do tratamento e a IA, menor a taxa de gestação, assim como já relatado em caprinos (BARIL et al., 1993). Melhores resultados nas taxas de gestação em cervídeos são obtidos quando as IAs são realizadas de 65 a 68 horas após a retirada do CIDR®, entre 4-7 horas antes da ovulação (ASHER et al., 1990a). No presente estudo, os procedimentos resultantes em gestação apresentaram menor intervalo de tempo entre a retirada do dispositivo e início do estro, quando comparados com os procedimentos não resultantes em gestação, embora esta análise não tenha sido significativa.

O conhecimento do momento do estro e da ovulação tem grande importância em programas de IA com sêmen congelado. No entanto, existe uma variação considerável na resposta ao tratamento hormonal de acordo com a espécie e o tipo de progestágeno utilizado e poucas pesquisas avaliam os efeitos destes fatores na maioria das espécies de cervídeos (ASHER et al., 2000). Dessa forma, em protocolos onde não se utiliza fármacos para sincronizar a ovulação é importante que a IA seja realizada após o início do estro (SONTAKKE et al., 2009). Taxas de gestação de 73% foram encontradas em *O. virginianus*, em IA realizadas 10-12

horas após o início do estro natural (JACOBSON et al., 1989). Este período foi semelhante ao utilizado no presente estudo (12-14 horas após o início do estro) e parece adequado para a espécie *M. gouazoubira*, uma vez que não se conhece o momento exato do pico de LH e da ovulação no protocolo de sincronização utilizado.

Todos os animais apresentaram estro após o término do tratamento hormonal, dessa forma o protocolo foi eficiente para sincronização de estro na espécie *M. gouazoubira*, corroborando com Zanetti et al. (2010). O intervalo entre a retirada do CIDR® juntamente com a administração do Ciosin® e o início do estro foi semelhante ao encontrado por estes autores e diferente do encontrado por Duarte e Garcia (1995) (48-72 horas), utilizando esponjas intravaginais de medroxiprogesterona por 14 dias, possivelmente devido a exposição à progesterona por longos períodos, que diminui o tempo para início do estro. Protocolos com DIP por períodos prolongados (12 dias) na espécie *C. elaphus* apresentaram menores variações no tempo entre a retirada do DIP e início do estro (81-96 horas) (FLINT et al. 1997), comparado com protocolos de curta duração (8 dias) em *D. dama* (71-120 horas) (MORROW et al. 1995). No entanto, embora o tempo de permanência dos DIP seja inversamente proporcional ao tempo de início do estro e, este seja um fator importante para o sucesso da IA, os longos períodos de exposição dos folículos a progesterona também têm sido associados a baixas taxas de fertilidade (FENNESSY et al., 1990; JABBOUR et al., 1993a). Sendo assim, os protocolos de sincronização podem ser melhorados reduzindo a permanência do CIDR® para 6-7 dias (suficiente para abranger o surgimento da primeira onda folicular) e ajustando as concentrações de progesterona dos dispositivos para concentrações mais próximas às fisiológicas (MCCORKELL et al., 2007).

Embora eficiente para sincronizar o estro, o protocolo utilizado no presente estudo, resultou em baixa sincronia entre os animais. Este fato pode ter ocorrido devido a não sincronização da onda folicular e poderia ser minimizado com a associação de fármacos como o estradiol no momento da inserção do DIP (ROCHA, 2000), que induziria a atresia dos folículos, independente do estágio de desenvolvimento, possibilitando o recrutamento de nova onda de crescimento folicular, com desenvolvimento sincronizado de um novo folículo dominante (DRIANCOURT, 2000); ou com o eCG na retirada do DIP (MENCHACA et al., 2004),

que provocaria um reforço gonadotrófico extra, diminuindo a diferença do tempo de ovulação entre os animais. A sincronização da onda folicular e da ovulação, permitiria ainda o uso da IATF, pois a variabilidade entre as ovulações pode ser uma das causas das baixas taxas de gestação, conforme já relatado em ovinos (SOUZA et al., 1995). A possibilidade de programar o procedimento de IA, sem a necessidade de monitorar o estro, facilitaria o manejo dos animais, além de permitir um tempo de jejum mais prolongado, o que minimizaria os riscos de regurgitação e aspiração de conteúdo ruminal, como ocorreu no procedimento 6 (fêmea 3). Em estudos com caprinos, Cordeiro (2006) observou que, um tempo menor de restrição alimentar predispõe a regurgitação do conteúdo ruminal, favorecido pela posição em *Trendelenburg*.

No presente estudo, o tempo para o pico pré-ovulatório de LH, pode ter sido influenciado pelo estresse provocado pela manipulação dos animais (MORROW et al., 2009) e pela anestesia, que também pode induzir inibição transitória na liberação de gonadotrofinas responsáveis pela ovulação (POLETONI et al., 2003). Dessa forma a utilização do LH no momento da IA, pode ter minimizado os efeitos inibitórios, assim como já observado em *Capra pyrenaica hispanica*, nas quais utilizou-se a gonadotrofina coriônica humana (hCG) no momento da IA com este mesmo objetivo (SANTIAGO-MORENO et al., 2006). No entanto, é possível que a administração de LH no momento da IA tenha influenciado a duração do estro comportamental, uma vez que a duração do estro no presente estudo (18-36 horas) foi menor do que a descrita por Zanetti et al. (2010) (24-52 horas), utilizando o mesmo protocolo de sincronização.

O estro comportamental tem início quando as concentrações de progesterona atingem níveis basais (BERG et al., 2008). Neste trabalho, as concentrações mais baixas de progestágenos fecais coincidiram com o dia do estro ou com um dia posterior a ele, devido ao tempo necessário para que a progesterona fosse metabolizada e excretada (PEREIRA et al., 2006). O aumento significativo nas concentrações médias de progestágenos fecais na fase luteal em relação ao período de estro, sugere a ocorrência de ovulação e presença de CL funcional. No entanto, não foi possível avaliar este fato individualmente em todos os procedimentos, uma vez que, alguns animais apresentaram perfis hormonais atípicos. A fêmea quatro,

embora diagnosticada como gestante após os dois procedimentos, apresentou baixas concentrações de progestágenos fecais durante todo o período avaliado. No entanto, apresentou estro comportamental característico após a retirada do DIP nos dois procedimentos e após a indução da luteólise no procedimento quatro. A fêmea um, no procedimento um, apresentou repetição do comportamento de estro 10 dias após a IA, sugerindo regressão prematura do CL formado após a sincronização. Esta mesma fêmea apresentou duração média do ciclo estral de 32 dias (variação 31-33 dias). Ciclos estrais prolongados (> 30 dias) podem estar relacionados à função incomum do CL (PEREIRA et al., 2006). A duração média do ciclo estral ($27,5 \pm 0,6$ dias) no presente estudo, foi semelhante aos valores encontradas por Santos et al. (2001), $24 \pm 3,05$ dias (18 a 30 dias) e por Pereira et al. (2006a), $26,9 \pm 1,7$ dias (21 a 37 dias).

A utilização de sêmen fresco normalmente resulta em melhores taxas de gestação (30-100%), porém procedimentos de IA com sêmen congelado têm sido amplamente utilizados, apresentando taxas de gestação muito variáveis (0-85% - revisado por MORROW et al., 2009). A qualidade seminal é fundamental para o sucesso na IA (LUZ et al., 2000), porém a criopreservação pode causar danos celulares e funcionais para os espermatozoides, levando a taxas reduzidas de gestação (SONTAKKE et al., 2009). Desta forma, a avaliação prévia do sêmen para a escolha de uma amostra de boa qualidade, conforme realizado no presente estudo é uma etapa importante da IA. Os procedimentos resultantes em gestação foram realizados com sêmen que apresentou motilidade mínima de 40% no pós-descongelamento, avaliados imediatamente antes da IA. Jacobson et al. (1989) obtiveram 100% de gestação após IA utilizando sêmen com motilidade progressiva maior que 70% e 66% de gestação utilizando sêmen com motilidade progressiva menor que 60%. Aller et al. (2009) utilizaram sêmen com mais de 30% de motilidade e obtiveram resultados inferiores ao do presente estudo quanto a taxa de gestação (36,8%).

Embora o número amostral deste estudo seja pequeno, sugerimos que os melhores resultados na IAUL da espécie *M. gouazoubira*, podem ser obtidos quando a IA for realizada até 98 horas após o término do tratamento de sincronização com

CIDR[®] (8 dias), com sêmen que apresente, no mínimo, 40% de motilidade no pós-descongelamento.

7. CONCLUSÕES

- A IAUL com sêmen congelado, nas condições do presente experimento mostrou ser uma técnica eficiente para a espécie *M. gouazoubira*.
- As avaliações realizadas no sêmen foram eficientes para a escolha de uma amostra de boa qualidade para ser utilizada nos procedimentos de IA.
- Durante o período avaliado, não foi possível avaliar a funcionalidade do CL, em todos os procedimentos de forma individual, com a dosagem de progestágenos fecais.
- O protocolo de sincronização de estro, nas presentes condições, foi eficiente para a espécie *M. gouazoubira*.

8. IMPLICAÇÕES

Este estudo agrega conhecimento sobre a técnica de IA na espécie *M. gouazoubira*, que poderá ser utilizada como uma ferramenta para conservação *ex situ* desta espécie e de outras correlatas. No entanto, evidencia a necessidade de estudos que refinem a sincronização do estro e da ovulação e que melhorem a criopreservação dos ejaculados.

9. REFERÊNCIAS

ALLER, J.F.; FERNANDEZ, O.; SANCHEZ, E. Fixed-time artificial insemination in red deer (*Cervus elaphus*) in Argentina. **Animal Reproduction Science**. v.115, p.312-316, 2009.

ANDRABI, S.M.H. e MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.223-243, 2007.

ASHER, G.W., FISHER, M.W., JABBOUR, H.N., SMITH, J.F., MULLEY, R.C., MORROW, C.J., VELDHUIZEN, F.A., LANGRIDGE, M. Relationship between the onset of oestrus, the preovulatory surge in luteinizing hormone and ovulation following oestrous synchronization and superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*). **Journal Reproduction Fertility**, v.96, p.261–273, 1992a.

ASHER, G.W.; MORROW, C.J.; JABBOUR, H.N.; MULLEY, R.C.; VELDHUIZEN, F.A.; LANGRIDGE, M. Laparoscopic intra-uterine insemination of fallow deer with frozen thawed or fresh semen after synchronisation with CIDR devices. **New Zealand Veterinary Journal**, v.40, n.1, p.8-14, 1992b.

ASHER, G.W.; SCOTT, I.C.; ARCHER, J.A.; WARD, J.F.; LITTLEJOHN, R.P. Seasonal luteal cyclicity of pubertal and adult red deer (*Cervus elaphus*). **Animal Reproduction Science**, v.125, p.138–147, 2011.

ASHER, G.W.; FISHER, M.W.; FENNESSY, P.F.; SUTTIE, J.M.; WEBSTER, J.R. Manipulation of reproductive seasonality of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). **Animal Reproduction Science**, v.33, p.241–265, 1993a.

ASHER, G.W.; FISHER, M.W.; FENNESSY, P.F.; MACKINTOSH, C.G.; JABBOUR, H.N.; MORROW, C.J. Oestrus synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). **Animal Reproduction Science**, v.33, p.241-265, 1993b.

ASHER, G.W.; FISHER, M.W.; SMITH, J.F.; JABBOUR, H.N.; MORROW, C.J. Temporal relationship between the onset of oestrus, the pre-ovulatory LH surge and ovulation in farmed-fallow deer (*Dama dama*). **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v.89, p.761-767, 1990a.

ASHER, G.W.; KRAEMER, D.C.; MAGYAR, S.J.; BRUNNER, M.; MOERBE, R.; GIAQUINT, M. Intrauterine insemination of Farmed fallow deer (*Dama dama*) with frozen-thawed semen via laparoscopy. **Theriogenology**, v. 34, p.569-577, 1990b.

ASHER, G.W.; MONFORT, S.L.; WEMMER, C. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. **Journal Reproduction Fertility. Suppl.** v.54, p.143-56, 1999.

ASHER, G.W. e THOMPSON, J.G.E. Plasma progesterone and LH concentrations during oestrous synchronization in female fallow deer (*Dama dama*). **Animal Reproduction Science**, v.19, p.143–153, 1989.

ASHER, G.W.; BERG, D.K.; EVANS, G. Storage of semen and artificial insemination in deer. **Animal Reproduction Science** , v.62, p.195–211, 2000.

BARIL, G.; LEBOEUF, B.; SAUMANDEL, J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. **Theriogenology**, v.40, p.621-628, 1993.

BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J.A. Estudo comparativo entre as provas rápidas e lenta de termo resistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.4, n.3-4, p.7-11, 1981.

BARROZO, L.A.; TONIOLLO, 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**, v.25, p.210-211, 2001.

BERG, D.K.; THOMPSON, J.G.; PETERSON, A.J.; ASHER, G.W. The temporal relationship between oocyte maturation and early fertilisation events in relation to the pre-ovulatory LH peak and preimplantation embryo development in red deer (*Cervus elaphus*). **Animal Reproduction Science**, v.105, p.332–343, 2008.

BERG, D.K.; THOMPSONA, J.G.; PETERSON, A.J.; ASHER, G.W. The temporal relationship between oocyte maturation and early fertilisation events in relation to the pre-ovulatory LH peak and preimplantation embryo development in red deer (*Cervus elaphus*). **Animal Reproduction Science**, v.105, p.332–343, 2008.

BLACK-DECIMA, P.; ROSSI, R.V.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J.L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J.M.B.; GONZÁLES, S.; JULIÁ J. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In: DUARTE e GONZÁLEZ. **Neotropical Cervidology**: FUNEP, p.255-270, 2010.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordisk Veterinae Medicine**, v.25, n.7, p.383-391, 1973.

BOE-HANSEN, G. B.; MORRIS, I. D.; ERSBOLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v.63, p.1789-1802, 2005.

BOWERS, S.D.; BROWN, C.G.; STRAUCH, T.A., GANDY, B.S.; NEUENDORFF, D.A.; RANDEL, R.D.; WILLARD, S.T. Artificial insemination following observational versus electronic methods of estrus detection in red deer hinds (*Cervus elephus*). **Theriogenology**, v.62, p.652–663, 2004.

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

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. **Endocrine Manual for the Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species**, 2nd ed. Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Handbook, p.1-93, 2004.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2^a ed., Belo Horizonte, 49f.,1998.

CHRISTOFOLETTI, M.D.; PEREIRA, R.J.G.; BARBANTI, J.M.B. Influence of husbandry systems on physiological stress reactions of captive brown brocket (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*)-noninvasive analysis of fecal cortisol metabolites. **European Journal of Wildlife Research**; v.56, n.4, p.561-568, 2010.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reproduction Nutrition and Development**, v.40, p.493-504, 2000.

CORDEIRO, M. F. **Avaliação da laparoscopia na aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas com ou sem estimulação ovariana hormonal**. 2006. 58f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2006.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos Animais Domésticos**. Zaragoza, Editora Acribia, 1980.

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

D'OCCHIO, M.J.; HENGSTBERGER, K.J.; JOHNSTON, S. D. Review: Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, v.101, p.1-17, 2007.

D'OCCHIO, M.J.; SUDHA, G.; JILLELLA, D.; WHYTE, T.; MACLELLAN, L.J; WALSH, J.; TRIGG, T.E.; MILLER, D. Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: A new model for superovulation. **Theriogenology**, v.47, p.601-613, 1997.

DRADJAT, A.S. Intrauterine insemination using fresh and frozen-thawed chital deer (*Axis axis*) semen. **Journal Sain Veteriner**, v. XXII, n. 2, p.10-14 2004.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.54, n.6, p.1211-1239, 2000.

DUARTE, J.M.B. e GARCIA, J.M. Reprodução assistida em Cervidae brasileiros. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.19, n.1-2, p.111-121, 1995.

DUARTE, J.M.B. e GARCIA, J.M. Tecnologia da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção. In: DUARTE, J. M. B. **BIOLOGIA E CONSERVAÇÃO DE CERVÍDEOS SUL-AMERICANOS: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997, p. 228-238.

DUARTE, J.M.B. Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em animais silvestres: o exemplo dos cervídeos. **Agrociência**, v.9, n.1-2, p.541-544, 2005.

DUARTE, J.M.B. **Guia de Identificação de Cervídeos Brasileiros**. Jaboticabal: FUNEP, p.14, 1996.

DUARTE, J.M.B.; MERINO, M.L.; GONZÁLES, S.; NUNES, A.L.V.; GARCIA, J.M.; SZABÓ, M.P. J.; PANDOLFI, J.R.; ARANTES, I.G.; NASCIMENTO, A.A.; MACHADO, R.Z.; ARAÚJO JR., J.P.; CATÃO-DIAS, J.L.; WERTHER, K.; GARCIA, J.E.; GÍRIO, R.J.S.; MATUSHIMA, E.R. Order Artiodactyla family Cervidae (deer). In: FOWLER, M. E. e CUBAS, Z. S. (Ed.). **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa State University Press, Ames, p.402–422, 2001.

DUARTE, J.M.B. e MERINO, M.L. Taxonomia e Evolução. In: DUARTE, J.M.B. **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 2-21.

EISENBERG, J.F. e REDFORD, K.H. **Mammals of the neotropics**. Chicago: The University of Chicago Press, v.3, p.340, 1999.

EVENSON, D.P. e JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v.22, p.169-189, 2000.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v.23, n.1, p.25-43, 2002.

FENNESSY, P.F.; MACKINTOSH, C.G.; SHACKELL, G.H. Artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*). **Animal Production**, v.51, p.613–621, 1990.

FLINT, A.P.F.; ALBON, S.D.; LOUDON, A.S.I.; JABBOUR, H.N. Behavioral dominance and corpus luteum function in Red deer *Cervus elaphus*. **Hormones and behavior**, v.31, p.296–304, 1997.

FRENEAU, G.E.; CHENOWETH P.J.; ELLIS R.; RUPP G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.176–181, 2009.

GARNER, D.L. e HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S.E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução animal**, 7. ed. Barueri: Manole, p.97-110, 2004.

GENTRY, G.T.; LAMBE, J.; FORBES, W.; OLCOTT, B.; SANDERS, D.; BONDIOLI, K.; GODKE, R.A. The effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) on pregnancy rates of white-tailed deer following fixed-timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.77, p.1894–1899, 2012.

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

HAMASAKI, S.; YAMAUCHI, K.; OHKI, T.; MURAKAMI, M.; TAKAHARA, Y.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Comparison of various reproductive status in sika deer (*Cervus nippon*) using fecal steroid analysis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, p.195–188, 2001.

HIEMSTRA, S.J.; LENDE, T.; WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: RUANE, J. E SONNINO, A. (Ed.). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**, FAO: Rome Italy, p.45-59, 2006.

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

IUCN 2012. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2010.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 03 July 2012.

JABBOUR, H.N.; HAYSSEN, V.; BRUFORD, M.W. Conservation of deer: contributions from molecular biology, evolutionary ecology and reproductive physiology. **Journal of Zoology**, v.243, p.461- 484, 1997.

JABBOUR, H.N.; VELDHUIZEN, F.A.; GREEN, G.; ASHER, G.W. Endocrine responses and conception rates in fallow deer (*Dama dama*) following oestrous synchronization and cervical insemination with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.98, p.495–502. 1993a.

JABBOUR, H.N.; ARGO, C.McG.; BRINKLOW, B.R.; LOUDON, A.S. Conception rates following intrauterine insemination of European (*dama dama dama*) fallow deer does with fresh or thawed Mesopotamian (*dama dama Mesopotamica*) fallow deer spermatozoa. **Journal of Zoology**, v.230, n.3, 1993b.

JACOBSON, H. A.; BEARDON, J.; WHITEHOUSE, D.B. Artificial insemination trials with white-tailed deer. **Journal of Wildlife Management**, v.53, p.224-227, 1989.

KREPSCHI, V.G.; POLEGATO, B.F.; ZANETTI, E.S.; DUARTE, J.M.B. Fecal progestins during pregnancy and postpartum periods of captive red brocket deer (*Mazama americana*). **Animal Reproduction Science**, v.137, p.62– 68, 2013.

KRZYWINSK, A. Artificial insemination and embryo transfer in deer: applying these methods for propagating endangered species. In: WEMMER, C. (Ed.). **Biology and management of the cervidae**. Washington, D.C: Smithsonian Institution Press, p. 443-449, 1987.

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

LOCATELLI, Y. e MERMILLOD, P. Caractéristiques et maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. **INRA Productions Animales**, v.18, n.1, p.3-25, 2005.

LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.37, n.2, 2000.

MAGYAR, S. T.; BIEDIGER, T.; HODGES, C.; KRAEMER, D. C.; SEAGER, W. J. A method of artificial insemination in captive white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Theriogenology**, v.31, p.1075-1080, 1989.

MCCORKELL, R.B.; WOODBURY, M.R.; ADAMS, G.P. Evaluation of an ovarian synchronization scheme for fixed-time artificial insemination in wapiti. **Theriogenology**, v.67, p.1217–1223, 2007.

MCLEOD, B.J.; MEIKLE, L.M.; FISHER, T.R.; MANLEY, T.R.; HEATH, D.A.; MCNATTY, P. Variation in antral follicle development during the follicular phase of the oestrous cycle in red deer (*Cervus elaphus*) hinds. **Reproduction**, v.121, p.697-705, 2001.

MELLADO, M.; ORTA, C.G.; LOZANO, E.A.; GARCIA, J.E.; VELIZ, F.G.; SANTIAGO, A. Factors affecting reproductive performance of white-tailed deer subjected to fixed-time artificial insemination or natural mating. **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, p.581–586, 2013.

MENCHACA, A. e RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.403- 413, 2004.

MONTEIRO, F.M.; MELO, D.S.; FERREIRA, M.M.G.; CARVALHO, L.M.; SARTORELI, E.S.; EDERHARDT, B.G.; NOGUEIRA, G.P.; BARROS, C.B. LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*), after induced estrus or after ovarian superstimulation. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.128–138, 2009.

MORROW, C.J. e MONFORT, S. L. Ovarian activity in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) determined by faecal steroid analysis. **Animal Reproduction Science**, v.53, p.191–207, 1998.

MORROW, C. J.; ASHER, G.W.; MACMILLAN, K.L. Oestrous synchronization in farmed fallow deer (*Dama dama*): effects of season, treatment duration and the male on the efficacy of the intravaginal CIDR device. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.159-174, 1995.

MORROW, C.J.; PENFOLD, L.M.; WOLFE, B.A. Artificial insemination in deer and non-domestic bovids. **Theriogenology**, v.71, p.149–165, 2009.

MORROW, C.J.; ASHER, G.W.; MACMILLAN, K.L. Oestrous synchronization in farmed fallowdeer (*Dama dama*): effects of season, treatment duration and the male on the efficacy of the intravaginal CIDR device. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.159–174, 1995.

MORROW, C.J.; ASHER, G.W.; SMITH, J.F.; JABBOUR, H.N.; MULLEY, R.C.; MCLEAY, L.M. Seasonal effects on the efficacy of intravaginal CIDR devices for oestrous synchronization of farmed fallow deer (*Dama dama*). *Proceedings New Zealand Society Animal Production*, v.52, p.165–169, 1992.

MULLER, E. e DUARTE, J. M. D. Utilização da citologia vaginal esfoliativa para monitoração de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLÓGICOS DO BRASIL**, 16. Americana, SP, 1992.

NÖTHLING, J.O. e IRONS, P.C. A simple multidimensional system for the recording and interpretation of sperm morphology in bulls. ***Theriogenology***, v.69, p.603-611, 2008.

NOWAK, R.M. **Mammals of the world**. London: The Johns Hopkins University Press, 5 ed., 1991, 1629p.

PEREIRA, R. J.G.; POLEGATO, B. F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J. A.; DUARTE, J. M. B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in Brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. ***Theriogenology***, v.65, p.387-399, 2006a.

PEREIRA, R.J.G.; DUARTE, J.M.B.; NEGRÃO, J.A. Effects of environmental conditions, human activity, reproduction, antler cycle and grouping on fecal glucocorticoids of freeranging Pampas deer stags (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). ***Hormones and Behavior***, v.49, p.114-122, 2006b.

PEREIRA, R.J.G, Métodos não-invasivos para análises hormonais aplicadas aos estudos de ecologia e etologia. ***Revista Brasileira de Zootecnia***, v.36, p.71-76, 2007.

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***, v.63, p.2113–2125, 2005.

PEREIRA, R.J.G.; ZANETTI, E.S.; POLEGATO, B.F. Femele Reproduction. In: DUARTE, J.M.B e GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology**: FUNEP, p.51-63, 2010.

PIMENTEL, D.; COOPERSTEIN, S.; RANDELL, H.; FILIBERTO, D.; SORRENTINO, S.; KAYE, B.; NICKLIN, C.; YAGI, J.; BRIAN, J.; O'HERN, J.; HABAS, A.; WEINSTEIN, C. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. ***Human Ecology***, v.35, p.653–668, 2007.

PINDER, L. e LEEUWENBERG, F. Veado-catingueiro. In: DUARTE, J. M. B. (ed). **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, p. 42-58, 1997.

POLEGATO, B.F. **Validação de método endócrino não-invasivo para o monitoramento da fisiologia reprodutiva e da atividade dos glicocorticóides em cervídeos neotropicais**. 2004. 43f. Trabalho de Graduação (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

POLEGATO, B.F. **Determinação dos perfis de estrógenos e progestinas fecais durante o ciclo estral, gestação e período pós-parto em cervos-do-pantanal (*Blastoceros dichotomus*) em cativeiro**. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

POLETINI M.O.; SZAWKA R.E.; FREITAS MARCON R.M.; VEIGA M.D.; FRANCI C.R.; ANSELMO-FRANCI J.A. A method to study preovulatory surges of gonadotropins. **Brain Research Protocols**, v.12, p.41–48, 2003.

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

PRIMACK, R.B. e RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta, 2002, 327p.

PUKAZHENTHI, B.S. e WILDT, D.E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction Fertility Development**, v.16, p.33–46, 2004.

PUTMAN, R. **The natural history of deer**. New York: Cornell University Press, 1988.

REDFORD, K. e EISENBERG, J.F. **Mammals of neotropics. The southern cone**. v. 2: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay. University of Chicago Press, 1992.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; FREGONEZI, M.N.; ROSSANEIS, B.K. **Mamíferos Do Brasil - Guia De Identificação**. 1ª edição, Technical Books Editora, Rio de Janeiro, 2010.

ROCHA, J.L. **Sincronização hormonal da onda folicular e do estro em novilhas de corte mestiças monitoradas por radiotelemetria**. 2000. 125f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROLDAN, E.R.; CASSINELLO, J.; ABAIGAR, T.; GOMENDIO, M. Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate, **Proceedings of the Royal Society of London . Series B. Biological**, v.265, p.243–248, 1998.

SADALLA FILHO, E. **Biotecnologias de reprodução na conservação de espécies animais selvagens são realmente importantes?** 2004. 94f. Monografia (especialização em manejo de animais silvestres) - Universidade Católica de São Paulo, Sorocaba, 2004.

SADLEIR, R.M.F.S. Reproduction of female cervids. In: WEMMER, C. (Ed.). **Biology and management of the cervidae**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, p.123-144, 1987.

SANTIAGO-MORENO, J.; TOLEDANO-DIAZ, A.; PULIDO-PASTOR, A.; GOMEZ-BRUNET, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; Birth of live Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. **Theriogenology**, v.66, p.283–291, 2006.

SANTOS, G.L.; CERAVOLO, L.; SOUZA, S.; DUARTE, J.M.B. Sazonalidade reprodutiva e duração do ciclo estral e do cio de fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) sob condições de cativeiro. In: **Congresso Internacional Manejo del Fauna Silvestre en Amazonía Y Latinoamerica**, Cartagena. Proceedings. p.232, 2001.

SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **Animal Health and Conservation**, v.41, p.52–74, 2007.

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

SHOJAEI, H.; KROETSCH, T.; WILDE, R.; BLONDIN, P.; KASTELIC, J.P.; THUNDATHIL, J.C. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v.77, p.940–951, 2012.

SONTAKKEA, S.D.; PATIL M.S.; UMAPATHYA, G.; RAO, K.R.; SHIVAJI, S. Ejaculate characteristics, short-term semen storage and successful artificial insemination following synchronisation of oestrus in the Indian blackbuck antelope (*Antilope cervicapra*). **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p.749–756, 2009.

SOUZA, C.J.H.; CHAGAS, L.M.; MOURA, A.; MORAES, J.C.F. Momento da ovulação em ovelhas corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e eCG. **Ciencia Rural**, v.25, n.2, p.211-281, 1995.

TIEPOLO, L.M. e TOMAS, W.M. Ordem Artiodactyla. In: DOS REIS, N.; PERACCHI, A.L.; PEDRO W.A.; DE LIMA, I.P. (Org.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: SEMA. p.287-297, 2006.

TOMAS, W.M.; TIEPOLO, L.M.; DUARTE, J.M.B. Ordem Artiodactyla. In: REIS, N.R., PERACCHI, A.L., FREGONEZI, M.N., ROSSANEIS, B.K. **Mamíferos Do Brasil: Guia De Identificação**, 2010. 503p.

UMAPATHY, G.; SONTAKKE, S.D.; REDDY, A.; SHIVAJI, S. Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). **Theriogenology**, v.67, p.1371–1378, 2007.

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 Wildlife Research**, v.55, p.535–538, 2009.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

WALKER, E. **Mammals of the world**. Baltimore and London: John Hopkins University Press. 1991, 1398p.

WHITEHEAD, G.K. **The Whitehead Encyclopedia of Deer**. London: Swan Hill Press, 1993.

WHO (World Health Organization). **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**, 5. ed. Suíça: WHO Press., 2010. 271p.

WILDT, D.E.; RALL, W.F.; CRITSER, J.K.; MONFORT, S.L.; SEAL, U.S. Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation. **Bioscience**, v.47, p.689-698, 1997.

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

WILDT, D.E. Reproductive research in conservation biology: priorities and avenues for support. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.20, p.391-395, 1989.

WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S.; BROWN, J.L.; MONFORT, S.; HOWARD, J.G.; ROTH, T.L. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.811-824, 1995.

WILLARD, S.T.; FLORES-FOXWORTH, G.; CHAPMAN, S.; DREW, M.L.; HUGHES, D.M.; NEUENDORFF, D.A.; RANDEL, R.D. Hybridization between wapiti (*Cervus elaphus manitobensis*) and sika deer (*Cervus nippon*): a comparison of two artificial insemination techniques. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.29, p.295-299, 1998.

WILLARD, S.T.; HUGHES JR., D.M.; BRINGARTS, M.; SASSER, R.G.; WHITE, D.R.; JAQUES, J.T.; GODFREY, R.W.; WELSH JR., T.H.; RANDEL, R.D. Artificial Insemination, hybridization and pregnancy detection in sika deer (*cervus nippon*). **Theriogenology**, v.46, p.779-789, 1996.

WILLARD, S.T.; NEUENDORFF, D.A.; LEWIS, A.W.; RANDEL, R.D. A comparison of transvaginal artificial insemination procedures for use in commercially farmed deer. **Small Ruminant Reserach**, v.44, p.135-140, 2002.

WILSON, E.O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 657 p., 1997.

YAMAUCHI, K.; HAMASAKI, S.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Assessment of reproductive status of Sika Deer by fecal steroid analysis. **Reproduction Fertility and Development**, v.43, p.221-226, 1997.

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

ZANETTI, E.S. e DUARTE, J.M.B. Comparison of three protocols for superovulation of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Zoo Biology**, v.31, n.6, p.642-655, 2012.

ZANETTI, E.S.; POLEGATO, B.F.; DUARTE, J. M. B. Primeiro relato de inseminação artificial com tempo-fixo em veado-mateiro (*Mazama americana*). In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2009. Belo Horizonte. **Anais XVIII congresso brasileiro de reprodução animal**, Belo Horizonte: CBRA, 2009.