

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
- CÂMPUS DE JABOTICABAL -**

**ANÁLISE COMPARATIVA DE CARACTERÍSTICAS
SEMINAIS DE *Mazama* CINZAS BRASILEIROS –
MORFOMETRIA ESPERMÁTICA E PROTEÔMICA DO
PLASMA SEMINAL**

Marina Suzuki Cursino
Médica Veterinária

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
- CÂMPUS DE JABOTICABAL -**

**ANÁLISE COMPARATIVA DE CARACTERÍSTICAS
SEMINAIS DE *Mazama* CINZAS BRASILEIROS –
MORFOMETRIA ESPERMÁTICA E PROTEÔMICA DO
PLASMA SEMINAL**

Marina Suzuki Cursino

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

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

2014

Cursino, Marina Suzuki
C977a Análise comparativa de características seminais de *Mazama*
cinzas brasileiros – morfometria espermática e proteômica do plasma
seminal / Marina Suzuki Cursino. – – Jaboticabal, 2014
xi, 82 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

Banca examinadora: Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura,
Marcelo Emílio Beletti, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima,
Lindsay Unno Gimenes.

Bibliografia

1. Espermatozoide. 2. *Mazama gouazoubira*. 3. *Mazama*
nemorivaga. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:636.082.4:636.294


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE COMPARATIVA DE CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE *Mazama* CINZAS BRASILEIROS - MORFOMETRIA ESPERMÁTICA E PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL


AUTORA: MARINA SUZUKI CURSINO

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ARLINDO DE ALENCAR ARARIPE NORONHA MOURA

Universidade Federal do Ceará / Fortaleza/CE


Prof. Dr. MARCELO EMÍLIO BELETTI

Universidade Federal de Uberlândia / Uberlândia/MG


Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 19 de dezembro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marina Suzuki Cursino, nascida em São Paulo-SP, Brasil, no dia 28 de novembro de 1981. Filha de José Roberto Cursino e Yuko Suzuki. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, no ano de 2006. Durante sua graduação participou da criação e da diretoria do Grupo de Estudos de Animais Silvestres – GEAS - Jaboticabal - do ano de 2003 ao ano de 2006, organizando cursos e palestras durante este período. Obteve bolsa PIBIC/CNPq para realização do Projeto de Iniciação Científica intitulado “Estudo Comparativo da Palatabilidade de Rações em Cervídeos Brasileiros Mantidos em Cativeiro” sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, no ano de 2004/2005. Integrou o Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos em 2008, participando dos projetos de pesquisa até o presente momento (2014). Em 2009 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação de Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução Animal, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e bolsa de estudos concedida pela CAPES. Em 2011, obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária com a dissertação intitulada Presença de isolamento pós-zigótico entre diferentes citótipos de *Mazama americana*: avaliação de fêmeas. No mesmo ano, iniciou o doutorado no Programa de Pós-graduação de Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução Animal, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e bolsa de estudos concedida pela CAPES, com o projeto intitulado Análise comparativa de características seminais de veados-cinza brasileiros – morfometria espermática e proteômica seminal.

“Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez 100 vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes.”

Jacob Riis

Dedico à *Yuko Suzuki*,
Pelo apoio incondicional durante o árduo caminho da vida acadêmica.
Obrigada Mãe!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, orientador de iniciação científica, mestrado e doutorado. Pela oportunidade realizar minhas conquistas acadêmicas, pelo crescimento profissional e pessoal que obtive durante anos que participei do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos;

Ao Professor Dr. Arlindo Moura da UFC - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza pela oportunidade de realizar parte desta tese em seu conceituado Laboratório de Proteômica Seminal;

Ao Doutor Maurício Van Tilburg, a Doutora (e amiga) Verônica Cadavid e ao Grupo de Pesquisa em Biologia da Reprodução, por todo ensinamento e apoio durante minha estadia em Fortaleza.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica; do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patôgenicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à Maria Dolores Seabra Ferreira (Tuca), pela assistência no processamento das amostras para microscopia de transmissão

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, da FCAV-UNESP, em especial à Claudia Maria Toffanelli Fiorillo e Claudia Regina S. Ribeirinho, pela assistência na leitura das grades de microscopia de transmissão.

Ao Professor João Pizauro e aos alunos do Laboratório de Bioquímica, da FCAV-Unesp, em especial ao Adriano e a Mareliza, minha orientada de iniciação científica entre os anos de 2013 e 2014.

À minha família, Yuko Suzuki (mãe), Juliana Hannah (irmã), Chiaki (Tia), José Carlos (tio), pelo apoio emocional, financeiro, e pela compreensão em todos os momentos (altos e baixos) que passei durante este doutorado.

Aos amigos queridos que participaram diretamente do projeto, Eveline, Luciana, Ellen e Maurício (Janota).

Aos amigos e colegas de trabalho do NUPECCE. Reprodução: Gabriela, Lincy, David, Claudia, Maria Clara e agregada Nathasha. Genética: Vanessa, Iara, Marina, Aline, Louise, Jorge, Lorena, Lívia, Mirela, Janaína e Nadime. Ecologia: Márcio, Pedro, Francisco, Max, Eugênia, Gabriella e Granada. Tratadores: Antônio (Beterraba), Gustavo e Géssica.

Aos amigos de coração pelo apoio nos momentos complicados deste doutorado, Fernanda (Nazira), Thassila, Juliana (Shirra), Vanessa (Plica), meninos da Rep. Nazarena e agregados, Claudia (100-Talá) e Eduardo (Biru), mais que um amigo, um companheiro para a vida.

Muito Obrigada!

APOIO FINANCEIRO

Esse projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, sob processo nº 10/50748-3, como parte do Projeto Temático “Os veados cinzas do Brasil (Mammalia; Cervidae; *Mazama*): A busca das variantes genéticas, morfológicas e ecológicas no sentido de explicar a complexa taxonomia e evolução do grupo”.

A bolsa de estudos foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do período de Setembro de 2011 à Setembro de 2014.

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	IV
ANÁLISE COMPARATIVA DE CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE <i>Mazama</i> CINZAS BRASILEIROS – MORFOMETRIA ESPERMÁTICA E PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL	V
<i>RESUMO</i>	V
<i>Palavras-chave</i>	V
COMPARATIVE ANALYSIS OF SEMINAL CHARACTERISTICS OF BRAZILIAN GREY BROCKET – SPERM MORPHOMETRY AND SEMINAL PLASMA PROTEIN.	VI
<i>ABSTRACT</i>	VI
<i>Keywords</i>	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS	VII
CAPÍTULO 2	IX
CAPÍTULO 3	IX
LISTA DE FIGURAS	X
CAPÍTULO 1	X
CAPÍTULO 2	X
CAPÍTULO 3	XI
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais	1
<i>Introdução</i>	1
<i>Revisão de Literatura</i>	3
Classificação taxonômica dos <i>Mazama</i> cinza Brasileiros	3
<i>Mazama</i> cinzas Brasileiros.....	5
O veado-catingueiro (<i>Mazama gouazoubira</i>).....	5
O veado-roxo (<i>Mazama nemorivaga</i>)	8
A célula espermática e a diferenciação entre as espécies.....	11
Caracterização do plasma seminal e proteômica.....	13
<i>Referências</i>	18

CAPITULO 2 – Uso da morfometria espermática como ferramenta para distinção de duas espécies de <i>Mazama</i> cinzas Brasileiros (<i>Mazama gouazoubira</i> e <i>Mazama nemorivaga</i>)	28
<i>Resumo</i>	28
<i>Palavras-chave</i>	28
<i>Introdução</i>	29
<i>Metodologia</i>	30
Animais	30
Colheita de sêmen	30
Morfometria espermática.....	31
Análises dos Dados	33
<i>Resultados</i>	33
<i>Discussão</i>	41
<i>Conclusão</i>	45
<i>Referências</i>	46
CAPITULO 3 – Diferenças dos perfis proteicos bidimensionais e proteínas do plasma seminal de veados-cinza (<i>Mazama gouazoubira</i> e <i>Mazama nemorivaga</i>)	49
<i>Resumo</i>	49
<i>Palavras-chave</i>	49
<i>Introdução</i>	50
<i>Metodologia</i>	51
Animais	51
Obtenção das proteínas do plasma seminal	52
Eletroforese SDS-PAGE bidimensional para proteínas do plasma seminal.....	53
Análise dos mapas proteicos	54
Identificação das proteínas por espectrometria de massa ESI-Q Tof (Eletrospray ionization quadrupole-time-of-flight)	54
Categorização de proteínas	56
<i>Resultados</i>	56
Eletroforese SDS-PAGE bidimensional para proteínas do plasma seminal e identificação das proteínas.....	56
Categorização das Proteínas	65
<i>Discussão</i>	67
<i>Conclusão</i>	72

<i>Referências</i>	73
CAPÍTULO 4 – Considerações Finais	82
<i>Conclusão Geral</i>	82
<i>Implicações</i>	82

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Este projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de junho de 2012. Protocolo nº 014080/12.

ANÁLISE COMPARATIVA DE CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE *Mazama* CINZAS BRASILEIROS – MORFOMETRIA ESPERMÁTICA E PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL

RESUMO – Por muito tempo *Mazama nemorivaga* foi considerado sinonímia de *Mazama gouazoubira*. Atualmente são consideradas espécies distintas conhecidas como *Mazama* cinzas brasileiros. Apesar de serem morfologicamente identificados como *Mazama*, há indícios genéticos que estas duas espécies devam ser separadas em dois novos gêneros. Uma forma de contribuir para resolução desta complexidade taxonômica é caracterizar e descrever detalhadamente cada uma das espécies no intuito de auxiliar os estudos filogenéticos, fundamentais para discutir esse problema. Assim, utilizamos dados sobre as características espermáticas para fazer comparações entre as espécies. Através de análises multivariadas discriminantes, de dados de morfometria espermática, identificamos as principais diferenças entre os espermatozoides das duas espécies. Utilizando as técnicas de eletroforese SDS-PAGE bidimensional e espectrometria de massa ESI-Q Tof, comparamos a constituição de proteínas do plasma seminal. Neste trabalho observamos que existem diferenças importantes na dimensão e no formato da cabeça dos espermatozoides das duas espécies, sendo a área e a largura as principais variáveis que as diferenciam. Através das análises discriminantes conseguimos separá-los adequadamente entre os dois grupos de espécies, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*. Ao compararmos o perfil de proteínas totais do plasma seminal, observamos diferenças na distribuição dos spots no gel de poliácridamida. Além disso, grupos distintos de proteínas foram identificadas no plasma seminal de cada uma das espécies. Esses resultados demonstraram que *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* possuem diferenças significativas nas características seminais, o que reforça a hipótese de que dois novos gêneros devem ser criados para cada uma das espécies estudadas.

Palavras-chave: Espermatozoide, *Mazama gouazoubira*, *Mazama nemorivaga*, Plasma seminal, Proteínas, Taxonomia.

COMPARATIVE ANALYSIS OF SEMINAL CHARACTERISTICS OF BRAZILIAN GREY BROCKET – SPERM MORPHOMETRY AND SEMINAL PLASMA PROTEIN.

ABSTRACT –Brazilian gray deers are represent by two species: Gray brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and Amazonian brocket deer (*Mazama nemorivaga*). They belong to genus *Mazama*, but there are genetic evidence to separate them into two different genera. To contribute to this discussion about *Mazama* taxonomic complexity, we decide to characterize and describe the seminal plasma, of these species, in detail. We performed multivariate analysis to compare sperm morphometry data and identify the main differences between two species. We also used two-dimensional electrophoresis SDS-PAGE techniques and mass spectrometry ESI-Q TOF to compare the constitution of seminal plasma. As result, we found important differences on dimension and shape of the head sperm, being area and width the main variables that differentiate them. Using discriminant analysis, we properly separate them into two groups of species, *M. gouazoubira* and *M. nemorivaga*. Comparing the protein profile of the seminal plasma, we observed differences in the distribution of spots, and were identified different groups of proteins in seminal plasma of the distinct species. These results demonstrated that *M. gouazoubira* and *M. nemorivaga* have significant differences in the semen characteristics that reinforce the hypothesis that these two species may be separated into two new genera

Keywords: *Mazama gouazoubira*, *Mazama nemorivaga*, seminal plasma, Sperm Proteins, Taxonomy

LISTA DE ABREVIATURAS

2D: Duas dimensões ou bidimensional

A: Área

AI: Alongamento

AQN (AQN 1, AQN 2, AQN 3): Proteína do plasma seminal de suínos

ART: Técnicas de reprodução assistida

aSFP I/II: *Acidic seminal fluid protein*

AWN: Proteína do Plasma seminal de suínos

Bh: *Bodhesin* - proteína do plasma seminal

BSA: Albumina sérica bovina

BSP (BSP II, BSP III, BSP A1, BSP A2, BSP A3): *Bovine seminal plasma protein*

C: comprimento

CATH-1: Catelicidina

CD44: Receptor de superfície celular

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Ditioneitol

E: Elipticidade

EBI: European Bioinformatics Institute

ESI-Q Tof: *Eletrospray ionization quadrupole-time-of-flight*

FPM: *Forward Motility Protein*

G1: Animal 1 da espécie *M. gouazoubira*

G2: Animal 2 da espécie *M. gouazoubira*

G3: Animal 3 da espécie *M. gouazoubira*

GAG: Glicosaminoglicanos

GO: *Gene Ontology*

GOA: *Gene Ontology Annotation*

GRB: Bancos de recursos genéticos

HBP: *Heparin binding protein*

HDL: *High Density Lipoprotein*

HDMS: *High Definition Mass Spectrometry*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HSP-7: *Horse seminal plasma protein*

HSS: *High Strength Silica*

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IUCN: *International Union for Conservation of Nature*

L: Largura

MS: *Mass spectrometry*

N1: Animal 1 da espécie *M. nemorivaga*

N2: Animal 2 da espécie *M. nemorivaga*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NPC2: Gene da proteína *Epididymal secretory protein E1*

P: Perímetro

PAGE: Gel de poliacrilamida

PDC-109: Proteína do plasma seminal de bovinos

PDI: *Protein disulfide-isomerase*

PS100: *Porcine calcium-binding protein*

PSP (PSP I, PSP II): Proteínas do plasma seminal de suínos

Reg: Regularidade

Rug: Rugosidade

SDS: Dodecil-sulfato de sódio

SPADH 1/2: Espermadesinas

SPTZ: Espermatozoide

STRAP: *Software Tool for Rapid Annotation of Proteins*

TCA: Ácido tricloroacético

TRIS-HCl: *(Hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride*

UniProtKB: *Universal Protein Resource Knowledgebase*

UPLC: *Ultra Performance Liquid Chromatography*

ZP: Zona Pelúcida

ZP3: *Zona pellucida glycoprotein 3*

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Resultados obtidos quanto ao volume, concentração e coloração do ejaculado de dois indivíduos de *Mazama nemorivaga* e três indivíduos de *Mazama gouazoubira* em diferentes épocas do ano.....34

Tabela 2. Médias e desvio padrão das medidas de dimensão e formato da cabeça dos espermatozoides das espécies de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, (valor de p para $\alpha=0,05$).....36

Tabela 3. Matriz criada pela análise discriminante da identificação dos espermatozoides nos determinados grupos de espécies (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*). Foram analisados 990 espermatozoides, utilizando 8 variáveis (área, alongamento, comprimento, elipticidade, largura, perímetro, regularidade e rugosidade). Na matriz estão descritos o valor absoluto do número de (no SPTZ) e a porcentagem (%) de espermatozoides identificados, e a taxa de erro de identificação calculada pela análise discriminante.....38

Tabela 4. Matriz criada pela análise discriminante da identificação dos espermatozoides nos determinados grupos indivíduos (*M. nemorivaga*: N1 e N2; *M. gouazoubira*: G1, G2 e G3). Foram analisados 990 espermatozoides, utilizando 8 variáveis (área, alongamento, comprimento, elipticidade, largura, perímetro, regularidade e rugosidade). Na matriz estão descritos o valor absoluto (no SPTZ) e a porcentagem (%) de espermatozoides identificados, e a taxa de erro de identificação calculada pela análise discriminante.....39

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Proteínas identificadas, por espectrometria de massa ESI-Q Tof, a partir dos spots do gel SDS-PAGE do plasma seminal de *M. gouazoubira*.....59

Tabela 2. Proteínas identificadas, por espectrometria de massa ESI-Q Tof, a partir dos spots do gel SDS-PAGE do plasma seminal de *M. nemorivaga*.....64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Espécime macho de *Mazama gouazoubira* no Pantanal do Mato Grosso do Sul. (Foto: Duarte, J.M.B.)6
- Figura 2. Distribuição geográfica de *Mazama gouazoubira*, em hachurado. (BLACK; VOGLIOTTI, 2008)7
- Figura 3. Espécime fêmea de *Mazama nemorivaga*. (Foto: Duarte, J.M.B.).....9
- Figura 4. Distribuição geográfica de *Mazama nemorivaga*, em hachurado. (Fonte: ROSSI, R. V.; DUARTE, J. M. B. 2008. IUCN red list, 2011)10

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Medidas da cabeça realizadas no programa Axio Vision 4.8.2®. Reta do comprimento (C), reta da largura (L), área (A) e perímetro (P). Com os valores obtidos destas medidas de dimensão, foram calculadas as medidas de forma da cabeça do espermatozoide (elipiticidade, alongamento, rugosidade e regularidade).....32
- Figura 2. Ejaculados coletados por eletroejaculação de *M. gouazoubira* (A) de coloração branco e aspecto cremoso, e de *M. nemorivaga* (B) de coloração avermelhada e aspecto aquoso.35
- Figura 3. Imagens A, B e C: Observação do ejaculado fresco de *Mazama nemorivaga*, sem adição de coloração, em microscópio de luz. Observação de espermatozoides translúcidos (seta) e aglomerados de pigmentos avermelhados (asteriscos). Barra de escala representativa de 50 micrômetros.....35
- Figura 4. Gráfico scatterplot 2x2, dos dados de área (eixo x) e largura (eixo y) dos indivíduos de cada espécie. Indivíduos N1 e N2 da espécie *Mazama nemorivaga* e os indivíduos G1, G2 e G3 da espécie *M. gouazoubira*.....37
- Figura 5. Gráfico criado pela análise discriminante canônica representando a discriminação entre os grupos *M. gouazoubira* (G1, G2 e G3) e *M. nemorivaga* (N1 e N2) a partir dos resultados obtidos das funções lineares discriminantes, Canonical 1 (eixo x) e Canonical 2 (eixo y). As variáveis utilizadas para obtenção das funções foram comprimento, largura, área, perímetro, rugosidade, regularidade, elipticidade e alongamento.....38

Figura 6. Composição do espermatozoide das espécies *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga* representada em porcentagem do tamanho de cada região (cauda – peça principal + peça final, peça intermediária e cabeça) em relação ao tamanho total do espermatozoide.....40

Figura 7. Composição do espermatozoide dos indivíduos N1 e N2 (*Mazama nemorivaga*) e G1, G2 e G3 (*Mazama gouazoubira*) representada em porcentagem do tamanho de cada região (cauda – peça principal + peça final, peça intermediária e cabeça) em relação ao tamanho total do espermatozoide.....41

CAPÍTULO 3

Figura 1. Géis bidimensionais da eletroforese SDS-PAGE do plasma seminal dos animais da espécie *Mazama gouazoubira*. Ponto isoelétrico representado no eixo x (pH) e peso molecular representado no eixo y (KDa). Animal 1 - a/b; Animal 2 - c/d; Animal 3 - e/f.....57

Figura 2. Gel Master do plasma seminal de *Mazama gouazoubira*. Peso molecular representado no eixo y (KDa) e ponto isoelétrico representado no eixo x (pH). Os números representam os spots identificados (Tabela 1).....58

Figura 3. Géis bidimensionais da eletroforese SDS-PAGE do plasma seminal dos animais da espécie *Mazama nemorivaga*. Ponto isoelétrico representado no eixo x (pH) e peso molecular representado no eixo y (KDa). Animal 1 - a/b; Animal 2 - c/d.....62

Figura 4. Gel Master do plasma seminal de *Mazama nemorivaga*. Peso molecular representado no eixo y (KDa) e ponto isoelétrico representado no eixo x (pH). Os números representam os spots identificados (Tabela 2).....63

Figura 5. Gráfico gerado pelo software STRAP da comparação das anotações do Gene Ontology, dos Processos Biológicos, das proteínas presentes no plasma seminal de *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*.66

Figura 6. Gráfico gerado pelo software STRAP da comparação das anotações do Gene Ontology, das Funções Moleculares, das proteínas presentes no plasma seminal de *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*.66

Figura 7. Gráfico gerado pelo software STRAP da comparação das anotações do Gene Ontology, dos Componentes Celulares, das proteínas presentes no plasma seminal de *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*.67

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

Introdução

A Família Cervidae é reconhecida como uma das mais controversas em suas relações intergenéricas e na sistemática de nomenclatura das espécies. Recentes discussões sobre a taxonomia do gênero *Mazama*, conhecido como o mais complexo, tendem a separar *Mazama* vermelho (*M. americana*, *M. bororo* e *M. nana*) de *Mazama* cinza (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*), sendo essas duas últimas espécies diferenciadas em outros dois gêneros (FIGUEIREDO, 2014).

Por muitos anos *M. nemorivaga* foi considerado sinonímia de *M. gouazoubira* e a espécie abrangia todo o território Brasileiro (EISENBERG; REDFORD, 1999). Análises morfológicas de indivíduos do gênero *Mazama* apresentaram diferenças craniométricas indicativas de que as duas espécies eram distintas, e no ano de 2000, Rossi validou morfológicamente a espécie *M. nemorivaga* para os indivíduos presentes no bioma amazônico.

Com essa recente mudança na taxonomia do gênero *Mazama*, muitos trabalhos que apresentam dados biológicos, reprodutivos e comportamentais de *M. nemorivaga*, estão descritos oficialmente para *M. gouazoubira* amazônico, como no caso dos animais presentes no Peru (HURTADO-GONZALES; BUDMER, 2006). Revisar e descrever detalhadamente a biologia de cada uma das espécies torna-se cada vez mais importante, não apenas para incrementar o conhecimento sobre cada uma delas, mas para auxiliar a identificação correta das espécies e corroborar com as discussões em relação à criação de novos gêneros para os *Mazama* cinzas Brasileiros.

Alguns trabalhos demonstraram que existem diferenças significativas na morfometria espermática entre espécies e que esses dados que podem auxiliar na diferenciação entre elas, principalmente o formato da cabeça (BELLETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a). A constituição bioquímica do plasma seminal também pode apresentar diferenças entre espécies, subespécies (PEGGE et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi encontrar diferenças significativas nas características seminais (espermatozoides e plasma seminal) que auxiliem na diferenciação entre as espécies e, se possível, que possam dar embasamento para futuras discussões sobre a criação de dois novos gêneros para *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*.

Revisão de Literatura

Classificação taxonômica dos Mazama cinza Brasileiros

Os cervídeos neotropicais pertencem a Família Cervidae, subfamília Capreolinae e tribo Rangiferini (GROVES, 2007; MERINO; ROSSI, 2010), que compreendem os animais artiodáctilos ruminantes que possuem como principal característica a presença de chifres no macho. No Brasil, estão presentes as espécies *Blastocerus dichotomus* (Illiger, 1815), *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780), *Ozotocerus bezoarticus* (Linnaeus, 1758) *Mazama americana* (Erxleben, 1777), *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814), *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817), *Mazama nana* (Hensel, 1872) e *Mazama bororo* (Durte, 1996).

A história evolutiva dos cervídeos Sul Americanos ocorreu de forma explosiva com o surgimento de uma grande diversidade de espécies em um curto período de tempo (WEBB, 2000). Ainda existem muitas inconsistências sobre as relações intergenéricas na família Cervidae, principalmente em relação ao grupo de cervídeos neotropicais (GILBERT; ROPIQUET; HASSANIN, 2006). No foco dessa discussão está o gênero *Mazama*, sendo o táxon mais controverso (EISENBERG, 2000).

Historicamente as espécies são definidas segundo os critérios tipológicos, baseado no conceito de espécie tipo onde indivíduos são identificados segundo as características encontradas nos exemplares de museus. Os gêneros agregam espécies que compartilham características fenotípicas em comum à espécie tipo do gênero. Com o desenvolvimento de técnicas citogenéticas e moleculares, este conceito passou a ser incongruente, principalmente com a descoberta de espécies crípticas, onde, apesar de apresentarem mesmo fenótipo, as espécies apresentavam grandes diferenças cromossômicas e moleculares. Foi então que o novo conceito biológico de espécies, em que espécies são grupos de populações que são isoladas reprodutivamente de outros grupos, começou a ser aceito (FUTUYMA, 1992).

Segundo Groves e Grobb (1987), o gênero *Mazama*, é composto por indivíduos de porte médio a pequeno, com chifres pontiagudos não ramificados, apresentam cauda curta, glândula tarsal ausente ou rudimentar e

presença de glândulas em longas e profundas fendas interdigitais nos membros posteriores. As revisões taxonômicas já descreveram de quatro (NOWAK, 1991) a oito espécies (DUARTE; MERINO, 1997) presentes no gênero *Mazama*. Atualmente são dez espécies, sendo cinco presentes no território Brasileiro (MERINO; ROSSI, 2010).

Essa incoerência na classificação do número de espécies deve-se a falta de revisões taxonômicas (ROSSI, 2000). Até o ano de 2000, as últimas revisões tinham sido realizadas em 1919 por Miranda-Ribeiro, para as espécies que ocorriam no Brasil, e em 1915 por Allen, para as espécies do gênero *Mazama* (ROSSI, 2000).

Análises citogenética levaram a validação recente de duas espécies no território brasileiro. Em 1996, Duarte descreveu a espécie *Mazama bororo*, até então citada informalmente por Miranda Ribeiro, havendo apenas um exemplar em museu (EISENBERG 2000). A espécie *Mazama nemorivaga*, apesar de ter sido descrita em 1817 por Cuvier, não era uma espécie validada. Análises cariotípicas de indivíduos de *M. gouazoubira* provindos da região norte do Brasil retomaram a discussão sobre a divisão da espécie, uma vez que apresentavam cariótipos diferentes e características morfológicas distintas (DUARTE, 1996; DUARTE; MERINO, 1997; DUARTE; JORGE, 1998). Apenas em 2000, a espécie foi validada por Rossi.

Duarte, Gonzalez e Maldonado (2008), construíram a árvore filogenética dos cervídeos neotropicais a partir do citocromo b e observaram a separação do gênero *Mazama* em dois clados diferente, caracterizando um grupo polifilético. Um clado foi composto por animais que possuem pelagem mais avermelhada, incluindo a espécie tipo do gênero (*M. americana*, *M. bororo* e *M. nana*) e o outro composto por animais de pelagem mais acinzentada (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*). Propuseram então, a separação das espécies *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* do gênero *Mazama*.

Corroborando com esse estudo, uma análise filogenética mais aprofundada das espécies de *Mazama* cinza brasileiros, realizada recentemente utilizando DNA mitocondrial e genes nucleares, apresentou resultados semelhantes e incrementou novas informações em relação às duas espécies. Como resultado, o gênero *Mazama* também se apresentou polifilético com o mesmo padrão de formação dos clados, o que, segundo a autora,

invalida essa nomenclatura taxonomica do gênero para as espécies *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*. Além disso, as duas espécies foram alocadas em clados separados, o que indica a separação dessas espécies em dois gêneros diferentes. Por fim, a espécie *M. gouazoubira* foi subdividida em cinco clados, com os a distribuição geográfica dos indivíduos analisados ocorrendo em simpatia, levantando a hipótese de que *M. gouazoubira* seja um complexo de espécies crípticas. A espécie *M. nemorivaga* foi subdividida em três clados, separados em diferentes regiões de endemismos na Amazônia, necessitando também de novas análises incluindo um número maior de indivíduos de cada região para validar as espécies (FIGUEIREDO, 2014).

Mazama cinzas Brasileiros

Os *Mazama* cinzas apresentam uma grande plasticidade ecológica e talvez por este motivo não tenham se diferenciado em muitas espécies durante o Pleistoceno como ocorreu com o *Mazama* vermelho (GONZALEZ; DUARTE; MALDONADO, 2010). Atualmente, no Brasil, são representados por uma espécie amazônica, *Mazama nemorivaga*, ou veado-roxo, e outra que ocupa o restante do território brasileiro *Mazama gouazoubira*, ou veado-catingueiro (DUARTE; GONZÁLEZ, 2010).

O veado-catingueiro (Mazama gouazoubira)

A espécie *M. gouazoubira* (Figura 1) inicialmente foi descrita como *Cervus gouazoupira* por Fisher (1814), apenas em 1951 que Hershkovitz utilizou o nome *Mazama gouazoubira* pela primeira vez, e em 2001 a nomenclatura foi oficializada pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (BLACK-DÉCIMA et al. 2010)



Figura 1. Espécime macho de *Mazama gouazoubira* no Pantanal do Mato Grosso do Sul. (Foto: Duarte, J.M.B.)

Segundo Rossi (2000), no Brasil não há subespécies de veado-catingueiro e sim variações de padrões de pelagem dentro da espécie, sendo que, os indivíduos de coloração mais clara prevalecem em regiões mais abertas, como o cerrado, e as populações de florestas tendem a ser mais escuras. Em geral, a pelagem no dorso e lateral do pescoço é de cor acinzentada (ou marrom acinzentada) aspergido de laranja, o dorso e lateral do corpo normalmente tem coloração marrom acinzentado, algumas vezes aspergido de laranja; geralmente a região lombar e a parte dorsal da cauda são alaranjadas; a região ventral pode ser castanho amarelado ou alaranjado do queixo ao abdômen; a região inguinal pode ser amarelada, alaranjada ou esbranquiçada e a parte ventral da cauda é branca; a pelagem da cabeça apresenta um tufo de pelos de coloração marrom escura na parte frontal, uma região esbranquiçada e bem definida no canto interno da região dos olhos; possui orelhas grandes e arredondadas, com a coloração esbranquiçada na fase interna e bordas (ROSSI, 2000). O comprimento da cabeça e corpo pode variar de 882 a 1060 mm, a altura do membro anterior de 500 a 600 mm, o peso corporal de 11 a 25 kg, e apresentam orelhas relativamente grandes 95-121 mm (ROSSI, 2000).

Ocorrem das regiões secas pré-Andinas da Argentina e Bolívia, estendendo-se pelo Paraguai até a costa Brasileira, tendo como limite ao norte

as áreas de transição de floresta Amazônica e ao sul toda a região do Uruguai (Figura 2) (BLACK-DÉCIMA et al., 2010).



Figura 2. Distribuição geográfica de *Mazama gouazoubira*, em hachurado. (BLACK; VOGLIOTTI, 2008)

Considerado uma espécie solitária, o *M. gouazoubira* só é visto em pequenos grupos de 3 a 4 indivíduos quando há escassez de alimento (DUARTE; GONZÁLEZ, 2010). Observações em vida livre revelam diferentes épocas de nascimento de filhotes sendo, no cerrado, mais comum observá-los no final das épocas de chuva (LEEUEWENBERG; OLIVEIRA-CABRAL; LARA-RESENDE, 1999). Em especial, no Pantanal, são observados dois períodos com presença de filhotes, um no início das estações de chuva e outro após a época de cheia (PINDER, 1997). No Paraguai os animais também não apresentam sazonalidade havendo filhotes e fêmeas prenhes durante todo o ano (STALLINGS, 1986).

O monitoramento reprodutivo anual de veados-catingueiros em cativeiro no Brasil, não apresentou variações morfológicas (tamanho de testículo e ciclo de chifres), endócrinas (níveis de testosterona e cortisol) e seminais (volume, concentração, motilidade e morfologia espermática) correlacionadas com variações ambientais (temperatura, fotoperíodo e pluviosidade), indicando ausência de sazonalidade reprodutiva (BARROZO et al., 2001). Análises seminais de amostras coletadas por eletroejaculação revelaram um volume de

ejaculado variando de 315 a 605 μL e a concentração variando de $0,86 \times 10^9$ a $2,89 \times 10^9$ espermatozoides/mL (CURSINO et al., 2012). A análise morfológica dos espermatozoides, de ejaculados também coletados por eletroejaculação, apresentou 26,8% de defeitos maiores e 32,4% de defeitos menores, totalizando 59,2% de espermatozoides anormais. Os principais defeitos encontrados foram: contorno anormal de cabeça, gota citoplasmática proximal, cauda fortemente enrolada, cauda dobrada com gota citoplasmática e defeito de peça intermediária (defeitos maiores) e cabeça curta e cauda enrolada (defeitos menores) (PERONI et al., 2012).

O veao-roxo (*Mazama nemorivaga*)

A espécie *M. nemorivaga* (Figura 3) foi descrita pela primeira vez por Cuvier em 1817, a partir de um espécime originário de Cayenne, na Guiana Francesa. A espécie passou a ser restrita das Guianas francesa e britânica (ALLEN, 1915). Miranda-Ribeiro (1914) já havia descrito uma pequena espécie de *Mazama* cinza no estado de Rondônia classificando-a como *M. gouazoubira rondoni*. Porém, em 1998, Duarte propôs considerar *M. rondoni* como uma espécie separada de *M. gouazoubira*, baseando-se nas diferenças morfológicas e cariotípicas encontradas entre estas duas espécies. Foi em 2000, que Rossi considerou *M. rondoni* como sinonímia de *M. nemorivaga* e confirmou a proposta de Duarte (1998) ao analisar morfológicamente espécimes provenientes de sete estados ao norte do Brasil: Espírito Santo, Maranhão, Pará, Amapá, Amazonas, Mato Grosso e Rondônia. Atualmente, *M. nemorivaga* é reconhecida como espécie válida, sendo a espécie de *Mazama* cinza que ocupa a região amazônica (ROSSI; DUARTE, 2008; DUARTE; GONZALEZ; MALDONADO, 2008; ROSSI et al., 2010; MERINO; ROSSI, 2010; DUARTE; GONZALEZ, 2010).



Figura 3. Espécime fêmea de *Mazama nemorivaga*. (Foto: Duarte, J.M.B.)

O veado-roxo pode apresentar medidas um pouco menores que as do veado-catingueiro, com o comprimento de corpo e cabeça de 760 a 1015 mm, a altura do membro anterior de 490 a 505, peso corporal 14 - 15,5 kg e uma orelha pequena medindo de 82 a 93 mm (ROSSI et al, 2010). A região dorsal tem uma pelagem marrom escura podendo apresentar aspergido de amarelo, e a lateral do corpo é marrom podendo apresentar um aspergido de amarelo claro; a região ventral é amarelada ou esbranquiçada do queixo ao abdômen; a parte dorsal da cauda é marrom escuro e a parte ventral é branca; a face do veado-roxo é marrom escura, muitas vezes mesclado com preto e raramente apresenta uma mancha marrom amarelada na região superior do canto interno do olho (ROSSI, 2000). Morfologicamente o veado-roxo pode ser distinguido do veado-catingueiro por possuir uma garupa e região dorsal da cauda de coloração marrom achocolatada, orelhas menores e mais pontudas, olhos e orbitas cavitárias mais largas (ROSSI et al., 2010).

Atualmente o veado-roxo é encontrado no Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Colômbia, Ilha de San José (Panamá), Equador, Peru e Bolívia (Figura 4). No Brasil a espécie encontra-se na região da floresta amazônica e nas áreas de transição de suas bordas (ROSSI et al., 2010).



Figura 4. Distribuição geográfica de *Mazama nemorivaga*, em hachurado. (Fonte: ROSSI, R. V.; DUARTE, J. M. B. 2008. IUCN red list, 2011)

O veado-roxo, por ser uma espécie validada recentemente, possui poucos estudos em relação aos seus aspectos reprodutivos, ou mesmo comportamentais. A maioria dos relatos é descrita para o então veado-catingueiro amazônico. São poucos os relatos de nascimentos em cativeiro sendo estes observados durante todas as épocas do ano (ROSSI et al, 2010). Na Amazônia Peruana foram observados nascimentos ocorrendo nos meses de Janeiro, Março, Abril e de Julho a Outubro (HURTADO-GONZALES, 2000). Na Bolívia e Venezuela, foram observadas fêmeas prenhes nos meses de Janeiro, Abril e Dezembro, com nascimentos ocorrendo em Julho, Agosto e Novembro (BISBAL,1994). No Brasil ainda não existem relatos dos meses de nascimento de filhotes dessa espécie.

Em 2010, Peroni et al. relataram uma surpreendente característica da espécie, a coloração avermelha do plasma seminal de dois exemplares de *M. nemorivaga* mantidos em cativeiro no Brasil. Segundo os autores, a hipótese de presença de sangue foi descartada pela ausência de células sanguíneas, mas ainda sim, não souberam dizer a origem da coloração. O volume do

ejaculado coletado por eletroejaculação pode variar de 405 a 715 μL e a concentração varia de $0,24 \times 10^9$ a $0,25 \times 10^9$ espermatozoides/mL (CURSINO et al., 2012). Na análise morfológica dos espermatozoides de ejaculado coletado por eletroejaculação, foram observados 38% de defeitos maiores e 35% de defeitos menores, totalizando 73% de células anormais. Os principais defeitos encontrados foram cauda enrolada (defeito menor), cauda fortemente enrolada e defeito de peça intermediária (defeitos maiores) (PERONI et al., 2012).

A célula espermática e a diferenciação entre as espécies

Há muitos anos a morfometria espermática, de diversas espécies, vem sendo estudada. Seja para entender a biologia reprodutiva, identificar a fertilidade do macho, ou diferenciar espécies.

Ao reunir dados de morfometria espermática de 284 espécies de mamíferos, Haigh e colaboradores (1984) observaram que existe uma correlação negativa entre a massa corporal e o tamanho do espermatozoide, sendo o de artiodátilas os menores dentre os mamíferos e dos marsupiais estando dentre os maiores. Porém, mais de dez anos depois, essa correlação foi contestada por Gage (1998), onde ao analisar a massa corporal e o tamanho do espermatozoide de 300 espécies de mamíferos, não obteve nenhum tipo de correlação. Assim como não obteve correlações com o número de cromossomos, com o tamanho do genoma, ou com a duração do ciclo estral. Em contra partida foram observadas correlações entre o tamanho do espermatozoide e o trato reprodutivo das fêmeas em outros taxa como aves (BRISKIE; MONTGOMERIE, 1992) e peixes (BALSHINE et al., 2001).

O tamanho do espermatozoide pode estar relacionado com outras características da biologia reprodutiva, como o sistema de acasalamento. Espécies que possuem competitividade espermática apresentam espermatozoides maiores, principalmente em relação ao tamanho da cauda, que proporciona maior propulsão ao espermatozoide (GOMENDIO; ROLDAN, 1991). A competição espermática não apresentou correlação com o tamanho total do espermatozoide (GAGE; FRECKLETON, 2003), porém obteve correlação positiva com o tamanho da peça intermediária (ANDERSON; NYHOLT; DIXSON, 2005). A relação pode ser devido à quantidade de

mitocôndrias presentes na peça intermediária. A força de propulsão aparenta ser mais importante que o formato da cabeça ou tamanho total do espermatozoide na competição espermática (MALO et al., 2005).

Muito ainda tem que ser estudado em relação à morfometria espermática e sistemas de acasalamento, talvez estudos do microambiente do trato reprodutivo feminino também possa revelar uma influencia deste na morfometria espermática (GAGE; FRECKLETON, 2003).

Um trabalho recente com dados de 226 espécies de mamíferos, utilizando um controle filogenético mais robusto em relação aos trabalhos anteriores, mostrou que conforme aumenta a competitividade espermática nas espécies, aumenta o tamanho total do espermatozoide (cabeça, peça intermediária, e peça principal e final) e a cabeça se torna mais alongada (TOURMENTE; GOMENDIO; ROLDAN, 2011). As comparações entre o tamanho do espermatozoide e a velocidade do nado têm apresentado correlações positivas, o que leva a pensar que o tamanho do espermatozoide pode afetar na velocidade de seu nado dando-lhe uma habilidade competitiva, sendo um diferencial da fertilidade do macho (GOMENDIO; ROLDAN, 2008; TOURMENTE; GOMENDIO; ROLDAN, 2011). Essa relação entre velocidade e fertilidade já havia sido citada por Malo et al. (2005) quando observaram que aqueles machos de cervo nobre hispânico que apresentavam melhores parâmetros seminais, mais férteis, apresentavam espermatozoides mais velozes.

A hidrodinâmica e a velocidade do espermatozoide parecem ter papel fundamental não apenas na competição espermática como também na fertilidade. Muitos trabalhos utilizam a morfometria espermática como ferramenta para classificar a fertilidade de machos. Esses trabalhos já foram realizados em diversas espécies domésticas como cavalos (GRAVANCE et al., 1996), bovinos (BELETTI; COSTA; VIANA 2005a), ovinos (MAROTO-MORALES et al., 2010) e suínos (SARAVIA et al., 2007), e espécies selvagens como primatas não humanos (VALLE et al. 2013) e cervídeos (ESTESO et al. 2009).

O formato da cabeça e a localização da inserção da cauda do espermatozoide são características específicas de cada espécie e podem auxiliar estudos de filogenia (GAGE, 1998; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005b).

Alguns grupos de animais, dentre eles os mamíferos, podem ser classificados, taxonomicamente, através de uma simples análise morfométrica do espermatozoide, isso porque esta célula possui características espécie-específicas (PITNICK; HOSKEN; BIRKHEAD, 1998). Utilizando os dados de dimensão e formato da cabeça, e outros parâmetros funcionais da morfometria espermática, como coeficiente de hidrodinâmica e simetria, Beletti e Costa (2003) conseguiram diferenciar as populações de espermatozoide entre espécies de um mesmo gênero.

Caracterização do plasma seminal e proteômica

O plasma seminal é uma secreção complexa produzida pelos testículos, epidídimo e glândulas acessórias do trato reprodutor masculino, composta por açúcares, proteínas, lipídios, íons inorgânicos, enzimas, sais orgânicos e hormônios (MANN; LUTWAK-MANN, 1951; SAIRAM; RANGANATHAN; LAMOTHE, 1980; PESCH; BERGMANN; BOSTED, 2006). Esta secreção atua na maturação, manutenção e no transporte do espermatozoide até o oócito, interagindo não apenas com a membrana espermática, mas com todo o ambiente do trato reprodutor feminino, sendo estas interações o principal papel das proteínas do plasma seminal (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). As principais proteínas relacionadas à fertilidade de bovinos, principal espécie estudada em relação à proteômica seminal, são as BSPs, espermadesinas, osteopontinas e as fosfolipases (MOURA et al., 2006).

Uma das primeiras proteínas, identificadas, relacionadas à fertilidade foi a FPM (*Forward Motility Protein*), de baixo peso molecular (37KDa) que atua na indução da motilidade progressiva do espermatozoide (ACOTT; HOSKINS, 1981). Em 1983, Esch et al., purificou as principais proteínas (15-16KDa) presentes no plasma seminal de bovinos, BSP I e PDC-109 (BSP II e BSP III). Mais tarde em 1987, Manjunath e Sairam, Também utilizando plasma seminal de bovinos, purificaram e caracterizaram três proteínas ácidas, BSP-A1, BSP-A2 e BSP-A3 e revelaram serem idênticas as BSPs descritas por Esch e colaboradores. Também revelaram que as BSPs A1 e A2 possuem a mesma característica das proteínas descritas como PDC-109, sendo então a BSP-A3 correspondente a BSP I descrita anteriormente.

No mesmo ano, Manjunath, Sairam e Uma (1987), descreveram uma quarta proteína, a BSP-30-KDa. As BSPs foram caracterizadas como proteínas ligadoras de heparina (HBP) e moduladoras da capacitação espermática (CHANDONNET et al., 1990; MILLER; WINER; AX, 1990). Resumidamente, as HBPs se ligam a membrana do espermatozoide quando este entra em contato com o plasmam seminal durante a ejaculação (McCAULEY; BELLIN; AX, 1996). No trato reprodutor feminino essas proteínas presentes na membrana do espermatozoide se ligam à HDL (lipoproteínas de alta densidade) e às GAGs (glicosaminoglicanos), causando desestabilização da membrana espermática e iniciando a capacitação (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002). Essas proteínas representam de 40% a 57% do total de proteínas do plasma seminal de bovinos, sendo a PDC-109 a mais abundante (25-47%) (NAUC; MANJUNATH, 2000). Proteínas homólogas as BSPs ou HBPs de bovinos já foram descritas em outras espécies como equinos (CALVETE et al., 1995), suínos (CALVETE et al., 1997), caprinos (VILLEMURE; LAZURE; MANJUNATH, 2003), ovinos (JOBIM et al., 2005), ruminantes não domésticos – bisão (BOISVERT et al., 2004), búfalo (HARSHAN et al., 2009) e camelídeos (KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012).

Outras proteínas que também atuam na capacitação espermática são as espermadesinas. Estas são as principais proteínas presentes no plasma seminal de suínos (AQN, AWN, PSP) representando 90% das proteínas totais, mas também estão presentes no plasma seminal de outras espécies como equinos, bovinos e ovinos (revisado por CABALLERO et al., 2012) e espécies selvagens como cateto (SANTOS et al., 2014). São glicoproteínas de baixo peso molecular que atuam na manutenção da viabilidade espermática regulando a atividade mitocondrial e peroxidação lipídica, e em diferentes momentos durante a fertilização (TÖPFER-PETERSEN et al., 1998; JUYENA; STELLETTA, 2012). Algumas possuem domínios para ligação de heparina (AQN-1, AQN-3, AWN) e outras não (PSP-I and PSP-II) (CABALLERO et al., 2012). As espermadesinas AQN-3 e AWN se ligam ao espermatozoide no momento da ejaculação estabilizando a membrana e impedindo a reação acrossômica precoce. A AQN-1 irá atuar na fêmea ligando o espermatozoide ao epitélio do oviduto. Ao interagirem com glicosaminoglicanos presentes no fluido do oviduto, essas espermadesinas irão se soltar da membrana

espermática, liberando o espermatozoide do epitélio. No mesmo momento, ocorre a capacitação espermática e reação acrossômica. Algumas proteínas, AQN e AWN, restantes na membrana espermática irão atuar na ligação oócito-espermatozoide no momento da fertilização (TÖPFER-PETERSEN et al., 1998; CABALLERO et al., 2012). As PSP-I e PSP-II parecem atuar como imunossupresor, protegendo o espermatozoide de reações imunes no trato reprodutor feminino (MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA; KORDAN, 2011; CABALLERO et al., 2012). As SPADH 1 e 2 são encontradas no plasma seminal bovino, e foram descritas como proteínas ácidas do fluido seminal (aSFP - *acidic seminal fluid protein*) por Einspanier e colaboradores, no ano de 1991. A SPADH-1 possui uma ligação mais fraca com o espermatozoide e atuam principalmente durante o armazenamento da célula no trato reprodutor masculino (SCHÖNECK; BRAUN; EINSPANIER, 1996). A SPADH-2 é outra aSFP conhecida como Z13 (TEDESCHI et al., 2000).

Existem proteínas com múltiplas funções, que atuam tanto no desenvolvimento do espermatozoide, quanto na interação espermatozoide-oócito. Um exemplo é a osteopontina, esta proteína foi identificada no plasma seminal de bovinos em 1997 por Cancel, Chapman e Killian. A expressão da osteopontina foi identificada nos túbulos seminíferos com espermátides alongadas (CANCEL; CHAPMAN; KILLIAN, 1999; RODRÍGUEZ; DAY; KILLIAN, 2000). Por serem expressas apenas em algumas etapas do desenvolvimento do gameta é possível que sejam reguladas por fatores que controlam a espermatogênese e provavelmente possuem função de ligação entre a célula espermática, a célula de Sertoli e dos componentes da matriz extracelular (MOURA, 2005). As osteopontinas presentes no plasma seminal são secretadas pela ampola e vesícula seminal (CANCEL; CHAPMAN; KILLIAN, 1999). Sua principal função no processo de fertilização é sua capacidade de ligação celular através do domínio de ligação que interage com as integrinas e receptores CD44 presentes na membrana celular (RODRÍGUEZ; DAY; KILLIAN, 2000; MOURA 2005). As osteopontinas também estão presentes na tuba uterina e podem se ligar formando complexos de osteopontinas e integrinas. Tanto a membrana plasmática do espermatozoide como do oócito possuem integrinas e receptores CD44 e ao interagirem com as osteopontinas

formam complexos de ligação oócito-espermatozoide auxiliando na fertilização (MOURA, 2005).

As fosfolipases são enzimas relacionadas à secreção da vesícula seminal e glândula bulbouretral, também atuam na fertilização. Estas enzimas estão presentes livres no plasma seminal e ligadas á membrana espermática, região do acrossoma, região pos-acrossomal e peça intermediária (RÖNKKÖ, 1992). Acredita-se que atuem na reação acrossomica e na fusão espermatozoide-oócito (JUYENA; STELLETTA, 2012). Para não ocorrer hidrólise dos fosfolípidos da membrana e capacitação prematura do acrossoma, as BSPs inibem a ação das fosfolipases até que os espermatozoides cheguem ao trato reprodutor feminino (SOUBEYRAND; MANJUNATH, 1997). Outras proteínas já foram identificadas como biomarcadores de fertilidade ou infertilidade como clusterinas (O'BRYAN et al., 1990), proteínas do choque térmico (BARRIOS et al., 2000), ubiquitinas (THOMPSON; RAMALHO-SANTOS; SUTOVSKY, 2003), enzimas antioxidantes (MUINÑO-BLANCO; PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ, 2008) e muitas outras.

A proteômica é a identificação e caracterização de proteínas constituintes de uma matriz biológica, produzidas em um determinado momento sob determinadas condições (WASINGER et al., 1995). Visa estudar as proteínas totais expressas em qualquer sistema, quer pela abundância, atividade, estrutura, estado de pós-tradução ou outra modificação, ou como essas proteínas interagem umas com as outras em redes ou complexos (WRIGHT et al., 2012). A descrição e função de algumas das proteínas presentes no plasma seminal já estão bem estabelecidas para bovinos (revisado por MOURA et al., 2007) e proteínas homologas já foram descritas para outras espécies domésticas como equinos (CALVETE et al. 1995), caprinos (VILLEMURE; LAZURE; MANJUNATH, 2003), ovinos (BERGERON et al. 2005) e suínos (GONZÁLEZ-CADAVID et al. 2014). Poucos estudos foram realizados para descrição do plasma seminal de ruminantes não domésticos. Algumas delas são referentes a animais que visam a produção zootécnica como bisão (BOISVERT et al., 2004), búfalo (HARSHAN et al. 2009) e camelos (KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012).

Atualmente a proteômica é uma ferramenta muito utilizada para identificação de marcadores de fertilidade/infertilidade ou para diagnóstico de algumas doenças das glândulas acessórias do trato reprodutor masculino (MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA; KORDAN, 2011). Podem também indicar diferenças na expressão de proteínas entre grupos de animais, estações reprodutivas, espécies, raças, ou mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (MOURA et al., 2006; MAROTO-MORALES et al., 2010; GAVIRAGHI et al., 2010). Ao comparar as características seminais de duas subespécies de Búfalos, Pegge et al. (2011) puderam observar presenças de diferentes *spots* nos mapas proteicos das duas subespécies e, principalmente, diferenças na expressão de certas proteínas.

As técnicas utilizadas para proteômica foram fortemente impulsionadas com as melhorias na espectrometria de massa e nas plataformas de análise e de informática que as suportam (WRIGHT et al., 2012). A presença de determinadas proteínas do plasma seminal tem sido relacionada com a qualidade de criopreservação de espermatozoides de espécies domésticas (CABALLERO et al., 2012; CHACUR, 2012). Mesmo sem o respaldo dos bancos de dados próprios para as espécies selvagens, é possível comparar os resultados obtidos como banco de dados de espécies domésticas, identificando biomarcadores e auxiliando no desenvolvimento de novos meios de criopreservação de gametas de espécies ameaçadas (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2006; LI et al., 2011; PEGGE et al., 2011; DRUART et al., 2013).

Referências

ACOTT, T. S.; HOSKINS, D. D. Bovine sperm forward motility protein: binding to epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 24, p. 234-240, 1981.

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

ANDERSON M. J., NYHOLT, J.; DIXSON, A. F. Sperm competition and the evolution of sperm midpiece volume in mammals. **Journal of Zoology**, London, v. 267, p. 135–142, 2005.

BALSHINE, S.; LEACH, B. J., NEAT, F.; WERNER, N. Y.; MONTGOMERIE, R. Sperm size of African cichlids in relation to sperm competition. **Behavioral Ecology**, Reino Unido, v. 12, p. 726–731, 2001.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUINÓ-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 63, p. 1531–1537, 2000.

BARROZO, L. A.; TONIOLO, G. H.; DUARTE, J. M. B.; PINHO, M. P.; OLIVEIRA, J. A. Padrão anual de variação da testosterona sérica, volume testicular e aspectos seminais de veados-catigueiros (*Mazama gouazoubira*) em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 210-211. 2001.

BELETTI, M. E.; COSTA L. F. A systematic approach to multispecies sperm morphometric characterization. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, Saint Louis, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã, v. 85, p. 105-116, 2005a.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A spectral framework for sperm shape characterization. **Computers in Biology and Medicine**, Amsterdã, v. 35, p. 463–473, 2005b.

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 71, n. 4, p. 461-70, 2005.

BISBAL, F. J. Biología poblacional del venado matacán (*Mazama ssp.*) (Artiodactyla: Cervidae) en Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, San Pedro, v. 42, n. 1/2, p. 305-313, 1994.

BLACK, P.; VOGLIOTTI, A. *Mazama gouazoubira* (2008). In: IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2011.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 07 julho 2011.

BLACK-DÉCIMA, P.; ROSSI, R. V.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; JULIÁ, J. P. Brown Brocket Deer *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLES, S. (Ed.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, FUNEP, Jaboticabal, 2010, p. 190-201.

BOISVERT, M.; BERGERON, A.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and Characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 70, p. 656–661, 2004.

BRISKIE, J. V.; MONTGOMERIE R. Sperm size and sperm competition in birds. **Proceedings Royal Society London B - Biological Science**, Londres, v. 247, p. 89-95, 1992.

CABALLERO, I.; PARRILLA, I.; ALMINÁNA, C.; DEL OLMO, D.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E. A.; VÁZQUEZ, J. M. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, Malden, v. 47, suppl. 3, p. 12–21, 2012.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHÄFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAIDA, M.; TÖPFER- PETERSEN E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemical Journal**, Londres, v. 310, p. 615-622, 1995.

CALVETE, J. J.; RAIDA, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pBl. **FEBS Letters**, Amsterdã, v. 407, p. 201-206, 1997.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 57, p. 1293-1301, 1997.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. osteopontin localization in the holstein bull reproductive tract. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 60, p. 454–460, 1999.

CHACUR, M. G. M. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in zebu bulls (*Bos taurus indicus*). In: KIUMARS G. (Ed.), **Electrophoresis**, 2012. DOI: 10.5772/45758.

CHANDONNET, L.; ROBERTS, K.D.; CHAPDELAIN, A.; MANJUNATH P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 26, p. 313-318, 1990.

CURSINO, M. S.; PERONI, E. F. C.; ROLA, L. D.; CHRISTOFOLETTI, M. D.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Análise comparativa preliminar do ejaculado de veados – cinza brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*). In: XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de

Animais Selvagens, Florianópolis, Santa Catarina, 2012. **Anais XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens 2012**, p. 102-105.

CUVIER, G. L. C. F. D. Dictionnaire des sciences naturelles. Zoologie. **Mammifères**. Paris, F.G. Levrault, v. 7, p. 1-534,1817.

DRUART, X.; RICKARD, J. P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P. L.; KERSHAW-YOUNG, C. M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; CROSSETT, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C. G.; GRAAF S. P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of Proteomics**, Leuven, v. 91, p. 13–22, 2013.

DUARTE, J. M. B. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. 45f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

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

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLES, S. **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, Jaboticabal, FUNEP, p. 394. 2010.

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

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Análise citotaxonômica dos *Mazama* cinza do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama rondoni*). In: DUARTE, J. M. B. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. Não paginado. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

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

EINSPANIER, E.; EINSPANIER, A.; WEMPE, F.; SCHEIT, K. H. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, Amsterdã, v. 179, n. 2, p. 1006-1010, 1991.

EISENBERG, J. F. The contemporary cervidae of central and south america. In: VRBA, E.S.; SCHALLER G.B. (Ed.). **Antelopes, deer and relatives**. Yale University Press, London, 2000. p. 189 – 202.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics. The Central Neotropics**. Chicago, University of Chicago Press,1999. p. 345.

ESCH, F. S.; LING, N. C.; BTLHLEN, P.; YING, S. Y.; GUILLEMIN, R. Primary structure of pdc-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdã, v. 113, n. 3, p. 861-867, 1983.

ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; MONTORO, V.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARDE, J. J. Identification of sperm-head morphometric subpopulations in iberian red deer epididymal sperm samples. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, Malden, v. 44, p. 206–211, 2009. [doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.01029.x].

FIGUEIREDO, M. G. **Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*)**. 2014. 68 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

FUTUYMA, D. J. (Ed.). Variação – Capítulo 4. In: **Biologia Evolutiva**. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto, 1992. p. 86-125.

GAGE, M. J. G. Mammalian sperm morphometry. **Proceedings Royal Society London B - Biological Science**, Londres, v. 265, n. 1391, p. 97-103, 1998.

GAGE, M. J. G.; FRECKLETON, R. P. Relative testis size and sperm morphometry across mammals: no evidence for an association between sperm competition and sperm length. **Proceedings Royal Society London B - Biological Science**, Londres, v. 270, p. 625-632, 2003.

GAVIRAGHI, A.; DERIU, F.; SOGGIU, A.; GALLI, A.; BONACINA, C.; BONIZZI, L.; RONCADA, P. Proteomics to investigate fertility in bulls. **Veterinary Research Communications**, Edelberga, v. 34, suppl. 1, p. S33–S36, 2010.

GILBERT, C.; ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdã, v. 40, p. 101–117, 2006.

GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 52, p. 439-447, 2008.

GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Sperm Competition Influences Sperm Size in Mammals. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 243, n. 1308, p. 181-185, 1991.

GONZALEZ, S.; DUARTE, J. M. B.; MALDONADO, J. E. Molecular phylogenetics and evolution. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLES, S. (Ed.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, FUNEP, Jaboticabal, 2010, p. 12-17.

GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J. A. M.; MORENO, F. B.; ANDRADE, T. S.; SANTOS, A. C. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA R. A.;

MOURA, A. A. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. **Theriogenology**, Nova lorque, v. 82, p. 697–707, 2014.

GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M.; DAVIS, R. O., HUGHES, J. P., CASEY, P. J. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Tehran, v. 108, p. 41-46, 1996.

GROVES, C. P. Family Cervidae. In: PROTHERO, D. R.; FOSS, S. E. (Ed.). **The Evolution of Artiodactyls**. The Johns Hopkins University Press, Blatimore, Maryland, 2007. p. 249 – 256.

GROVES, C. P.; GRUBB, P. Relationships of living deer. In: WEMMER, C. M. (Ed.). **Biology and management of the cervidae**. Smithsonian Institution Press, London, 1987. p. 21-59.

HAIGH, J. C.; CATES, W. F.; GLOVER, G.J.; RAWLINGS, N. C. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapiti (*Cervus elaphus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Tehran, v. 70, p. 413-418, 1984.

HARSHAN, H. M.; SANKAR, S.; SINGH L. P.; SINGH M. K.; SUDHARANI, S.; ANSARI, M. R.; SINGH S. K.; MAJUMDAR A. C.; JOSHI, P. Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã, v. 115, p. 306–311, 2009.

HURTADO-GONZALES, J. L.; BUDMER, R. E. Reproductive biology of female Amazonian brocket deer in northeastern Peru. **European Journal of Wildlife Research**, Berlin, v. 52, p. 171-177, 2006.

HURTADO-GONZALES, J. L.; **Sustainability of brocket deer use in the northeastern Peruvian Amazon**. 2000. Tese (Doutorado). M.Sc. Thesis. University of Florida, Gainesville, USA. 2000.

IUCN 2013. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded em 09 Dezembro de 2013.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; WALD, V. B.; HORN, A. P.; MATTOS, R. C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, Nova lorque, v. 63, p. 2053–2062, 2005.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 33, n. 4, p. 536–551, 2012.

KERSHAW-YOUNG, C. M.; MAXWELL, W. M. C. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 47, suppl. 4, p. 369–375, 2012.

LEEUWENBERG, F.; OLIVEIRA-CABRAL, I.; LARA-RESENDE, S. Gray Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*) in the Brazilian savana. **Deer Specialist Group News**, Cambridge, v.15, p.14, 1999.

LI, P.; RODINA, M.; HULAK, M.; LI, Z-H.; LINHART, O. Spermatozoa concentration, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) and russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 46, p. 247–252, 2011.

MALO, A. F.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J.; GARCÍA, A. J.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 72, p. 822–829, 2005.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochemical Journal**, Londres, v. 241, p. 685-692, 1987.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reports**, Nova lorque, v. 7, n. 3, p. 231-238, 1987.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, Lebanon, v. 53, p. 109–119, 2002.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Secretory Function of Male Accessory Organs of Reproduction in Mammals. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 31, n. 1, p. 27-55, 1951.

MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; SOLER, A. J.; ESTESO, M. C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; GARDE, J.J. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. **Theriogenology**, Nova lorque, v. 73, p. 437-448, 2010.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ANEL, L.; GUERRA, C.; ÁLVAREZ, M.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J.; CHAMORRO, C.; PAZ, P. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, Nova lorque, v. 66, p. 1847–1856, 2006.

MCCAULEY, T. C.; BELLIN, M. E.; AX, R. L. Localization of a heparin-binding protein to distinct regions of bovine sperm. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 429-438, 1996.

MERINO, M. L.; ROSSI, R. V. Origin, systematics, and morphology radiation. In: DUARTE, J. M. B. & GONZÁLES, S. (Ed.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, FUNEP, Jaboticabal, 2010. p. 2-11.

MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 42, p. 899-915, 1990.

MIRANDA-RIBEIRO, A. **História Natural. Zoologia. Mamíferos.** Anexo nº5. Comissão de Linhas Telegráficas Estratégicas de Mato Grosso ao Amazonas, Rio de Janeiro. 1914.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; KORDAN, W. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn, v. 14, n. 3, p. 489-499, 2011.

MOURA, A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2005.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A Comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã, v. 98, p. 169–188, 2007.

MUINÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 43, suppl. 4, p. 18–31, 2008.

NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 63, p. 1058–1066, 2000.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world.** 5^a ed, v. 2, The Johns Hopkins University Press, London, 1991. p. 1391.

O'BRYAN, M. K.; BAKER, H. W. G.; SAUNDERS, J. R.; KIRSZBAUM, L.; WALKER, I. D.; HUDSON, P.; LIU, D. Y.; GLEW, M. D.; d'APICE, A. J. F.; MURPHY, B. F. Human seminal clusterin (SP-40,40) isolation and characterization. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 85, p. 1477-1486, 1990.

PEGGE, R. B. G.; KRISHNAKUMAR, S.; WHITESIDE, D.; ELKIN, B.; PARLEVLIT, J. M.; THUNDATHIL, J. C. Sperm characteristics in plains (*Bison bison bison*) versus wood (*Bison bison athabasca*) bison. **Theriogenology**, Nova Iorque, v. 75, p. 1360-1370, 2011.

PERONI, E. F. C.; SALVIANO, M. B.; CURSINO, M. S.; CHRISTOFOLETTI, M. D.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. The surprisingly characteristics of the Amazonian Brown Brocket deer (*Mazama nemorivaga*) semen: the red semen. In: 7th International Deer Biology Congress, 2010, Huilo Huilo. **Advances and Challenges in Deer Biology**, 2010. p. 78-79.

PERONI, E. F. C.; ZANETTI, E. S.; ROLA, L. D.; CURSINO, M. S.; DUARTE, J. M. B. Morfologia Espermática dos veados-cinza brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*) mantidos em cativeiro: resultados preliminares. In: XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, Florianópolis, 2012. **Anais XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens 2012**, p. 130-133.

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTED H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, Nova Iorque, v. 66, p. 307–313, 2006.

PINDER, L. **Niche overlap among brown brocket deer, pampas deer and cattle in the Pantanal of Brazil**. 1997. Tese (Doutorado). Ph.D. dissertation. University of Florida, Gainesville, United States of America. 1997.

PITNICK, S.; HOSKEN, D. J.; BIRKHEAD, T. R. Sperm morphological diversity. In: BIRKHEAD, T.; HOSKEN, D.; PITNICK, S. (Ed.). **Sperm Biology: an evolutionary perspective**, 1st edition, Academic Press, Elsevier Ltd., Oxford, 1998.

RODRÍGUEZ, C. M.; DAY, J. R.; KILLIAN, G. J. Osteopontin gene expression in the holstein bull reproductive tract. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 21, n. 3, p. 414–420, 2000.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**, Lebanon, v. 66, suppl. 1, p. 11–22, 2011.

RÖNKKÖ, S. Immunohistochemical localization of phospholipase a, in the bovine seminal vesicle and on the surface of the ejaculated spermatozoa. **International Journal of Biochemistry**, Amsterdã, v. 24, n. 6, p. 869-876, 1992.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de *Mazama Rafinesque*, 1917 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. 2000. 189 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROSSI, R. V.; BODMER R.; DUARTE J. M. B.; TROVATI, R. G. Amazonian brown brocket deer *Mazama nemorivaga* (Cuvier 1817). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEA, S. (Ed.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, FUNEP, Jaboticabal, 2010, p. 202-210.

ROSSI, R. V.; DUARTE, J. M. B. *Mazama nemorivaga*. 2008, in: IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 July 2011.

SAIRAM, M. R.; RANGANATHAN, M. R.; LAMOTHE, P. Presence of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in bull seminal plasma. **Journal of**

Endocrinology, Bristol, v. 84, p. 17-23, 1980.

SANTOS, E. A. A.; SOUZA, P. C.; MARTINS J. A. M.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MORENO, F. B. M. B.; OLIVEIRA, M. F.; MOURA, A. A.; SILVA, A. R. Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Reproduction**, Londres, v. 147, n. 6, p. 753-764, 2014.

SARAVIA, F.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J. M.; SOLER, C.; MURIEL, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; PEÑA, F. J. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. **Theriogenology**, Nova lorque, v. 68, p. 196–203, 2007.

SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal plasma protein a SFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, Nova lorque, v. 45, p. 633-642, 1996.

SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Novel seminal phospholipase A2 is inhibited by the major proteins of bovine seminal plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v. 1341, p. 183–188, 1997.

STALLINGS, J. R. Notes of reproductive biology of the gray brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in Paraguay. **Journal of Mammalogy**, Davis, v. 67, p. 172-175, 1986.

TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**, Hoboken, v. 267, p. 6175-6179, 2000.

THOMPSON, W. E.; RAMALHO-SANTOS, J.; SUTOVSKY, P. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 69, p. 254–260, 2003.

TÖPFER-PETERSEN, E.; ROMCRO, A.; VARCLA, P. F.; EKHLASI-HUNDRIESCR, M.; DOSTÀLOVÀ, Z.; SANZ, L.; CALVCTC, J. J. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, Hoboken, v. 30, n. 4-5, p. 217-224, 1998.

TOURMENTE, M.; GOMENDIO, M., ROLDAN, E. R. S. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. **BMC Evolutionary Biology** [periódico eletrônico] v. 11, p. 1-12. 2011. Acesso em junho de 2012. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/12>

VALLE, R. R.; CARVALHO, F. M.; MUNIZ, J. A. P. C.; LEAL, C. L. V.; GARCÍA-HERREROS, M. Differential distribution of sperm subpopulations and incidence of pleiomorphisms in ejaculates of captive howling monkeys (*Alouatta caraya*) **Naturwissenschaften**, Southampton, 2013. [doi 10.1007/s00114-013-1092-8].

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, Londres, v. 1, p. 1-39, 2003.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. **Electrophoresis**, Nova Jersey, v. 16, n. 1, p. 1090–1094, 1995.

WEBB, S. D. Evolutionary history of new world deer. In: VRBA, E. S.; SHALLE, G. B. (Ed.). **Antelopes, Deer, and Relatives**. Yale University Press, London, 2000. p. 38–64.

WRIGHT, P.C.; NOIREL, J.; OW, S.-Y.; FAZELI, A. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, Nova Iorque, v. 77, p. 738–765, 2012.

CAPITULO 2 – Uso da morfometria espermática como ferramenta para distinção de duas espécies de *Mazama* cinzas Brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*)

Resumo

A taxonomia do gênero *Mazama* vem sendo muito discutida nos últimos anos. Há indícios genéticos que as duas espécies de *Mazama* cinzas brasileiros, veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) e veado-roxo (*Mazama nemorivaga*), pertençam a gêneros distintos. Utilizando dados de morfometria espermática e análises multivariadas discriminantes, encontramos resultados importantes para auxiliar os estudos filogenéticos, fundamentais para discutir esse problema. Ao analisar as características do ejaculado (volume, cor e concentração espermáticas) e da célula espermática (morfometria da cabeça e flagelo), este trabalho encontrou diferenças importantes que separaram os indivíduos de *M. nemorivaga* e os indivíduos de *M. gouazoubira* em grupos distintos. As características que mais diferenciam as espécies foram a coloração do ejaculado e as dimensões da cabeça, destacando-se a área e a largura como principais variáveis para distingui-las. Foram também encontradas diferenças nas proporções das regiões que compõem o espermatozoide (cabeça, peça intermediária e cauda). A análise multivariada dos dados de dimensão e formato da cabeça dos espermatozoides de *Mazama* cinzas discriminou com acurácia os dois grupos das espécies. Os resultados obtidos neste trabalho podem auxiliar nas discussões sobre a taxonomia do gênero *Mazama* como mais um fator que implica na criação de dois novos gêneros, um para *Mazama gouazoubira* e outro para *Mazama nemorivaga*.

Palavras-chave: espermatozoide, veado-catingueiro, veado-roxo e taxonomia.

Introdução

O gênero *Mazama* é representado por cervídeos de porte médio a pequeno. Os machos apresentam chifres curtos, não ramificados e pontiagudos (EISENBERG; REDFORD, 1999). Existem 10 espécies de *Mazama*, sendo quatro consideradas cinzas (MERINO; ROSSI, 2010). No Brasil os *Mazama* cinzas são representados por duas espécies, a amazônica, *Mazama nemorivaga* (veado-roxo), e outra que ocupa o restante do território brasileiro *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro) (DUARTE; GONZÁLES, 2010). Atualmente há uma grande discussão quanto à taxonomia dessas duas espécies. Análises filogenéticas, utilizando DNA mitocondrial e nuclear, apresentaram polifilia para o gênero *Mazama*, separando *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* em clados diferentes ao clado que agrupou as outras espécies do gênero (FIGUEIREDO, 2014; DUARTE; GONZÁLES; MALDONADO, 2008). Esses resultados apontaram a necessidade de se discutir a criação de dois novos gêneros para os *Mazama* cinzas (FIGUEIREDO, 2014).

Tradicionalmente, análises espermáticas, como a morfometria, são utilizadas para análises da fertilidade de machos (HAIGH et al. 1984), porém, podem ser utilizadas como ferramenta para discussões taxonômicas (GAGE, 1998). Alguns grupos de animais, dentre eles os mamíferos, podem ser identificados em seu táxon através de uma simples análise morfométrica do espermatozoide, isso porque esta célula possui características espécie-específicas (BELETTI; COSTA; VIANA, 2005b). A partir de dados de dimensão (comprimento, largura, área e perímetro) e formato (alongamento, elipticidade, regularidade e rugosidade) da cabeça é possível obter diferentes informações como, identificar subpopulações de espermatozoide relacionando-as com a fertilidade de machos (GRAVANCE et al., 1996; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a; MAROTO-MORALES et al. 2010; SARAVIA et al., 2007; VALLE et al. 2013; ESTESO et al., 2009), ou mesmo utilizar para identificar espécies e subespécies (BELETTI; COSTA, 2003; BELLETTI; COSTA; VIANA, 2005a). Existe uma variação no tamanho do espermatozoide entre os machos de uma espécie, porém tal variação é reduzida quando comparadas a variação do tamanho entre duas espécies diferentes. Belletti, Costa e Vianna (2005a) utilizaram dados da morfometria da cabeça de espermatozoides, de *Bos taurus*

taurus e *Bos taurus indicus* e demonstraram, através de análises discriminantes, que estas variáveis possibilita a separação das duas subespécies em dois grupos distintos.

Um estudo detalhado comparando as características seminais e morfometria espermática duas espécies de *Mazama* cinzas poderiam auxiliar nas discussões atuais sobre a taxonomia dos *Mazama*. Este estudo teve o intuito apresentar as principais diferenças das características do ejaculado e morfometria espermática das duas espécies de *Mazama* cinza e assim auxiliar, com mais esta ferramenta, as atuais discussões sobre a taxonômica do veado-catingueiro e veado-roxo.

Metodologia

Animais

Foram utilizados cinco machos, três veados-catingueiro (G1, G2 e G3) e dois veados-roxo (N1 e N2). Todos os animais foram mantidos em baias de alvenaria de aproximadamente 12 m², no galpão de manejo de *Mazama* cinza do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE - 21° 14' 45,3" sul e 48° 16' 45,9" oeste). Para todos os animais foi fornecida a mesma dieta composta de ração industrializada para equinos de alta palatabilidade (Purina®; Omolene tradicional), perfazendo até 500 g/animal/dia, e forragem tipo soja (*Glycine max*), soja-perene (*Neonotonia wightii*), rami (*Boehmeria nivea*) e amora (*Morus Alba*), perfazendo até 1 kg/animal/dia. A oferta de água foi "ad libitum", e os indivíduos foram expostos a flutuações naturais de luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar.

Este estudo foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta unidade de Ensino (processo nº 014080/12) que certificou sua conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Colheita de sêmen

Foram realizadas seis colheitas de sêmen por eletroejaculação, sendo duas colheitas por animal, em diferentes momentos, durante o período de um

ano. Para os animais que apresentavam descanso reprodutivo maior que um mês foi realizado uma colheita prévia, 7 dias antes, que foi descartada do experimento. Os animais foram anestesiados com associação dos anestésicos cloridrato de xilazina (1mg/kg) e cloridrato de quetamina (10mg/kg), por via intramuscular, para o procedimento de eletroejaculação. Antes da introdução do eletrodo o reto foi esvaziado para que houvesse mínima interferência de presença de fezes. Foi utilizado um eletroejaculador (P-T Eletronics[®]; Boring, OR; USA) acoplado a uma probe (2,0 cm de diâmetro, 28,0 cm de comprimento; com três eletrodos longitudinais em sua superfície e distância entre os mesmo de 1,5 cm). Após sedação e introdução dos eletrodos direcionados ventralmente no reto, o animal recebeu eletrochoques crescentes de 250 mA a 750 mA com duração média de três segundos, e entre cada choque houve um intervalo de três segundos (perfazendo um total de dez estímulos por sequência). Foram realizadas três sequências de estimulação, com intervalos de um a dois minutos, durante a colheita (DUARTE; GARCIA, 1995). O sêmen foi colhido em microtubos de 2 mL e mantido em banho-maria à temperatura de 36 a 37°C até início dos procedimentos seguintes. Para avaliação do volume foi utilizada micropipeta automática. A cor do ejaculado foi classificada segundo a observação de uma única pessoa para que não houvesse diferenças na nomeação das cores e na densidade (aquoso, leitoso, cremoso). Uma alíquota de 10 µL de sêmen foi fixada em 2 mL de formol salina para determinação da concentração pela contagem de espermatozoides em câmara hemocitométrica de Neubauer, obtendo-se a concentração por mililitro de ejaculado (sptz x 10⁹/mL) e em seguida a concentração de espermatozoides no ejaculado.

Morfometria espermática

Foram realizados esfregaços com 5 µL de sêmen fresco. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e fixadas em solução de 3% glutaraldeído e 4% paraformaldeído em tampão fosfato 0,06 M, por 24 horas. Após a fixação as lâminas foram coradas com corante Harris-Shorr (WHO, 2010) e observadas em microscópio de luz Olympus Bx60[®] (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). As imagens foram obtidas pela câmera de captação de imagens AxioCamMRmZeiss[®] (Carl Zeiss MicroImaging GmbH,

Göttingen, Alemanha).

As medidas foram realizadas no programa Axio Vision 4.8.2[®] (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha). Foram mensuradas as dimensões da cabeça de 600 espermatozoides de cada indivíduo, sendo 100 células de cada esfregaço (Figura 1). Foram realizadas três mensurações de cada espermatozoide para obtenção da média de cada uma das medidas realizadas.

As mensurações foram realizadas da seguinte forma: a reta, para mensurar o comprimento (C) foi traçada partindo do centro da base da cabeça do espermatozoide até o ponto mais distante da cabeça. A reta da largura (L) foi traçada cruzando, num ângulo de 90°, o centro equidistante da reta do comprimento. Utilizando a ferramenta de medida de área (A) e perímetro (P), ao circundar a cabeça do espermatozoide com o cursor, o software fornecia automaticamente os valores da região discriminada.

Com as médias obtidas da dimensão da cabeça, foi possível calcular o formato da cabeça de cada um dos 600 espermatozoides, utilizando as seguintes fórmulas: elipticidade ($E=C/L$), alongamento [$Al=(C-L)/(C+L)$], rugosidade ($Rug=4\pi A/P^2$) e regularidade ($Reg=\pi CL/4A$).

O comprimento total da cauda (peça principal e peça final) e da peça intermediária foram mensurados em 200 espermatozoides, com três repetições para cada célula e obtida a média de cada medida.

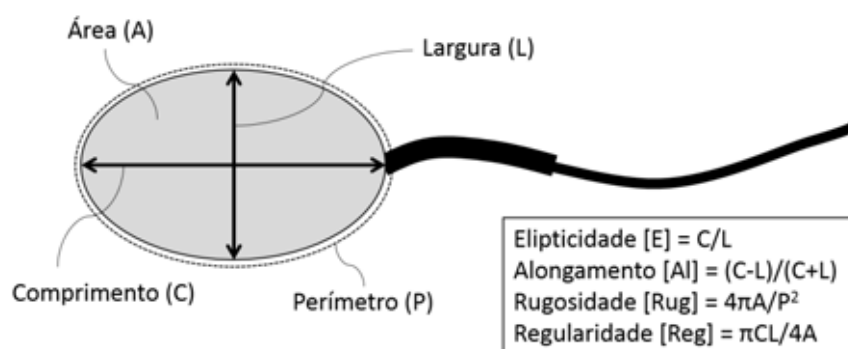


Figura 5. Medidas da cabeça realizadas no programa Axio Vision 4.8.2[®]. Reta do comprimento (C), reta da largura (L), área (A) e perímetro (P). Com os valores obtidos destas medidas de dimensão, foram calculadas as medidas de forma da cabeça do espermatozoide (elipticidade, alongamento, rugosidade e regularidade).

Análises dos Dados

Os dados de volume e concentração foram apresentados e analisados por estatística descritiva (média e desvio padrão). As médias obtidas das medidas de morfometria da cabeça (área, comprimento, largura, perímetro, alongamento, elipticidade, regularidade e rugosidade) e do flagelo (cauda e peça intermediária), de cada espermatozoide, foram analisadas em *blotspot* e os valores *outliers* foram retirados para análise dos dados. Para comparação das médias entre as espécies, foi primeiramente realizado o teste de normalidade. Para os dados com distribuição normal foram analisados com Teste-t, para os dados que não seguem uma distribuição normal, foi utilizado o Teste *Mann-Whitney*. Foram realizadas duas análises discriminantes para observar os padrões formados e se realmente há uma discriminação entre os grupos testados. A primeira análise considerou dois grupos (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) e a segunda análise considerou cinco grupos (N1, N2, G1, G2 e G3). Para encontrar as variáveis mais significativas para a discriminação das espécies foi utilizado o teste *stepwise*. O comprimento total da cauda e a peça intermediária também foram analisados quanto as suas proporções no espermatozoide.

Resultados

Os resultados obtidos quanto ao volume, concentração e coloração encontram-se na Tabela 1. O volume do ejaculado do veado-roxo apresentou uma média de $417,92 \pm 185,73 \mu\text{L}$, sendo que o animal N1 apresentou volumes maiores que o animal N2. Os volumes do ejaculado de veado-catingueiro foram em média de $458,11 \pm 236,45 \mu\text{L}$. O animal G2 foi o que apresentou maior variação no volume do ejaculado entre as coletas. As médias de volume não apresentaram diferença entre as espécies ($p=0,638$). A média da concentração do ejaculado do veado-roxo foi significativamente menor ($p < 0,01$) em relação a do veado-catingueiro, sendo $144,52 \pm 111,02$ e $759,37 \pm 357,42$ milhões de espermatozoides por ejaculado, respectivamente.

A coloração do ejaculado foi diferente para as duas espécies (Figura 2). Durante as análises do sêmen fresco e sem coloração, em microscópio de luz,

foi observada a presença de aglomerados avermelhados no plasma seminal do veado-roxo (Figura 3). Esta mesma estrutura não foi observada no ejaculado dos veados-catingueiros.

Tabela 1. Resultados obtidos quanto ao volume, concentração e coloração do ejaculado de dois indivíduos de *Mazama nemorivaga* e três indivíduos de *Mazama gouazoubira* em diferentes épocas do ano.

Espécie	Animais	Volume	Concentração		Coloração do ejaculado	Aspécto do ejaculado
			SPTZ x 10 ⁹ /mL	SPTZ x 10 ⁶ /ejaculado		
<i>M. nemorivaga</i>	N1	455	0,28	127,4	Vermelho	Leitoso
	N1	705	0,62	437,1	Vermelho	Cre moso
	N1	620	0,35	217	Vermelho	Leitoso
	N1	135	0,44	59,4	Vermelho	Aquoso
	N1	610	0,27	164,7	Vermelho	Leitoso
	N1	580	0,4	232	Vermelho	Aquoso
	N2	335	0,42	140,7	Vermelho	Aquoso
	N2	350	0,42	147	Vermelho	Leitoso
	N2	280	0,18	50,4	Vermelho	Aquoso
	N2	455	0,27	122,85	Vermelho	Aquoso
	N2	410	0,05	20,5	Vermelho	Aquoso
	N2	80	0,19	15,2	Vermelho	Aquoso
<i>M. gouazoubira</i>	G1	475	1,16	551	Branco	Cre moso
	G1	455	1,33	605,15	Branco	Cre moso
	G1	380	1,17	444,6	Branco	Leitoso
	G1	505	1,41	712,05	Branco	Leitoso
	G1	135	1,49	201,15	Branco	Cre moso
	G1	360	1,38	496,8	Branco	Cre moso
	G2	605	0,85	514,25	Branco	Aquoso
	G2	1050	0,94	987	Branco	Aquoso
	G2	420	1,22	512,4	Branco	Aquoso
	G2	905	1,08	977,4	Branco	Aquoso
	G2	750	1,03	772,5	Branco	Aquoso
	G2	100	1,34	134	Branco	Cre moso
	G3	315	2,89	910,35	Branco	Leitoso
	G3	430	3,1	1333	Branco	Cre moso
	G3	380	3,9	1482	Branco	Leitoso
	G3	390	3	1170	Branco	Leitoso
	G3	275	3,88	1067	Branco	Cre moso
	G3	280	2,85	798	Branco	Cre moso

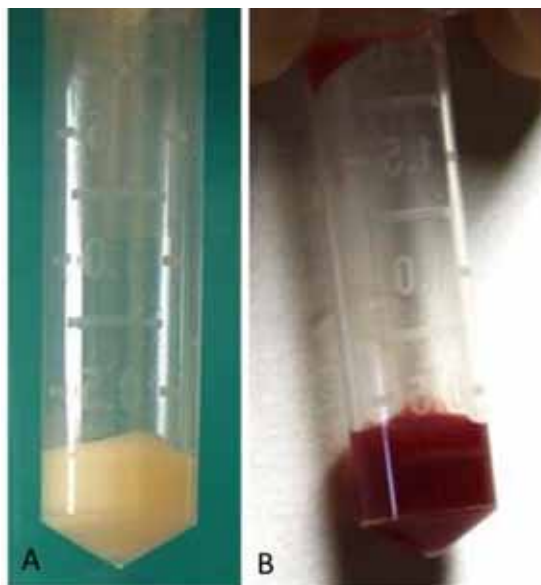


Figura 6. Ejaculados coletados por eletroejaculação de *M. gouazoubira* (A) de coloração branco e aspecto cremoso, e de *M. nemorivaga* (B) de coloração avermelhada e aspecto aquoso.

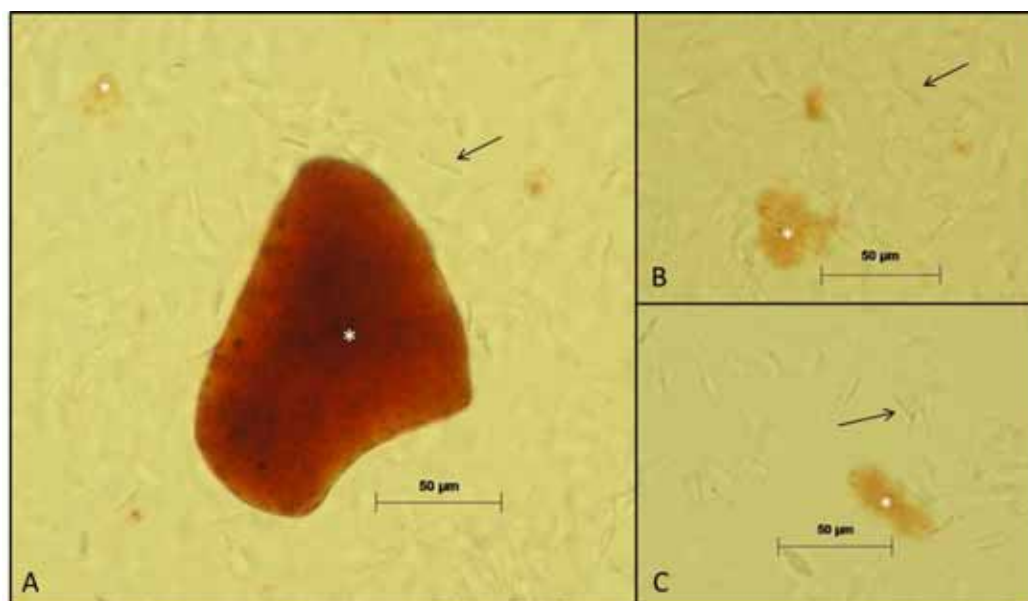


Figura 7. Imagens A, B e C: Observação do ejaculado fresco de *Mazama nemorivaga*, sem adição de coloração, em microscópio de luz. Observação de espermatozoides translúcidos (seta) e aglomerados de pigmentos avermelhados (asteriscos). Barra de escala representativa de 50 micrômetros.

Apenas as medidas alongamento e elipticidade não apresentaram diferenças significativas entre as espécies ($p > 0,05$). As outras variáveis de morfometria da cabeça apresentaram diferenças significativas entre as espécies ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e desvio padrão das medidas de dimensão e formato da cabeça dos espermatozoides das espécies de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, (valor de p para $\alpha = 0,05$).

Medidas (μm)	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. nemorivaga</i>	Valor de p
Área	28,626 \pm 2,159	42,046 \pm 2,903	< 0,01
Alongamento	0,28878 \pm 0,06195	0,29745 \pm 0,03177	0,606
Comprimento	7,9752 \pm 0,7102	9,4477 \pm 0,3383	< 0,01
Elipticidade	1,8329 \pm 0,2399	1,8525 \pm 0,1275	0,606
Largura	4,3830 \pm 0,3043	5,1179 \pm 0,2927	< 0,01
Perímetro	20,907 \pm 1,017	25,281 \pm 0,741	< 0,01
Regularidade	0,95687 \pm 0,05385	0,90306 \pm 0,04161	< 0,01
Rugosidade	0,82342 \pm 0,04670	0,82522 \pm 0,02413	0,001

Através da análise *stepwise* observa-se que a área foi a variável mais precisa para distinção das espécies. As outras variáveis foram classificadas em ordem decrescente: largura, perímetro, rugosidade, comprimento, elipticidade, regularidade e alongamento. A partir desse resultado, foi construída uma matriz *scatterplot* com os dados das duas variáveis mais precisas para discriminação dos grupos, área e largura. Com essa matriz foi possível distinguir a formação de dois grupos distintos, um contendo as medidas dos animais da espécie *M. nemorivaga* e outro contendo as medidas dos indivíduos da espécie *M. gouazoubira* (Figura 4).

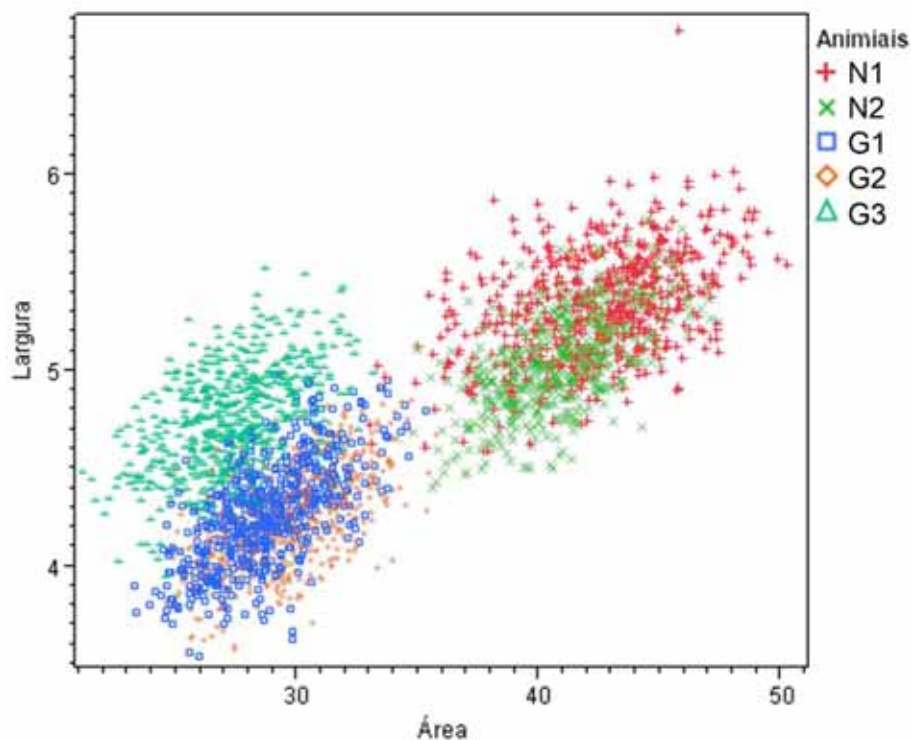


Figura 8. Gráfico scatterplot 2x2, dos dados de área (eixo x) e largura (eixo y) dos indivíduos de cada espécie. Indivíduos N1 e N2 da espécie *Mazama nemorivaga* e os indivíduos G1, G2 e G3 da espécie *M. gouazoubira*.

Pode-se notar no gráfico da Figura 4 que os dados plotados do indivíduo G3, apesar de estarem próximos da espécie *M. gouazoubira*, não se sobrepuseram com os outros representantes da espécie, como ocorreu com os demais indivíduos.

Na análise discriminante para as espécies observa-se a formação de dois padrões que discriminam as duas espécies com uma taxa de erro de identificação baixa (0,0021) (Tabela 3). Na Figura 5 é possível visualizar a formação dos padrões através da plotagem dos resultados das funções discriminantes lineares (Canônica 1 e Canônica 2) de cada amostra.

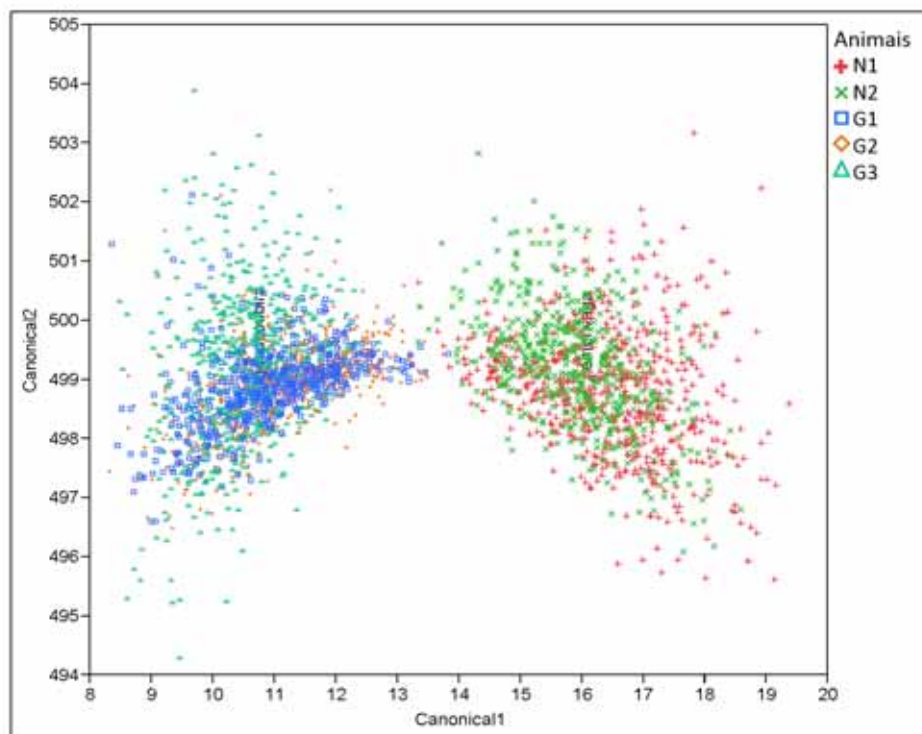


Figura 9. Gráfico criado pela análise discriminante canônica representando a discriminação entre os grupos *M. gouazoubira* (G1, G2 e G3) e *M. nemorivaga* (N1 e N2) a partir dos resultados obtidos das funções lineares discriminantes, Canonical 1 (eixo x) e Canonical 2 (eixo y). As variáveis utilizadas para obtenção das funções foram comprimento, largura, área, perímetro, rugosidade, regularidade, elipticidade e alongamento.

Tabela 3. Matriz criada pela análise discriminante da identificação dos espermatozoides nos determinados grupos de espécies (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*). Foram analisados 990 espermatozoides, utilizando 8 variáveis (área, alongamento, comprimento, elipticidade, largura, perímetro, regularidade e rugosidade). Na matriz estão descritos o valor absoluto do número de (n° SPTZ) e a porcentagem (%) de espermatozoides identificados, e a taxa de erro de identificação calculada pela análise discriminante.

	<i>M. gouazoubira</i>		<i>M. nemorivaga</i>		Total (n° SPTZ)	Taxa de erro
	n° SPTZ	%	n° SPTZ	%		
<i>M. gouazoubira</i>	593	99.83	1	0,17	594	0,0017
<i>M. nemorivaga</i>	1	0,25	395	99.75	396	0,0025
Total	594	60	396	40	990	0,0021

Na análise discriminante para os indivíduos observou-se a formação de três padrões, sendo o último contendo apenas o indivíduo G3 (padrão 1: N1 e N2; padrão 2: G1 e G2; padrão 3: G3). O erro calculado para identificação dos indivíduos foi 0,11 para N1, 0,12 para N2, 0,39 para G1, 0,19 para G2 e 0,0051 para G3, sendo um total de erro de identificação de 0,16 (Tabela 4).

Tabela 4. Matriz criada pela análise discriminante da identificação dos espermatozoides nos determinados grupos indivíduos (*M. nemorivaga*: N1 e N2; *M. gouazoubira*: G1, G2 e G3). Foram analisados 990 espermatozoides, utilizando 8 variáveis (área, alongamento, comprimento, elipticidade, largura, perímetro, regularidade e rugosidade). Na matriz estão descritos o valor absoluto (n° SPTZ) e a porcentagem (%) de espermatozoides identificados, e a taxa de erro de identificação calculada pela análise discriminante.

	N1		N2		G1		G2		G3		Total (n° SPTZ)	Taxa de erro
	n° SPTZ	%	n° SPTZ	%	n° SPTZ	%	n° SPTZ	%	n° SPTZ	%		
N1	177	89,89	20	10,10	1	0,51	0	0,00	0	0,00	198	0,1061
N2	23	11,62	175	88,38	0	0,00	0	0,00	0	0,00	198	0,1162
G1	4	2,02	0	0,00	120	60,61	73	36,87	1	0,51	198	0,3939
G2	2	1,01	0	0,00	36	18,18	159	80,30	1	0,51	198	0,197
G3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,51	197	99,49	198	0,0051
Total	206	20,81	195	19,70	157	15,86	233	23,54	199	20,10	990	0,1636

Os espermatozoides de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* apresentam diferenças significativas ($p < 0,001$) entre as médias do comprimento da cauda e peça intermediária (Tabela 5). Ao transformar os valores das médias do comprimento das regiões do espermatozoide em porcentagem, observamos que a composição do espermatozoide de *M. gouazoubira* é representado por 73,07% de cauda, 15,72% de peça intermediária e 11,21% de cabeça. O espermatozoide de *M. nemorivaga* é composto por 70,03% de cauda, 16,2% de peça intermediária e 13,26% de cabeça (Figura 6). Quando separamos os indivíduos, observamos que apenas o indivíduo G1 apresentou uma porcentagem de peça intermediária menor que os demais indivíduos. A proporção da cauda foi maior para os indivíduos G1, G2 e G3 em relação aos indivíduos N1 e N2. Já a proporção da cabeça foi maior para os indivíduos N1 e N2 em relação aos indivíduos G1, G2 e G3 (Figura 7).

Tabela 5. Média e desvio padrão das regiões do espermatozoide do comprimento total (somatória das regiões cabeça, peça intermediária e cauda), das espécies *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* e os valores de p dos testes não paramétricos da comparação das médias entre as espécies. (Valor de p para $\alpha=0,05$).

Média (μm)	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. nemorivaga</i>	Valor de p
Cauda	52,08 \pm 1,30	49,93 \pm 0,98	< 0,01
Peça Intermediária	11,21 \pm 0,41	11,83 \pm 0,38	< 0,01
Comprimento cabeça	7,98 \pm 0,71	9,44 \pm 0,33	< 0,01
Comprimento Total	71,28 \pm 1,88	71,21 \pm 1,32	0,251

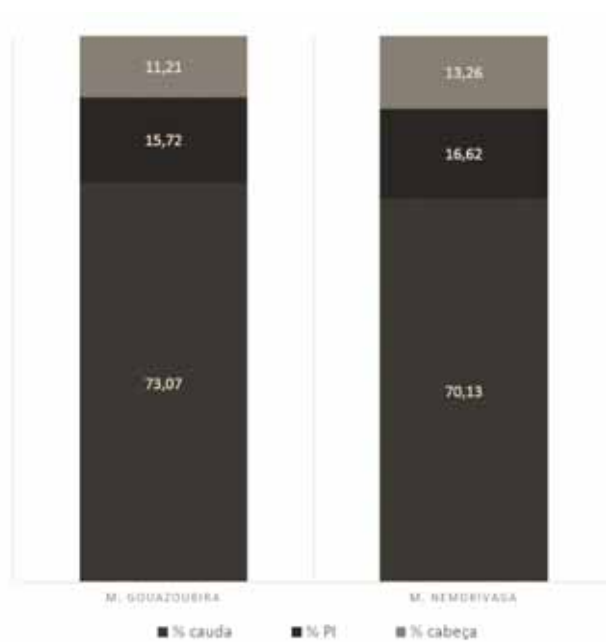


Figura 10. Composição do espermatozoide das espécies *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga* representada em porcentagem do tamanho de cada região (cauda – peça principal + peça final, peça intermediária e cabeça) em relação ao tamanho total do espermatozoide.

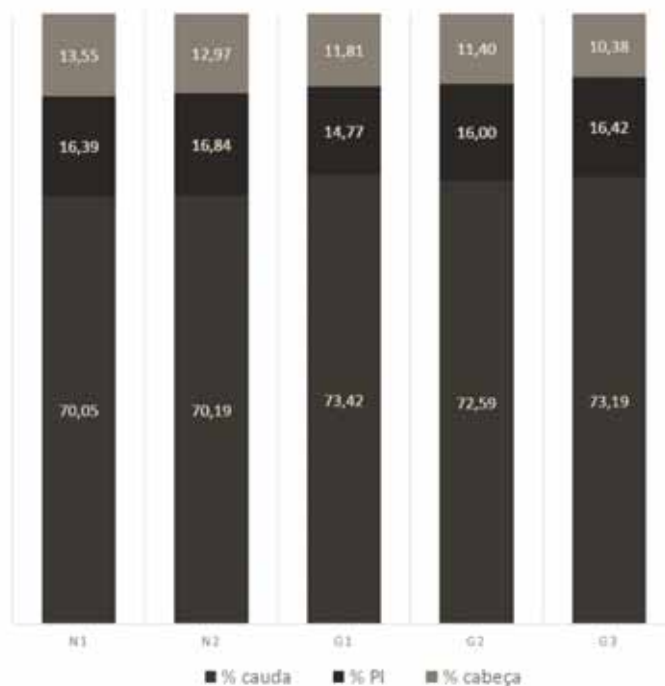


Figura 11. Composição do espermatozoide dos indivíduos N1 e N2 (*Mazama nemorivaga*) e G1, G2 e G3 (*Mazama gouazoubira*) representada em porcentagem do tamanho de cada região (cauda – peça principal + peça final, peça intermediária e cabeça) em relação ao tamanho total do espermatozoide.

Discussão

Todas as comparações realizadas neste experimento apresentaram diferenças significativas entre as duas espécies de *Mazama* cinzas brasileiros. A diferença da coloração do ejaculado entre as duas espécies ocorreu mesmo com os animais recebendo a mesma dieta e estando sob as mesmas condições de cativeiro. A coloração avermelhada do plasma seminal de *M. nemorivaga* já havia sido relatada por Peroni et al., em 2010. Segundo os autores, a coloração não está relacionada com presença de sangue (hemácias ou hemoglobina), mas não souberam dizer qual a origem da coloração do ejaculado. Quando observado em microscópio de luz, a pigmentação não se apresenta disseminada por todo o plasma seminal. Foram visualizados “aglomerados” de diferentes tamanhos não ligados aos espermatozoides. Em outras espécies é comum a coloração amarelada do plasma seminal devido à

presença de riboflavina em altas concentrações, sem influencia na fertilidade do espermatozoide (WHITE; LINCOLN, 1960; MENDOZA; WHITE; CHOW, 1989; AHMAD; NOAKES, 1996). Mas, a pigmentação avermelhada do plasma seminal não foi relatada em nenhuma outra espécie.

O ejaculado do *M. nemorivaga* apresentou uma concentração espermática menor. Nessa espécie já foi observada ejaculação involuntária durante procedimentos de coleta seminal, com ausência de estímulos (durante anestesia com anestésicos dissociativos), e na presença de estímulos leves durante limpeza do reto (CURSINO et al., 2012). Isto pode ser explicado pelo fato do macho de *M. nemorivaga* apresentar uma maior sensibilidade das glândulas anexas ao estímulo de massagem, e do eletrodo. O ejaculado obtido pela técnica de eletroejaculação é diferente do obtido por vagina artificial. Ao se estimular as glândulas anexas com o eletrodo há um aumento na secreção de plasma seminal diminuindo a concentração do ejaculado (AUSTIN; HUPP; MURPHREE, 1961). Importante destacar que durante a necropsia de dois indivíduos que participaram do experimento (N2 e G3 vieram a óbito por motivos não relacionados ao estudo ou a doenças que possam ter interferido nos resultados), foi observado que, apesar do *M. nemorivaga* ter uma estrutura corporal menor que *M. gouazoubira* (Rossi 2000), suas glândulas anexas são maiores, principalmente a vesícula seminal, e os testículos proporcionalmente menores (dados ainda não publicados). Provavelmente, por apresentar glândulas anexas maiores, o estímulo do eletrodo será maior e o ejaculado apresentará um volume maior de plasma. Além disso, um testículo menor produz uma quantidade menor de espermatozoide (TAKIHARA et al., 1987). Talvez essas características anatômicas possam explicar a diferença encontrada na concentração do ejaculado entre as duas espécies.

O comprimento da cabeça do espermatozoide pode variar muito entre os artiodactilas, de 4,8µm (*Tragulus javanicus ravus*) a 10,43µm (*Philantomba monticola*) (ANDERSON; NYHOLT; DIXSON, 2005). Ao comparar estes dados com as dimensões da cabeça dos espermatozoides dos *Mazama* cinza brasileiros, observamos que *M. gouazoubira* possui um comprimento médio dentre os artiodactilas, já o *M. nemorivaga* se assemelha às espécies com cabeças maiores.

A diferença encontrada entre as dimensões da cabeça dos espermatozoides das duas espécies é grande, por exemplo, a média da área da cabeça do espermatozoide de *M. nemorivaga* é quase o dobro do valor para *M. gouazoubira*. Já o formato da cabeça tende a ser muito parecido, uma vez que não apresentou diferenças significativas para alongamento e elipticidade. Em relação ao tamanho total da célula espermática, as espécies não apresentaram diferenças significativas, mas o *M. gouazoubira* apresenta uma cauda maior e o uma cabeça menor em relação ao *M. nemorivaga*. As proporções encontradas para cauda e peça intermediária são diferentes das apresentadas por Patterson et al. (1985) para cervídeos. Ao comparar 8 espécies de cervídeos, os autores observaram que apesar das diferenças nas dimensões da cabeça e no comprimento das diferentes regiões do espermatozoide, as espécies mantinham uma proporção entre elas muito similares, com o comprimento da cabeça representando 11-14% do tamanho total, a peça intermediária 18-21% e a cauda 66-69% (Patterson et al., 1985). Os *Mazama* cinzas apresentam uma peça intermediária menor (15-16%) e uma cauda maior (70-73%).

Segundo Malo e colaboradores (2005), os principais determinantes da velocidade de deslocamento dos espermatozoides são a forma da cabeça e as proporções entre os componentes do flagelo, e que os espermatozoides com peça intermediária menor e cauda maior tendem a ser mais velozes. Os espermatozoides mais velozes possuem uma relação com as espécies que possuem uma maior competição espermática no trato reprodutivo feminino (TOURMENTE; GOMENDIO; ROLDAN, 2011). Estudos comparativos entre espécies mostram que esta relação existe em muitos taxons, mas as consequências do aumento no tamanho varia entre as espécies dependendo do ambiente no qual o espermatozoide tenha que competir (GOMENDIO; ROLDAN, 1991, GAGE; FRECKLETON, 2003). Existem evidências que a competição espermática leva a seleção de espermatozoides maiores (GOMENDIO; ROLDAN, 2008). Não apenas pelo fato das dimensões dos espermatozoides serem significativamente diferentes, mas pela diferença encontrada no plasma seminal quanto à presença de pigmentos avermelhados, provavelmente o ambiente do trato reprodutor feminino é diferente entre as espécies de *Mazama* cinzas. Ambas possuem espermatozoides grandes com

caudas compridas, características encontradas em espermatozoides velozes (GOMENDIO; ROLDAN, 2008), mas talvez exista uma maior competição espermática na espécie *M. gouazoubira* em relação à *M. nemorivaga*. Isso porque que *M. gouazoubira* apresenta algumas características importantes como testículos grandes, uma proporção maior da cauda em relação ao comprimento da cabeça do espermatozoide e, sobretudo, vive em ambientes abertos como caatinga e cerrado onde o encontro com outros indivíduos da espécie se torna mais fácil e mais competitivo. Já o *M. nemorivaga* apresenta testículos pequenos, um espermatozoide com cabeça grande e uma cauda mais curta e vive na Floresta Amazônica, um ambiente fechado de difícil acesso que dificulta a localização e o encontro de indivíduos da mesma espécie, o que pode levar a uma menor competição por fêmeas.

As análises de morfologia espermática citam valores muito altos de patologias, principalmente relacionados à cauda (para ambas as espécies), formas anormais de cabeça para *M. gouazoubira* e defeitos na peça intermediária para *M. nemorivaga* (PERONI et al., 2012). Uma forma de evitar que esses defeitos interferissem nos cálculos, optamos por retirar valores outliers para comparação das médias.

Seis de oito, das variáveis da morfometria de cabeça, apresentaram diferenças significativas entre as espécies. A importância desses dados para diferenciação dos *Mazama* cinzas foi observada no resultado das análises discriminantes. Os espermatozoides foram classificados dentro de sua espécie com baixo índice de erro, isso nos indica que as variáveis usadas para as análises foram precisas para diferenciar *M. gouazoubira* de *M. nemorivaga*. Seria interessante um segundo estudo acrescentando dados de outras espécies de *Mazama* e observar os padrões e as distâncias formadas entre as diferentes espécies de *Mazama* vermelho e *Mazama* cinza.

Ao observarmos a segunda análise que discrimina os espermatozoides em 5 grupos, representados pelos indivíduos, a taxa de erro é maior ao classificar os espermatozoides entre os indivíduos dentro das espécies, havendo uma mescla na identificação dos espermatozoides entre N1 e N2, e G1 e G2. Interessante destacar a precisão na identificação dos espermatozoides do indivíduo G3, onde a taxa de erro foi baixa não apresentando mescla de classificação com os grupos G1 e G2, que

supostamente pertencem a sua espécie (*M. gouazoubira*). Um estudo semelhante, realizado com morfometria de espermatozoides de *Bos taurus* e *B. indicus*, definiu características específicas para cada subespécie, mesmo a análise apresentando uma taxa de erro maior que a apresentada neste trabalho (BELETTI; COSTA, 2003). A criação de 3 padrões distintos pela análise discriminante dos indivíduos nos leva a acreditar que G3 realmente não deva pertencer à mesma espécie dos indivíduos G1 e G2, corroborando com os trabalhos de filogenética que levantam a hipótese de *M. gouazoubira* ser um complexo de espécies crípticas (FIGUEIREDO, 2014).

A acurácia em identificar os espermatozoides das duas espécies de *Mazama* cinzas nos leva a acreditar que uma nova análise incluindo outras espécies do gênero *Mazama*, novos indivíduos de *Mazama* cinzas, e considerando a influência filogenética das espécies, pode incrementar os dados e corroborar com a hipótese de criação de novos gêneros para os *Mazama* cinzas brasileiros e até mesmo a criação de novas espécies ou subespécies para *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*.

Conclusão

Foram encontradas diferenças significativas em todas as comparações propostas, na característica do ejaculado e na morfometria espermática, para distinção das espécies. A acurácia encontrada na análise discriminante, utilizando dados da morfometria da cabeça dos espermatozoides de *Mazama* cinzas, indica que esta será uma ferramenta válida para novos estudos filogenéticos do gênero *Mazama*.

Referências

- AHMAD, N.; NOAKES, D. E. Seasonal variation in semen quality of young british goats. **British Veterinary Journal**, v. 152, p. 225-236, 1996.
- ANDERSON M. J., NYHOLT, J.; DIXSON, A. F. Sperm competition and the evolution of sperm midpiece volume in mammals. **Journal of Zoology**, London v. 267, p. 135–142, 2005.
- AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHREE, R. L. Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by eletroejaculation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 44, n. 12, p. 2292–2297, 1961.
- BELETTI, M. E.; COSTA L. F. A systematic approach to multispecies sperm morfometric characterization. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, Saint Louis, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã, v. 85, p. 105-116, 2005a.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A spectral framework for sperm shape characterization. **Computers in Biology and Medicine**, Amsterdã, v. 35, p. 463–473, 2005b.
- CURSINO, M. S.; PERONI, E. F. C.; ROLA, L. D.; CHRISTOFOLETTI, M. D.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Análise comparativa preliminar do ejaculado de veados – cinza brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*). In: XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, Florianópolis, Santa Catarina, 2012. **Anais XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens 2012**, p. 102-105.
- DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Reprodução assistida em cervídeos brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1-2, p. 111-121, 1995.
- DUARTE, J. M. B.; GONZÁLES, S. **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, Jaboticabal, FUNEP, p. 394. 2010.
- DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdã, v. 49, p.17–22, 2008.
- EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics. The Central Neotropics**. Chicago, University of Chicago Press, 1999. p. 345.
- ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; MONTORO, V.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARDE, J. J. Identification of sperm-head morphometric subpopulations in iberian red deer epididymal sperm samples. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 44, p. 206–211, 2009. [doi:

10.1111/j.1439-0531.2007.01029.x].

FIGUEIREDO, M. G. **Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*)**. 2014. 68 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

GAGE, M. J. G. Mammalian sperm morphometry. **Proceedings Royal Society London B - Biological Science**, Londres, v. 265, n. 1391, p. 97-103, 1998.

GAGE, M. J. G.; FRECKLETON, R. P. Relative testis size and sperm morphometry across mammals: no evidence for an association between sperm competition and sperm length. **Proceedings Royal Society London B - Biological Science**, Londres, v. 270, p. 625-632, 2003.

GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Sperm Competition Influences Sperm Size in Mammals. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 243, n. 1308, p. 181-185, 1991.

GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 52, p. 439-447, 2008.

GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M.; DAVIS, R. O., HUGHES, J. P., CASEY, P. J. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Tehran, v. 108, p. 41-46, 1996.

HAIGH, J. C.; CATES, W. F.; GLOVER, G.J.; RAWLINGS, N. C. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapiti (*Cervus elaphus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Tehran, v. 70, p. 413-418, 1984.

MALO, A. F.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J.; GARCÍA, A. J.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 72, p. 822–829, 2005.

MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; SOLER, A. J.; ESTESO, M. C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; GARDE, J.J. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. **Theriogenology**, Nova Iorque, v. 73, p. 437-448, 2010.

MENDOZA, G.; WHITE, I. G.; CHOW, P. Studies of chemical components of angora goat seminal plasma. **Theriogenology**, Nova Iorque, v. 32, n. 3, p. 455-466, 1989.

MERINO, M. L.; ROSSI, R. V. Origin, systematics, and morphology radiation. In: DUARTE, J. M. B. & GONZÁLES, S. (Ed.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, FUNEP, Jaboticabal, 2010. p. 2-11.

PATTERSON, M. C.; STOVER, J.; WESTROM, W. K.; SCHAFFER, N. S.

Comparative dimensional analysis of spermatozoa of seven species of cervidae. **The Journal of Zoo Animal Medicine**, Yulee, v. 16, n. 4, p. 144-146, 1985.

PERONI, E. F. C.; ZANETTI, E. S.; ROLA, L. D.; CURSINO, M. S.; DUARTE, J. M. B. Morfologia Espermática dos veados-cinza brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*) mantidos em cativeiro: resultados preliminares. In: XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, Florianópolis, 2012. **Anais XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens 2012**, p. 130-133.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1917 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. 2000. 189 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SARAVIA, F.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J. M.; SOLER, C.; MURIEL, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; PEÑA, F. J. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. **Theriogenology**, Nova Iorque, v. 68, p. 196–203, 2007.

TAKIHARA, H.; COSENTINO, M. J.; SAKATOKU, J.; COCKETT, A. T. Significance of testicular size measurement in andrology: II. Correlation of testicular size with testicular function. **The Journal of Urology**, Philadelphia, v. 137, n. 3, p. 416-419, 1987.

TOURMENTE, M.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. **BMC Evolutionary Biology** [periódico eletrônico] v. 11, p. 1-12. 2011. Acesso em junho de 2012. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/12>

VALLE, R. R.; CARVALHO, F. M.; MUNIZ, J. A. P. C.; LEAL, C. L. V.; GARCÍA-HERREROS, M. Differential distribution of sperm subpopulations and incidence of pleiomorphisms in ejaculates of captive howling monkeys (*Alouatta caraya*) **Naturwissenschaften**, Southampton, 2013. [doi 10.1007/s00114-013-1092-8].

WHITE, G.; LINCOLN, G. J. The Yellow Pigmentation of Bull Semen and its Content of Riboflavin, Niacin, Thiamine and Related Compounds. **Biochemical Journal**, Londres, v. 76, p. 301-306, 1960.

World Health Organization **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5th ed. WHO Press, 2010.

CAPITULO 3 – Diferenças dos perfis proteicos bidimensionais e proteínas do plasma seminal de veados-cinza (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*)

Resumo

Visando auxiliar na descrição detalhada e diferenciação da biologia reprodutiva de duas espécies de *Mazama* cinzas (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*), este estudo comparou os mapas proteicos e identificou suas principais proteínas do plasma seminal das duas espécies. Utilizando a eletroforese SDS-PAGE bidimensional pudemos observar diferentes padrões dos géis *Masters*. No geral, os “spots” mais representativos tanto para *Mazama gouazoubira* quanto para *Mazama nemorivaga*, foram os dos peptídeos de baixo peso molecular (8 a 15 kDa) e pH variando de 4 a 8. Porém, o padrão de distribuição dos spots foi diferente e, apesar do número reduzido de proteínas identificadas no plasma seminal do *M. nemorivaga* - devido a interferência da pigmentação avermelhada, foi possível identificar diferentes proteínas, para cada espécie, que apresentam a mesma função no processo de maturação e proteção espermática, e durante o processo de fertilização. Essas diferenças encontradas podem auxiliar nas discussões relativas à diferenciação das espécies em dois gêneros distintos.

Palavras-chave: Eletroforese SDS-PAGE 2D, Proteômica, Veado-catingueiro, Veado-roxo.

Introdução

O plasma seminal é composto por fluidos das glândulas acessórias do macho e contém polipeptídios que interagem com os espermatozoides tendo um papel importante na reprodução do macho (MILLER; AX, 1988). Contribui também na capacitação e competição espermática, e no processo de fertilização (POIANI, 2006). A identificação e descrição das funções de determinadas proteínas do plasma seminal já foi bem definida para bovinos (MOURA et al. 2007) e proteínas homologas já foram descritas em outras espécies domésticas (CALVETE et al., 1995; VILLEMURE; LAZURE; MANJUNATH, 2003; BERGERON et al., 2005). Poucos trabalhos, neste âmbito, foram voltados a ruminantes não domésticos (BOISVERT et al., 2004; HARSHAN et al., 2009; KERSHAW-YOUNG; MAXWEL, 2012).

A caracterização básica do sêmen de cervídeos neotropicais tem recebido pouca relevância científica, entretanto este tipo de informação é importante para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida (ART - Assisted Reproductive Techniques) ou criação de protocolos de criopreservação de gametas. As ART e os bancos de recursos genéticos (GRB - Genetics Resource Bank) são considerados fundamentais para a conservação de espécies ameaçadas (HOLT; PICKARD, 1999). Os cervídeos estão sofrendo com a extensiva perda da biodiversidade devido à caça, fragmentação e exploração de seus habitats, dentre outras pressões antropogênicas (ZANETTI et al., 2010). Das oito espécies de cervídeos Brasileiros, duas são consideradas vulneráveis (*Blastocerus dichotomus* e *Mazama bororo*), duas como dados insuficientes (*M. americana* e *M. nana*), três como pouco preocupantes (*Odocoileus virginianus*, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) e apenas uma espécie não entra na lista de ameaças (*Ozotocerus bezoarticus*) (IUCN, 2013). Entretanto o uso das ART, para a preservação dos cervídeos neotropicais, atualmente está limitada devido à falta de conhecimento sobre a fisiologia da reprodução das espécies (ZANETTI et al., 2010). Um segundo fator que implica na realização de estudos mais aprofundado sobre a biologia reprodutiva de cervídeos são as complexas discussões que ainda existem quanto a taxonomia de alguns gêneros de cervídeos neotropicais, como a criação de dois novos gêneros para *M.*

gouazoubira e o *M. nemorivaga* (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; FIGUEIREDO, 2014).

O *Mazama gouazoubira* é uma das espécies mais abundantes dentre os cervídeos neotropicais (DUARTE, 1996), mas sua classificação de ameaça muda dentro das populações dependendo da distribuição geográfica em que se encontra (IUCN, 2013). Entretanto, esta espécie tem sido utilizada como modelo para o desenvolvimento de técnicas reprodutivas, uma ferramenta para a conservação de cervídeos neotropicais (ZANETTI; DUARTE, 2011). A espécie *M. nemorivaga* foi descrita pela primeira vez por CUVIER em 1817. Porém, apenas no final do século 20 e início do século 21 a ocorrência da espécie foi reconhecida no Brasil; antes disso, a espécie era confundida com *M. gouazoubira* (DUARTE, 1998; ROSSI, 2000; ROSSI; DUARTE 2008; ROSSI et al., 2010; MERINO; ROSSI, 2010). Trabalhos recentes apresentaram indícios, com base em estudos moleculares, de que as duas espécies devem ser separadas em gêneros distintos, incluindo a criação de novas espécies e subespécies dentro desses novos gêneros (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; FIGUEIREDO, 2014).

Com o intuito identificar as principais diferenças entre as proteínas presente no plasma seminal das espécies de *Mazama* cinza brasileiros, utilizamos a técnica de eletroforese 2-D SDS-PAGE para descrever o mapa proteico e espectrometria de massa ESI-Q Tof para identificar as proteínas presentes do plasma seminal de cada uma das espécies.

Metodologia

Animais

Foram utilizados machos adultos das espécies *M. gouazoubira* ($n=3$), *M. nemorivaga* ($n=2$). Os animais pertencem ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), do Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP/Jaboticabal (21° 14' 45,3" sul e 48° 16' 45,9" oeste). Os animais foram mantidos isolados em baias e receberam a mesma dieta e oferta de água "*ad libitum*". Os indivíduos foram expostos às mesmas flutuações naturais de luminosidade. Os

parâmetros seminais dos *M. nemorivaga* utilizados apresentaram uma concentração média de $0,32 \times 10^9$ espermatozoides/mL de ejaculado e motilidade entorno de 60%. Os *M. gouazoubira* apresentaram uma concentração média de $1,89 \times 10^9$ espermatozoides/mL de ejaculado e motilidade entorno de 70%.

Obtenção das proteínas do plasma seminal

A colheita de sêmen foi realizada pela técnica de eletroejaculação, onde cada animal foi previamente anestesiado com uma combinação de xylazina (1mg/kg) e cetamina 7mg/kg) administrada pela via intramuscular. Para a execução deste procedimento foi utilizado um eletroejaculador (P-T Electronics®; Boring, OR; USA) acoplado a uma probe de 2,0 cm de diâmetro, 28,0 cm de comprimento; com três eletrodos longitudinais em sua superfície e distância entre os mesmo de 1,5 cm. Após sedação e introdução do eletrodo no reto, o animal recebeu eletrochoques crescentes de 250 mA a 750 mA com duração média de três segundos, e entre cada choque um intervalo de três segundos (perfazendo um total de dez estímulos por sequência). Foram realizadas três sequências de estimulação, com intervalos de um a dois minutos, durante uma colheita de sêmen (DUARTE; GARCIA, 1995). O ejaculado foi então acrescido de 5 µL de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para cada 500 µL de ejaculado e centrifugado a 500 x g por 15 minutos para separar os espermatozoides do plasma seminal.

O plasma seminal foi centrifugado a 10000 x g por 60 minutos (4°C) e o sobrenadante precipitado segundo van Tilburg et al. (2013) com modificações. Uma alíquota de 50µL de plasma seminal foi adicionado em 1mL de acetona (100%) resfriada e mantida a -20°C por 2 horas. Para recuperar as proteínas precipitadas a solução de acetona e plasma seminal foi centrifugada a 5000 x g por 60 minutos (4°C). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” seco a 4°C por 12 horas.

Para *Mazama nemorivaga* foi realizado um protocolo diferente para precipitação das proteínas do plasma seminal devido a sua característica peculiar da coloração avermelhada (PERONI et al., 2010; CURSINO et al., 2012). Após a coleta o plasma seminal passou por uma primeira centrifugação de 10000 x g por 60 minutos e uma segunda centrifugação de 100000 x g por

duas horas. Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi acrescido solução ácido tricloroacético (10% de TCA, 0,07% β -Mercaptoetanol, 20mM Ditiotreitól [DTT], em acetona 100%) e armazenado a -20°C por 45 minutos. Foi então centrifugado a $5000 \times g$ por 60 minutos (4°C) e o “pellet” resultante da centrifugação foi suspenso em 1mL de solução acetona 100% com DTT (20mM) resfriada e mantida a -20°C por 2 horas. Para recuperação das proteínas precipitadas, a solução foi centrifugada a $5000 \times g$ por 60 minutos (4°C). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” seco a 4°C por 12 horas. Os precipitados de proteínas do plasma seminal das duas espécies e do híbrido foram ressuspensos em tampão de amostra I (7 M Ureia, 2 M Tiuréa, 40 mM DTT, 2% anfólitos livres [IPG buffer, pH 3 -10 (GE LifeSciences)], 4% 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propanosulfonato) e armazenados a -20°C até sua utilização.

As proteínas do plasma seminal foram diluídas em água ultra purificada (1:30) e a concentração de proteínas das amostras foi realizada (em duplicata) segundo o método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA - Sigma-Aldrich) como padrão.

Eletroforese SDS-PAGE bidimensional para proteínas do plasma seminal

A eletroforese das proteínas do plasma seminal foi realizada segundo Souza et. al. (2010) com modificações. As amostras contendo 400 μg de proteínas do plasma seminal foram acrescidas de tampão de hidratação (7 M ureia, 2 M Tiuréa, 2% anfólitos livres [IPG buffer, pH 3-10 (GE LifeSciences)], 2% 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propanosulfonato, e azul de bromofenol) suficiente para alcançar o volume de 250 mL. Então, as amostras foram incubadas em tiras de pH de 13 cm (IPG strips linear: pH 3–10 para proteínas do plasma seminal; GE LifeSciences, Piscataway, NJ, USA), por 18 horas. A focalização isoeletrica foi realizada no sistema ETTAN IPGphor 3 (GE LifeSciences) a 20°C , com a seguinte programação: 250 Volts (V) (750 Volts hora (Vh)), 500 V (500 Vh), 800 V (800 Vh), 1000 V (1000 Vh), 8000 V (9000 Vh), e 8000V (32,000Vh), com um total de 44,050 Vh.

Após a focalização as tiras foram incubadas em tampão de equilíbrio I (6 M ureia, 50 mM TRIS-HCl pH 8.8, 29.3% glicerol, 2% SDS, 1% DTT) por 20 minutos e reidratadas em tampão de equilíbrio II por 20 minutos (similar ao

tampão de equilíbrio I mas contendo 2.5% iodoacetamida ao invés do DTT). As tiras equilibradas foram fixadas em agarose (5% em SDS-PAGE em tampão de corrida) sobre o gel de SDS-poliacrilamida homogêneo (15%). A corrida se deu a 500 V, 90 W, com 30 mA por gel (Hoefer SE 600; GE LifeSciences). Os géis foram então corados em Azul de Comassie coloidal, segundo Candiano et al. (2004) e van Tilburg et al. (2013) com modificações. Resumidamente, os géis foram colocados em solução de fixação (ácido fosfórico 2% e álcool etílico 30%) por 12-18 horas. Os géis então foram lavados por três vezes (20 minutos cada etapa) em solução de ácido fosfórico a 2% em solução de protonação por mais 30 minutos (ácido fosfórico 2%, álcool etílico 18%, e sulfato de amônio 15%); ao final foi adicionado à solução corante Coomassie Blue G-250 (2%) e os géis mantidos em agitação na solução por 72 horas a temperatura ambiente.

Análise dos mapas proteicos

Os géis bidimensionais foram digitalizados a 300 dpi (Image-Scanner II; GE LifeSciences), salvos em formato de documentos de imagem (.tiff) e analisados no programa PDQuest software (version 7.3.0; Bio-Rad). Os géis *Master* formados pelas imagens dos géis foram avaliados sob uma simples combinação dos mapas tendo como base o gel com “spots” mais representativos. A partir do gel *Master* foi possível obter o peso molecular, ponto isoelétrico e quantificação densitométrica dos “spots” corados pelo azul de coomasie (MOURA et al.,2006).

Identificação das proteínas por espectrometria de massa ESI-Q Tof (Eletrospray ionization quadrupole-time-of-flight)

Após a identificação e análise dos spots no Gel Master, estes foram recortados dos géis e submetidos à digestão por tripsina, como descrito por Moura et al. (2010). Resumidamente, os pedaços de géis recortados foram lavados (3 vezes) em 400 µL de meio tampão (50% acetonitrila em 25mM de bicarbonato de amônio), desidratados em acetonitrila (duas lavagens com 200µL). Após secagem em temperatura ambiente, foram incubados por 12 horas a 37°C em tripsina (Promega, V5111, Madison, WI, USA). Para extração dos peptídeos do gel, foram realizados dois banhos de ácido fórmico 5% (25µL

por 20 minutos). Os extratos foram secos e ressuspendido em 10 μ L de acetonitrila 5% contendo ácido fórmico (0,1%). As amostras obtidas da digestão de cada spot foram analisadas por cromatografia líquida de capilaridade/espectrometria de massa de ionização por nanoeletrospray em tandem (NanoUPLC-MS/MS), utilizando o espectrometro de massa Synapt G1 HDMS (Waters Corp, Milford, MA, USA).

As amostras digeridas foram injetadas no solvente A da na fase móvel (acetonitrila/água/ácido fórmico 5/95/0.1) fornecido pela bomba auxiliar da unidade capilar do HPLC com fluxo de 5 μ L/ min e os peptídeos foram aprisionados na coluna Waters Symmetry 300 TM da fase estacionária (C-18, 5 μ m film; 0.3 mm \times 5 mm) para dessalinização e pré-concentração. Após aprisionamento os peptídeos foram liberados por um fluxo de solvente em gradiente, levados a uma coluna analítica HSS T3 fusionada a uma coluna capilar de sílica (C-18 5 μ m, 0.075 mm \times 150 mm) usando uma válvula de comutação 10-ports. A coluna analítica correu com em gradiente (5 to 80 % solvente B; acetonitrila/água/ácido fórmico, 95/5/0.2; em 40 min). O espectrômetro de massa foi calibrado utilizando fragmentos de ion Glub-Fib. O espectrômetro de massa foi operado para adquirir a espectrometria de massa em tandem dos peptídeos trípticos no modo de aquisição de dados dependentes para seleção de ions precursores utilizando o reconhecimento charge-state e o limiar de intensidade como critério de seleção usando MassLynx 4.0 service pack 1. Para a aquisição dos dados por espectrometria de massa em tandem, foi realizada uma varredura (survey scan - 1.5 s) *over them/Zof* 400-1,500. Para cada varredura, três dos ions precursores mais intensos foram escolhidos, com base nos critérios de seleção, para obter a espectrometria de massa em tandem e a produção do espectro resultante da dissociação induzida por colisão na presença de argônio. O espectro de ion obtido foi processado usando o programa Protein Lynx Global Server 2.1 e foi convertido em arquivos texto para busca no banco de dados. Para identificação das proteínas, foi realizada uma busca de ions MS/MS com os espectros processados contra o banco de dados do NCBIInr utilizando o programa online MASCOT Daemon and search engine (Matrix Science Inc., Boston, MA, USA). As buscas foram feitas assumindo que haveria no máximo a perda de uma quebra de tripsina e que os peptídeos eram mono-isotopicos e usaram

resíduos de metionina parcialmente oxidados, e resíduos de cisteína completamente carbamidometilados. A tolerância da massa de peptídeos e a tolerância da massa de fragmentos foram definidas inicialmente como 0.3 e 0.1 Da, respectivamente, para busca de ions MS/MS. Entretanto, as identificações dos peptídeos candidatos foram apenas aceitas se o valor m/z for observado dentro de 0.1 Da da massa teórica da identificação.

Categorização de proteínas

As informações das proteínas obtidas pelo MASCOT foram analisadas utilizando o STRAP (Software Tool for Rapid Annotations of Proteins, Cardiovascular Proteomics Center, Boston University School of Medicine). Este software obtém automaticamente os dados do Gene Ontology (GO) das proteínas e os listam em forma de tabela, utilizando o acesso livre do banco de dados UniProtKB e EBI GOA (BHATIA et al., 2009 e Santos et al., 2014)

Resultados

O protocolo testado neste trabalho não possibilitou a retirada completa da pigmentação presente no plasma seminal de *M. nemorivaga*, e por este motivo a focalização e eletroforese das proteínas foram prejudicadas, sendo possível visualizar apenas alguns *spots* no gel de proteínas do plasma seminal dessa espécie.

Eletroforese SDS-PAGE bidimensional para proteínas do plasma seminal e identificação das proteínas

O perfil bidimensional de eletroforese do plasma seminal de *M. gouazoubira* revelou desde a presença de proteínas de baixo peso molecular, 8 KDa, até proteínas de alto peso molecular, 153 KDa (Figura 1). Os pontos isoelétricos variaram entre o pH 3,77 e o pH 8,35. A partir do gel *Master* elaborado através da análise dos mapas individuais (Figura 2), foram identificados 529 *spots*, sendo 418 presentes em pelo menos três dos seis géis analisados. Esses 418 *spots* representam 89,77% da intensidade total dos *spots* presentes no gel *Master*. O spot 4 (12,27KDa e pH 5,47), mais

expressivo no gel, apresentou uma intensidade de 7,14% e apenas 13 spots apresentam intensidade maior que 1%, representando 35,22% da intensidade total de spots. O principal grupo de proteínas foi identificado entre o pH 4,33 e pH 8,35 e massa molecular de 8,11 kDa a 52,86 kDa e representaram 48,23% da intensidade total de spots.

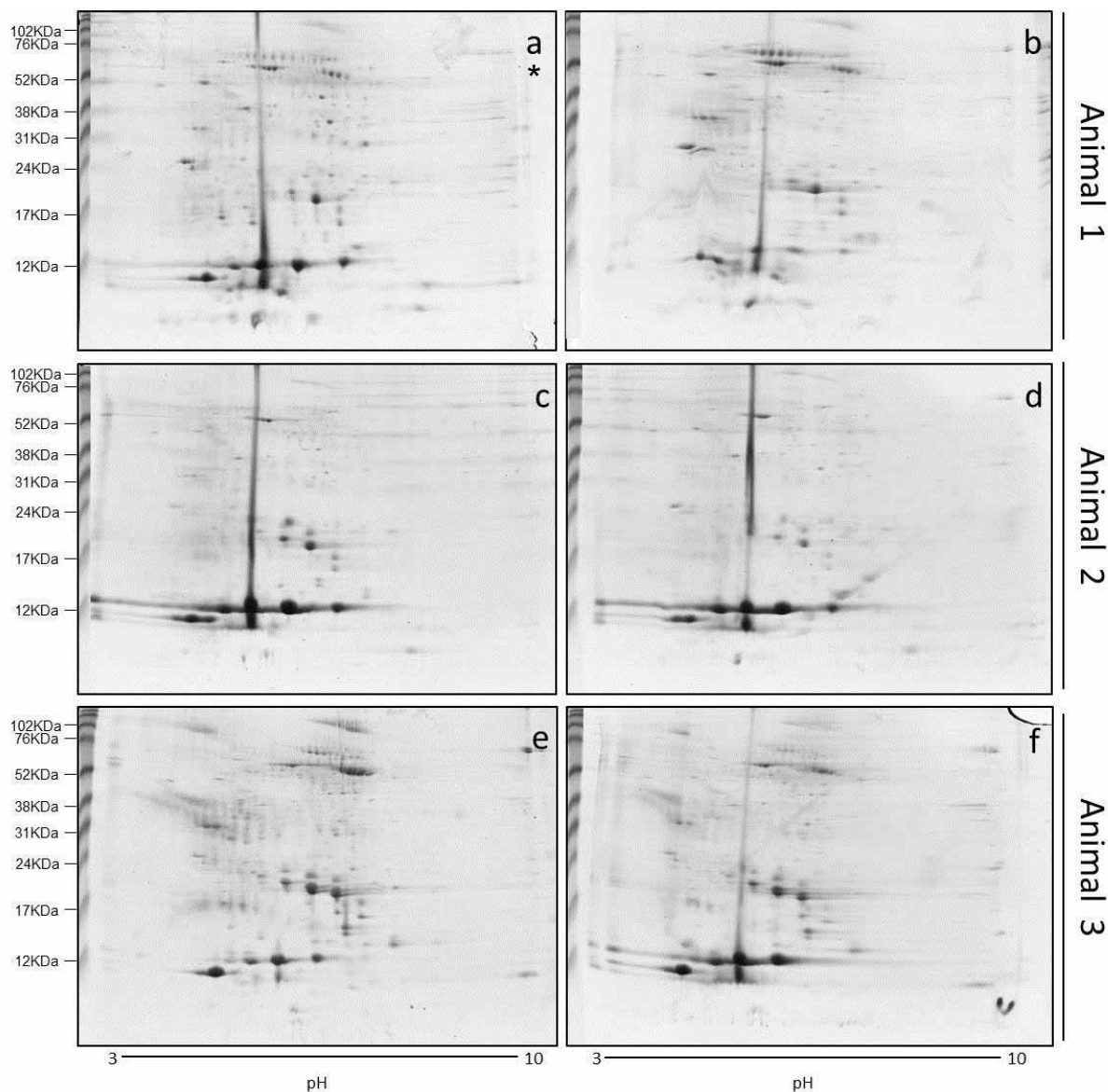


Figura 12. Géis bidimensionais da eletroforese SDS-PAGE do plasma seminal dos animais da espécie *Mazama gouazoubira*. Ponto isoelétrico representado no eixo x (pH) e peso molecular representado no eixo y (KDa). Animal 1 - a/b; Animal 2 - c/d; Animal 3 - e/f. O gel utilizado como referencia para as análises dos mapas está indicado pelo asterisco.

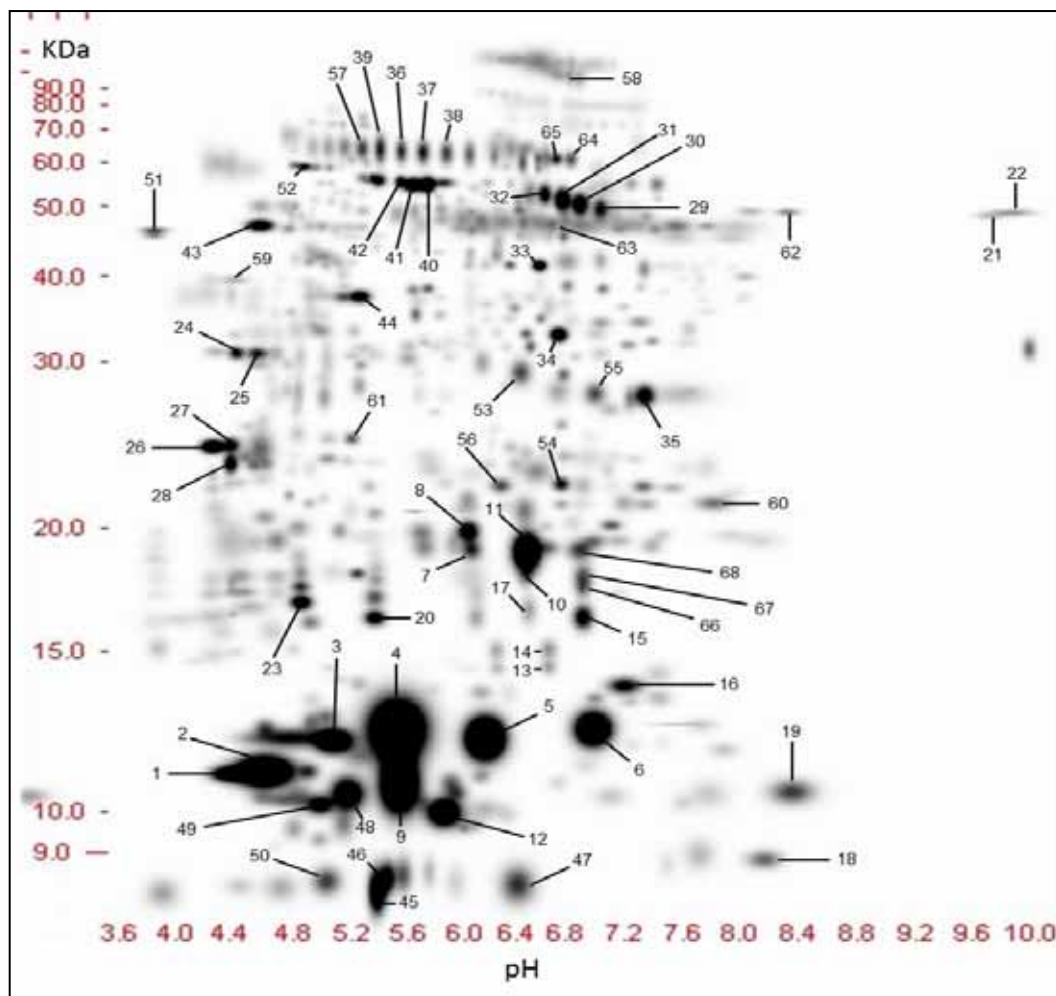


Figura 13. Gel Master do plasma seminal de *Mazama gouazoubira*. Peso molecular representado no eixo y (KDa) e ponto isoelétrico representado no eixo x (pH). Os números representam os spots identificados (Tabela 1).

Foram identificados 52 *spots* no plasma seminal de *M. gouazoubira*, revelando 41 proteínas (Tabela 1). As principais proteínas identificadas foram as espermadezinas (*Spermadhesin-1*) que representaram 8,56% da intensidade do gel, seguida das albuminas (3,4%), proteínas epididimárias (*Epididymal secretory protein E1*, *Epididymal-specific lipocalin-8* e *Epididymis-specific alpha-mannosidase*, *Epididymal secretory glutathione peroxidase*) com 2,86%, proteínas PS100 (PS100-A8, -A9 e -A12) com 2,49%, as proteínas ligadoras de ácido graxo representando (1,22%) e as beta-hexosaminidase com 1,21% da intensidade total dos *spots*. O restante das proteínas identificadas representa 7,55% da intensidade total dos *spots* identificados no gel Master.

Tabela 5. Proteínas identificadas, por espectrometria de massa ESI-Q Tof, a partir dos spots do gel SDS-PAGE do plasma seminal de *M. gouazoubira*. Os números dos spots referem-se àqueles definidos na Figura 2.

Proteína	KDa/pi	NCBI*	UniProtKB*	MS/MS	SC%
Spermadhesin-1-like isoform X1		594115517	P29392.1		
Spot 1	10,95/4,33			155	21%
Spot 2	11,03/4,57			147	21%
Spot 11	19,02/6,44			80	21%
Spot 50	8,32/4,98			112	21%
Epididymal secretory protein E1 precursor		27806881	P79345.1		
Spot 7	19,11/6			101	24%
Epididymal secretory protein E1		426233668	P79345.1		
Spot 13	14,4/6,6			209	32%
Spot 14	15,07/6,6			107	22%
Epididymis-specific alpha-mannosidase		297476071	Q28949.2		
Spot 58	114,55/6,6			523	11%
Epididymal secretory glutathione peroxidase precursor		392583910	O18994.1		
Spot 60	21,17/7,8			238	34%
Epididymal-specific lipocalin-8		296481974	Q6JVE9.1		
Spot 8	19,9/5,98			62	1%
Spot 10	18,01/6,43			63	1%
Spot 17	16,66/6,45			62	1%
Disulfide-isomerase		472370053	P09103.2		
Spot 43	47,87/4,55			573	24%
Prolyl 4-hydroxylase beta polypeptide		358009193	P21195.1		
Spot 43	47,87/4,55			449	20%
Ezrin		27806351	P31976.2		
Spot 65	62,91/6,66			210	7%
Actin, cytoplasmic 1/ Beta-actin		60389477	P84336.1		
Spot 44	38/5,2			620	50%
Dermcidin preproprotein		16751921	P81605.2		
Spot 68	19,09/6,87			68	10%
Lactoferrin		504	P24627.2		
Spot 21	49,4/9,7			69	2%
Spot 22	49,8/9,9			91	3%
PS100-A8		426216653	P28782.2		
Spot 45	8,11/5,33			132	26%
Spot 46	8,39/5,4			125	26%
PS100-A9		594055021	P28783.3		
Spot 12	9,92/5,81			83	23%
PS100-A12		594055023	P79105.3		
Spot 47	8,25/6,36			95	23%
Serum albumin		589958262	A6YF56.1		
Spot 3	11,93/5,02			90	2%
Albumin precursor		193085052	P14639.1		

Spot 40	55,81/5,69		631	20%
Spot 42	56,57/5,49		581	24%
Peroxiredoxin-6		149707887	O77834.3	
Spot 56	22/6,22		124	16%
Peroxi redoxin-6		27807167	O77834.3	
Spot 54	22,09/6,69		452	41%
Peroxiredoxin-1		6754976	P35700.1	
Spot 67	18,03/6,89		240	23%
Chain A, Crystal Structure Of A Mammalian 2-Cys Peroxiredoxin, Hbp23		6435547	Q63716.1	
Spot 68	19,09/6,87		70	10%
Thioredoxin		57164261	P50413.2	
Spot 49	10,12/4,93		200	45%
Clusterin		548476224	P17697.1	
Spot 24	31/4,4		135	6%
Clusterin preproprotein		27806907	P17697.1	
Spot 59	40,19/4,38		459	17%
Heat shock 70kDa protein 5 isoform 2		253982049	Q0VCX2.1	
Spot 52	60,7/4,82		719	28%
Alpha-2-macroglobulin precursor		157954061	Q7SIH1.2	
Spot 38	64,52/5,82		125	1%
T-complex protein 1 subunitzeta		77736031	Q3MHL7.3	
Spot 30	51,28/6,87		155	12%
Alpha-enolase isoform 1		426239774	Q9XSJ4.4	
Spot 33	42,03/6,53		776	34%
Beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein		270483766	P07686.3	
Spot 29	50,49/7,01		411	15%
Spot 30	51,28/6,87		439	16%
Spot 31	52/6,7		663	22%
Spot 32	53,36/6,57		465	15%
14-3-3 protein sigma		57163961	O77642.1	
Spot 26	24/4,2		716	51%
Spot 27	24,12/4,35		590	47%
14-3-3 protein zeta/delta		4507953	P63103.1	
Spot 28	23,12/4,35		577	46%
Annexin I		74	P46193.2	
Spot 34	33,1/6,68		899	45%
Spot 35	27,56/7,32		639	35%
Spot 55	27,72/6,98		631	30%
Polymeric immunoglobulin receptor		594038508	P81265.1	
Spot 37	64,88/5,66		156	3%
Spot 38	64,52/5,82		63	2%
Immunoglobulin gamma heavy chain constant region		126542085	P01870.1	
Spot 63	48,42/6,23		130	38%
Spot 63	48,33/6,41		130	38%
Spot 63	48,34/6,52		130	38%

Spot 63	48,11/6,62			130	38%
Spot 63	47,78/6,87			130	38%
Fatty acid-binding protein 4		166971606	A6YLM6.1		
Spot 48	10,41/5,12			417	56%
Biotinidase		426219576	A6QQ07.1		
Spot 36	65,24/5,5			107	4%
PKM2 protein		73587283	P14618.4		
Spot 62	49,96/8,32			609	25%
Malate dehydrogenase		77736203	Q3T145.3		
Spot 53	29,37/6,39			285	18%
Calreticulin		545920	P52193.2		
Spot 51	47,2/3,78			247	20%
Chloride intracellular channel protein 1		62751970	Q5E9B7.3		
Spot 61	24,53/5,15			281	29%

(*) Valores correspondentes ao número de acesso da proteína no banco NCBI - National Center for Biotechnology Information e UniProtKB Consortium. KDa/pI - Massa molecular/ponto isoelétrico do spot; MS/MS - Score da identificação dos espectros de massa; SC% - porcentagem das sequencias de peptídeos identificadas na proteína.

O perfil bidimensional de eletroforese do plasma seminal de *Mazama nemorivaga* revelou uma faixa de pesos moleculares de 9,45 KDa a 76 KDa e os pontos isoelétricos variando do pH 4,0 ao pH 8,0 para as proteínas (Figura 3). O programa PDQuest identificou 191 spots, no total dos 4 géis analisados e apenas 84 estão presentes em pelo menos 3 deles. No gel *Master* (Figura 4), o spot com a intensidade mais elevada representou 4,23% de todos os spots no gel. Dos 191 spots, 28 apresentaram expressão acima de 1%, totalizando 45,6% da intensidade total de spots. O principal grupo de spots observados no gel *Master* possuem peso molecular abaixo de 15KDa e as proteínas identificadas somaram 22,20% da intensidade total de spots no gel.

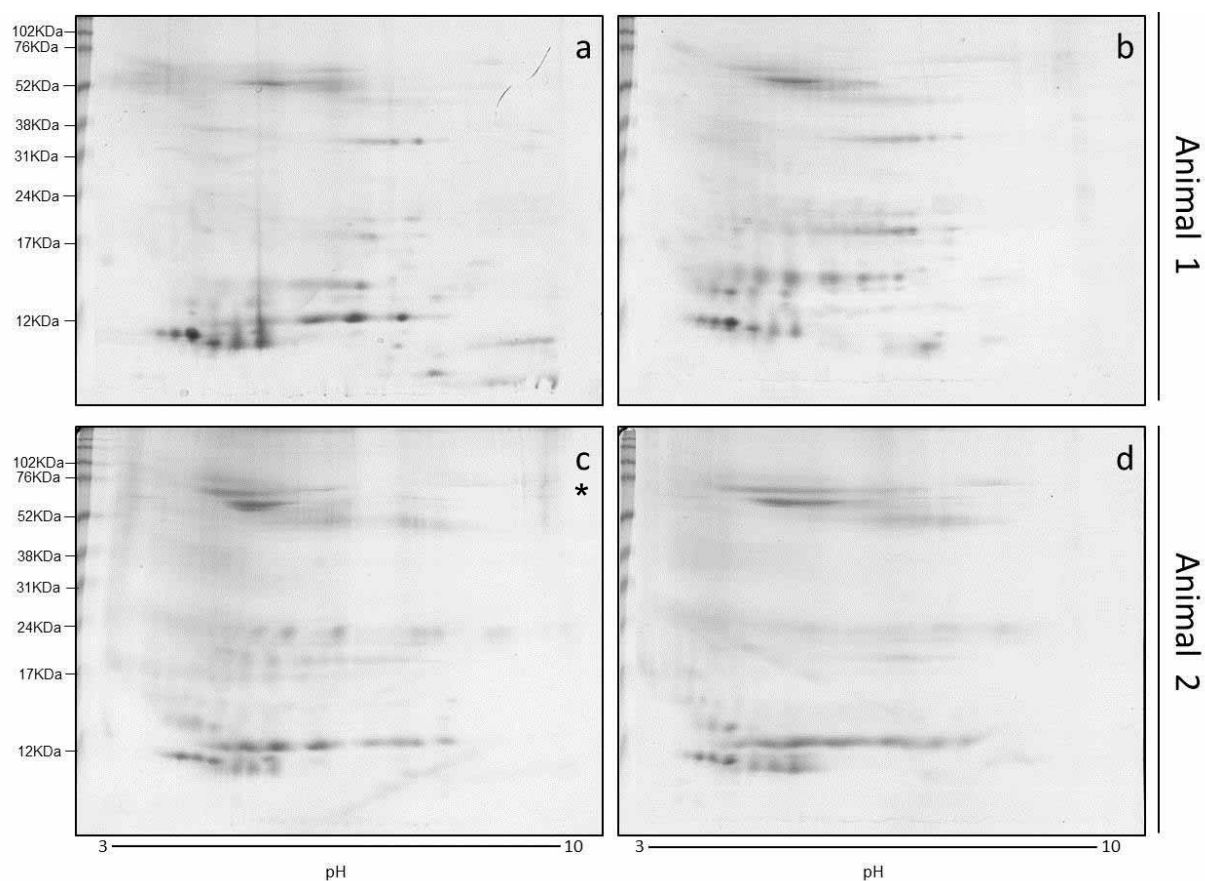


Figura 14. Géis bidimensionais da eletroforese SDS-PAGE do plasma seminal dos animais da espécie *Mazama nemorivaga*. Ponto isoelétrico representado no eixo x (pH) e peso molecular representado no eixo y (KDa). Animal 1 - a/b; Animal 2 - c/d. O gel utilizado como referencia para as análises dos mapas está indicado pelo asterisco.

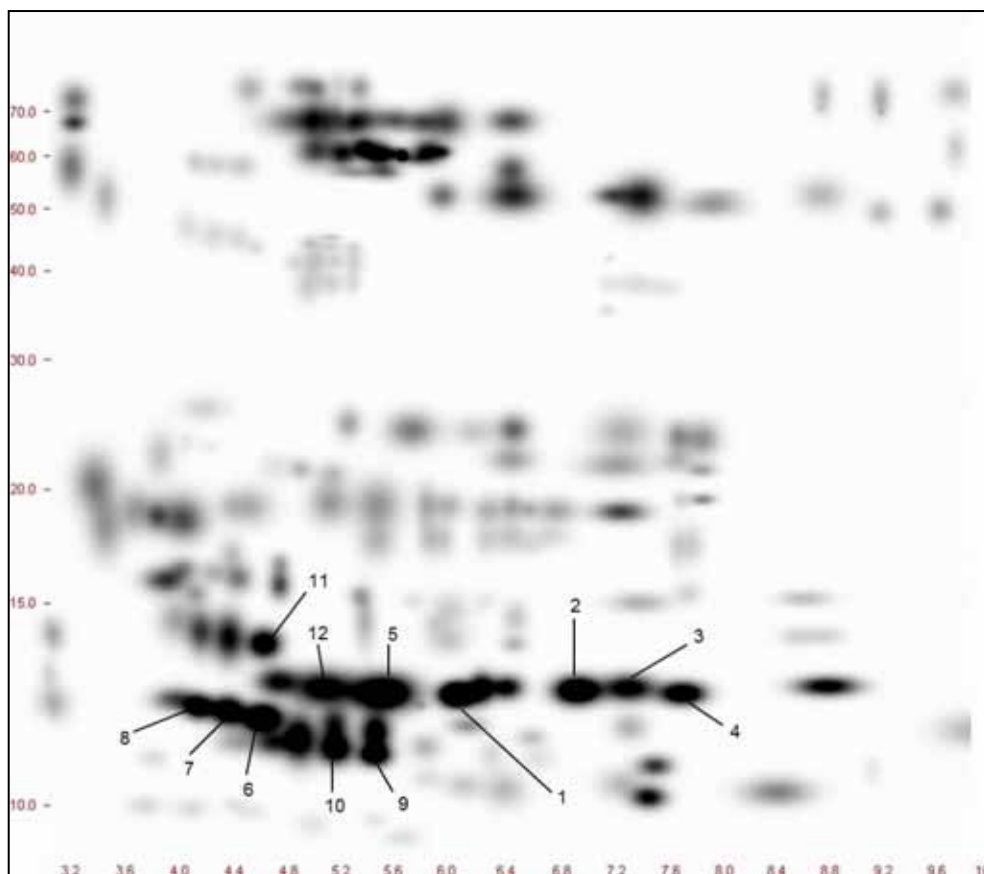


Figura 15. Gel Master do plasma seminal de *Mazama nemorivaga*. Peso molecular representado no eixo y (KDa) e ponto isoelétrico representado no eixo x (pH). Os números representam os spots identificados (Tabela 2).

No plasma seminal de *M. nemorivaga* foram identificados 9 *spots*, 16,74% da intensidade dos *spots* do gel, revelando 10 proteínas (Tabela 2). O grupo de proteínas que apresentou maior intensidade no gel foram as espermadezinas (*Spermadhesin-1-like*, *Bodhesin-2* e *Major seminal plasma glycoprotein PSP-I precursor*) com 12,09% da intensidade total dos *spots*. As outras proteínas identificadas representaram apenas 4,65% da intensidade dos *spots* no gel *Master*.

Tabela 6. Proteínas identificadas, por espectrometria de massa ESI-Q Tof, a partir dos spots do gel SDS-PAGE do plasma seminal de *M. nemorivaga*. Os números dos spots referem-se àqueles definidos na Figura 4.

Proteína	KDa/pl	UniProtKB *	NCBI *	MS/MS	SC%
Spermadhesin-1-like isoform X1		P29392.1	594115517		
spot 5	12.00/4.60			150	21
spot 6	12.16/4.34			156	21
spot 7	12.25/4.13			154	21
spot 9	11.28/5.18			84	8
Major seminal plasma glycoprotein PSP-I precursor		P35495.2	47523176		
spot 11	12.72/5.08			60	9
Bodhesin-2, partial		P26322.1	121484235		
spot 8	11.14/5.48			126	27
Alpha-S1-Casein		P02662.2	225632		
spot 3	12.59/7.77			85	10
spot 8	11.14/5.48			69	10
Alpha-S1-Casein precursor		P02661.1	32306545		
spot 4	12.61/5.55			95	4
Cathelicidin-1 precursor		P22226.2	27807341		
spot 11	12.72/5.08			85	13
NADH: Ubiquinone oxidoreductase, subunit G		Q46508.1	491180272		
spot 2	12.72/7.35			59	3
Dephospho-CoA kinase		Q8UJC4.1	493751317		
spot 4	12.61/5.55			68	4
Pentatricopeptide repeat-containing protein At5g09450		Q94B59.1	565459702		
spot 3	12.59/7.77			73	6
HTH-type transcriptional regulator AlsR		Q04778.1	587641913		
spot 4	12.61/5.55			69	3

(*) Valores correspondentes ao número de acesso da proteína no banco NCBI - *National Center for Biotechnology Information* e UniProtKB Consortium. KDa/pl - Massa molecular/ponto isoelétrico do spot; MS/MS - Score da identificação dos espectros de massa; SC% - porcentagem das sequências de peptídeos identificadas na proteína.

Categorização das Proteínas

Dos dados obtidos do Gene Ontology pelo programa STRAP, 95,98% das proteínas identificadas no plasma seminal de *M. gouazoubira* participam de algum processo biológico (Figura 5). Dessa porcentagem, 21,13% participam de processos de regulação, 19,20% de processos celulares, 11,12% realizam interação com outras células e organismos, 11,12% participam de resposta a estímulos, 10,11% de processos metabólicos, 8,9% atuam no processo de localização, 4,4% nos processos do sistema imune, 3,3% participam de processos de desenvolvimento e 6,6% atuam em processos não determinados pelo programa. Das funções moleculares exercidas pelas proteínas, 26,50% exercem função de ligação, 13,25% atuam em atividades catalíticas, 6,6% em atividades antioxidantes, 3,6% em atividade de regulação enzimática, 2,4% em atividades estruturais e 2,4% em outras funções moleculares não especificadas (Figura 6). A maioria das proteínas identificadas (22,20%) são extracelulares, 17,16% são citoplasmáticas, 14,13% pertencem a organelas citoplasmáticas, 11,10% fazem parte da membrana plasmática, 11,10% estão presentes no núcleo, 8,7% são componentes mitocondriais, 7,6% são componentes do citoesqueleto, 7,6 são encontradas no retículo endoplasmático, 3,3% estão presentes no cromossomo, 2,2% pertencem a complexos macromoleculares, 2,2% compõem peroxissomos e 5,5% estão presentes em outros componentes celulares não identificados pelo programa (Figura 7).

No plasma seminal de *M. nemorivaga*, 7% das proteínas identificadas participam de processos biológicos, sendo 2,33% relacionados a processos celulares e 4,67% relacionados a interações com outras células e organismos (Figura 5). As proteínas que exercem funções moleculares são representadas por 12,8% das proteínas onde, 4,36% exercem função de ligação, 2,18% executam atividade catalítica, 1,9% atividade antioxidante e 4,36% apresentaram outras funções não determinadas pelo programa (Figura 6). A maioria das proteínas identificadas são componentes extracelulares (6,75%), 1,13% são componentes citoplasmáticos e 1,13% são componentes mitocondriais (Figura 7).

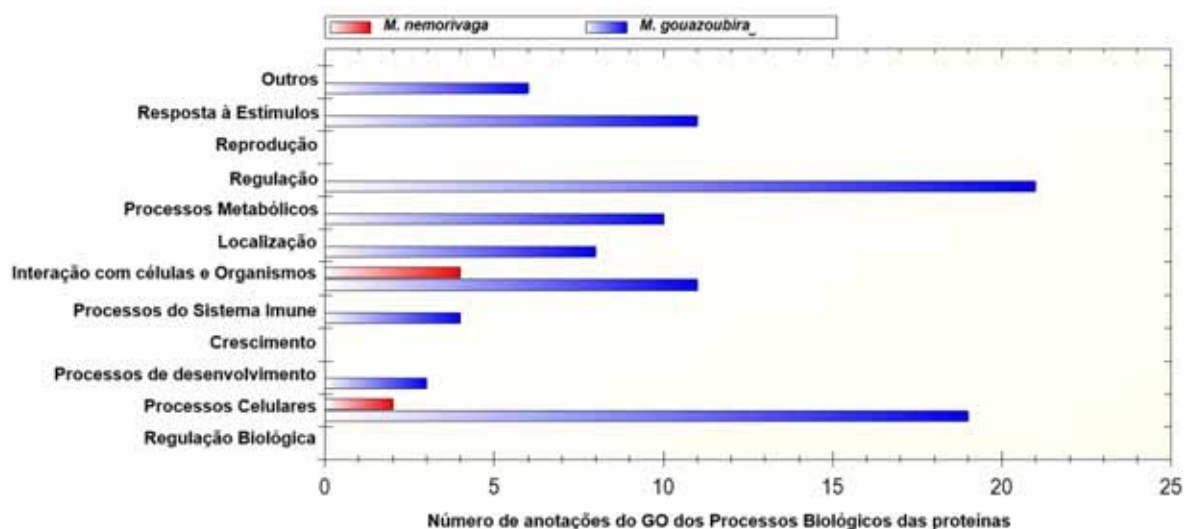


Figura 16. Gráfico gerado pelo software STRAP da comparação das anotações do Gene Ontology, dos Processos Biológicos, das proteínas presentes no plasma seminal de *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*.

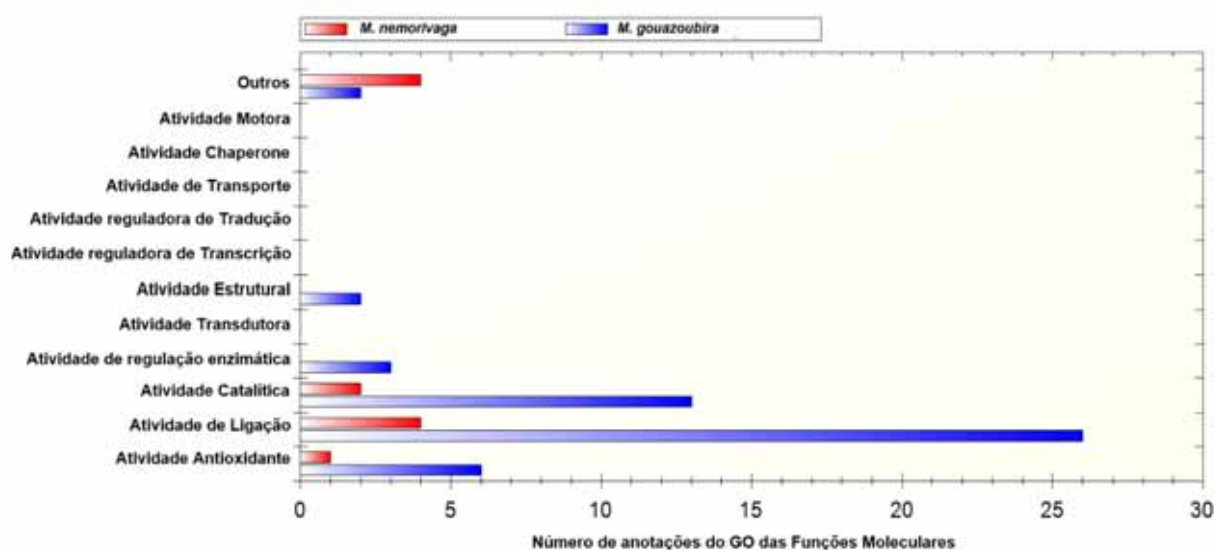


Figura 17. Gráfico gerado pelo software STRAP da comparação das anotações do Gene Ontology, das Funções Moleculares, das proteínas presentes no plasma seminal de *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*.

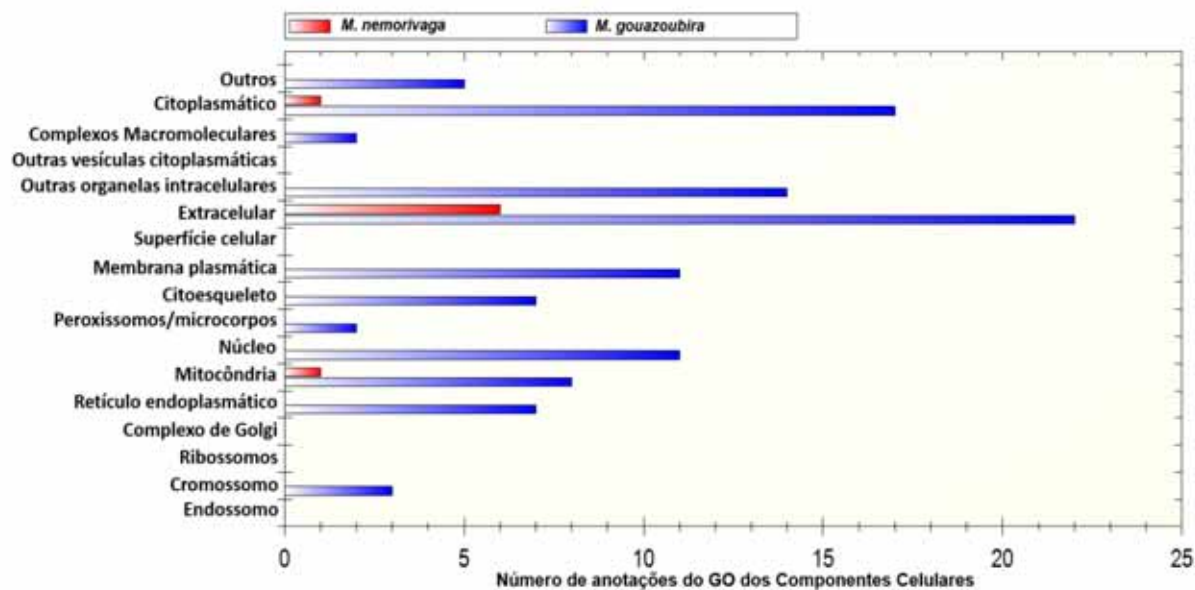


Figura 18. Gráfico gerado pelo software STRAP da comparação das anotações do Gene Ontology, dos Componentes Celulares, das proteínas presentes no plasma seminal de *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*.

Discussão

A maioria das proteínas presentes no plasma seminal das duas espécies apresentaram baixo peso molecular (<15KDa) e ponto isoelétrico entre pH 4 a 8. Mas, os géis *Masters* apresentaram perfis muito distintos, o que nos indica diferenças importantes na composição do plasma seminal de cada uma das espécies. Importante ressaltar que a colheita por eletroejaculação pode levar a um aumento das proteínas de baixo peso molecular que, segundo Ledesma et al. (2014), são representadas principalmente por proteínas antioxidantes. Porém, pelos resultados obtidos do Gene Ontology, a porcentagem de proteínas identificadas e relacionadas à esta atividade foi baixa tanto para *M. gouazoubira* quanto para *M. nemorivaga*. A principal atividade relacionada às proteínas foi a atividade de ligação seguida da atividade catalítica, para ambas as espécies. Provavelmente esse perfil de baixo peso molecular dos mapas proteicos se deva a presença das espermedesinas, a principal proteína no plasma seminal dos *Mazama* cinzas.

As proteínas da família espermedesina foram as que apresentaram maior intensidade no plasma seminal de *Mazama* cinza. A *spermadhesin-1* (SPADH-1) foi a única proteína identificada em comum no plasma seminal das duas espécies. As SPADH-1 são espermedesinas do plasma seminal bovino, possuem uma fraca ligação com o espermatozoide e exercem uma função de proteção ao estresse oxidativo (EINSPANIER et al., 1994; SCHÖNECK et al., 1996). Atua principalmente na inibição da motilidade e atividade metabólica, e redução da peroxidação lipídica, mantendo a viabilidade dos espermatozoides armazenados na ampola (SCHÖNECK et al., 1996).

Outras duas proteínas da família das espermedesinas, foram identificadas apenas no plasma seminal de *M. nemorivaga*: o precursor da proteína *Major seminal plasma glycoprotein* PSP-I (PSP-1) e a *Bodhesin-2* (Bdh). A subunidade PSP-1 faz parte do heterodímero PSP-I/PSP-II que é encontrado no plasma seminal de suínos e atua preservando a alta viabilidade, motilidade e atividade mitocondrial dos espermatozoides (CENTURION et al., 2003). As subunidades isoladas possuem diferentes características, a PSP-II possui uma forte ligação com as glicoproteínas da zona pelúcida (ZP) (CALVETE et al., 1995). Isolada, a PSP-I pode atuar na prevenção da reação prematura do acrossoma, mas sua principal função é atuar como imunossupressor, protegendo o espermatozoide de reações imunes no trato reprodutor feminino (KWOK et al., 1993; MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA; KORDAN, 2011; CABALLERO et al., 2012). As Bodesinas (Bdh) são espermedesinas do plasma seminal de bodes e possuem similaridade com as proteínas AWN, do plasma seminal de suínos, e HPS-7 de equinos (MELO et al., 2008). Apresentam alta capacidade de ligação ao espermatozoide e mesmo após a reação acrossômica se mantem ligada à peça intermediária e cauda (SOUZA et al., 2012). Seu principal papel seria de estabilização do acrossoma e atuar na interação entre espermatozoide e oviduto ou oócito (DRUART et al., 2013). Outra proteína identificada que também atua na reação acrossômica e interação entre espermatozoide e oócito é a α S1-caseína, também identificada apenas no plasma seminal de *M. nemorivaga*. Esta proteína possui a habilidade de estabilizar o cálcio livre presente em soluções e incorporá-lo em tecidos, atuando principalmente na indução da reação acrossômica e fusão entre espermatozoide e oócito (MORI et al., 1996; PATE et al., 2008).

Outras proteínas, diferentes das identificadas para *M. nemorivaga*, que também atuam na capacitação espermática e interação espermatozoide e oócito, foram identificadas para *M. gouazoubira*. Uma proteína muito importante na ligação espermatozoide oócito é a *prolyl 4-hydroxylase beta polypeptide* e suas subunidades *disulfide-isomerase* (PDI) (KIVIRIKKO; MYLLYHARJU, 1998). Estas proteínas estão presentes na superfície do espermatozoide e sua atividade induz mudanças na conformação de proteínas de fusão. A presença de atividade da PDI durante a reação acrossômica indica sua importância durante a fusão com o oócito (ELLERMAN; MYLES; PRIMAKOFF, 2006). Da mesma família, a *thioredoxin* também pode estar ligada a esta etapa da fertilização (ELLERMAN; MYLES; PRIMAKOFF, 2006). A *Ezrin*, juntamente com a *actin*, são importantes na manutenção da morfologia celular. *Ezrin* presente na membrana celular interage com a *actin* do citoesqueleto, mantendo a morfologia da célula. Ao ser ativada a *ezrin* induz a polimerização da *actin* e interage com outras proteínas presentes na membrana plasmática modificando seu estado, o que leva a capacitação do espermatozoide para reação acrossômica (HISCOX; JIANG 1999; WANG et al., 2010).

Foram identificadas diferentes proteínas que atuam como agente antimicrobiano no plasma seminal. Para *M. nemorivaga* identificamos o precursor da proteína *cathelicidin-1*. As catelicidinas formam uma família de peptídeo antimicrobiano presente em diversos tecidos e apresentam uma marcada diversificação espécie-específica dos genes da família, isso porque se adequam conforme a pressão da flora microbiana e do ambiente espécie-específico do patógeno (ZANETTI, 2005). No plasma seminal, fornece proteção contra microrganismos durante a fertilização (MALM, 2000). Seu gene CATH-1, foi descrito como não funcional em equinos (SCOCCHI et al., 1999). Para *M. gouazoubira* foi identificado a *Dermcidin*. Assim como as catelicidinas, atuam como proteínas antimicrobianas (DORUS; SKERGET; KARR, 2012). Esta proteína foi descrita na secreção das glândulas sudoríparas de humano (SCHITTEK et al., 2001), mas no plasma seminal podem atuar na defesa do espermatozoide durante a fertilização. Outra proteína foi a *Lactoferrin* que além de possuir ação antimicrobiana, também atua como antioxidantes (FARNAUD; EVANS, 2003).

As proteínas antioxidantes e chaperones só foram identificadas no plasma seminal de *M. gouazoubira*. As PS100 são conhecidas como proteínas ligadoras de cálcio (ZIMMER et al., 1995). As PS100A8, A9 e A12, identificadas atuam como antioxidantes (LIM et al., 2009), mas também possuem ação pró-inflamatória e aumentam sua concentração durante o envelhecimento da próstata (VOGL et al, 2012). Outras proteínas identificadas que atuam como antioxidantes são as albuminas, *peroxiredoxin* e *thioredoxin* (WAKABAYASHI et al., 1999; RHEE; CHAE; KIM, 2005; ROCHE et al., 2008). As chaperonas identificadas foram: *heat shock 70kDa*, *clusterin*, *alpha-2-macroglobulin* e *T-complex* (KUBOTA; HYNES; WILLISON, 1995; DABBS et al., 2013). Elas atuam na manutenção do estado estrutural, enovelamento, de proteínas que pode ser degradado por estresse térmico, oxidativo, ou por metais pesados (PANDHARE; DESHPANDE; 2004, DABBS et al., 2013), sendo então seu principal papel a manutenção de proteínas importantes para manutenção do espermatozoide e fertilização. Além disso, a *T-complex*, durante a capacitação espermática, pode ter um papel importante na interação espermatozoide-zona pelúcida através dos receptores ZP3 (DUN et al, 2011).

Algumas proteínas específicas do epidídimo foram identificadas apenas para *M. gouazoubira*, como a *Epididymal secretory protein E1* (NPC2), o precursor da *Epididymal secretory glutathione peroxidase*, a *Epididymis-specific alpha-mannosidase* e a *Epididymis-specific lipocalin-8*. A NPC2 atua como transportadora de colesterol entre membranas (KO et al., 2003). Esta proteína está ligada a diminuição de colesterol na membrana plasmática do espermatozoide durante a capacitação no epidídimo (OKAMURA et al., 1999). A *epididymal secretory glutathione peroxidase* é uma enzima com ação antioxidante, atuando na proteção contra a peroxidação lipídica no plasma seminal (BAUMBER; BALL, 2005; TAVILANI et al., 2008). A *Epididymis-specific lipocalin-8* foi identificada no epidídimo de camundongos e humanos, sugere-se que tenha um papel importante na maturação espermática, mas sua exata função ainda não foi descrita (FOUCHÉCOURT et al., 2003, AVRAM; COOPER, 2004; SUZUKI et al., 2004). A *Epididymis-specific alpha-mannosidase*, é uma enzima glicosidase, e além dela, foram identificadas outras duas no plasma seminal de *M. gouazoubira*, a *alpha-enolase* e a *beta-hexosaminidase*. Estas enzimas possuem um papel importante no momento da

fertilização atuando na interação espermatozoide-zona pelúcida (KAPUR; GUPTA, 1986; TULSIANI et al. 1989, MIRANDA et al., 2000). Também participam das modificações de glicoproteínas da superfície espermática durante a maturação no epidídimo (TULSIANI; COLEMAN; TOUSTER, 1988).

Outras proteínas identificadas apenas no plasma seminal de *M. gouazoubira* foram as proteínas de ligação de fosfopeptídio, *14-3-3 sigma* e *14-3-3 zeta/delta*, *annexin I*, *immunoglobulin gamma heavy chain* (IgG) e receptores poliméricos de imunoglobulina (*polymeric immunoglobulin receptor*). A família das proteínas 14-3-3 atuam na espermatogênese fazendo parte de interações proteína-proteína como plataforma reguladora, afetando e coordenando diversos eventos celulares da espermatogênese, podendo inclusive atuar na interface espermátide-célula de Sertoli (SUN et al., 2009). As anexinas (*annexin I*) são conhecidas por diversas funções como reguladoras de cálcio, ligadoras de fosfolípidios e ligadoras de membrana (RESCHER; GERKE, 2004). Já foram identificadas no plasma seminal de camindongos (OKABE et al., 1993) e no oviduto de bovinos, servindo como receptores de espermatozoides, e provavelmente as anexinas do plasma seminal são trocadas pelas anexinas do oviduto (IGNOTZ; CHO; SUAREZ, 2007). A presença de Imunoglobulinas, especificamente IgA e IgG são relacionadas com infertilidade em humanos (JAGER; KREMER; VAN SLOCHTEREN-DRAAISMA, 1978), principalmente quando em associação (JUNK et al., 1986). Isso ocorre porque as imunoglobulinas se ligam aos antígenos presentes na superfície do espermatozoide e impedem a reação acrossômica, inibindo a interação espermatozoide-oócito (BRONSON; COOPER; ROSENFELD, 1982; BANDO, 1992; FRANCAVILLA et al., 1997). O receptor polimérico de imunoglobulina é responsável pelo transporte de IgA, uma imunoglobulina polimérica, em mucosas (PHALIPON; CORTHÉSY, 2003). As imunoglobulinas IgA e IgG fazem parte do sistema imune do trato reprodutor, tanto masculino quanto feminino (MESTECKY; FULTZ, 1999).

Algumas proteínas internas à célula espermática foram identificadas tanto para *M. gouazoubira* (*fatty acid-binding*, *biotinidase*, *PKM2 protein*, *malate dehydrogenase*, *calreticulin*, *chloride intracellular channel*), quanto para *M. nemorivaga* (*Dephospho-CoA kinase*, *NADH: Ubiquinone oxidoreductase, subunit G*, *HTH-type transcriptional regulator AlsR* e *Pentatricopeptide repeat*).

containing protein At5g09450). Essas proteínas não são secretadas pelas glândulas anexas do trato reprodutivo masculino, testículo ou epidídimo, e provavelmente são resultados de lesões nas células espermáticas que podem ter ocorrido durante a centrifugação para separar os espermatozoides do fluido seminal.

Foi possível identificar e isolar poucos spots dos géis de *M. nemorivaga*, em relação ao do *M. gouazoubira*. Durante a fase de focalização foi possível observar uma resistência na corrida das proteínas nas fitas de pH, que apresentaram uma mancha vermelha junto a marcação do corante azul de bromofenol presente no tampão de hidratação. Isso provavelmente ocorreu devido a maior concentração de impurezas no plasma seminal de *M. nemorivaga*, no caso a presença da pigmentação avermelhada. Isso impossibilitou a focalização adequada de algumas proteínas, principalmente que ocorreram acima de 50 KDa. Novos protocolos devem ser testados para retirada da pigmentação avermelhada do plasma seminal.

Conclusão

Neste trabalho encontramos uma diferença muito grande na distribuição dos spots no mapa proteico e na identificação das proteínas entre *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*. Apesar da diferença do número de proteínas identificadas no plasma seminal das duas espécies, foi possível observar uma diferença do perfil de proteínas entre os *Mazama* cinza brasileiros. Além do perfil do gel Master ser completamente diferente, as proteínas identificadas foram distintas. Novos estudos devem ser realizados no plasma seminal de *M. nemorivaga* para melhorar a metodologia de extração do pigmento avermelhado e identificar novas proteínas, dessa forma esclarecer melhor as diferenças encontradas neste trabalho.

Referências

- AVRAM, C. E.; COOPER, T. G. Development of the caput epididymidis studied by expressed proteins (α glutamate transporter, a lipocalin and β -galactosidase) in the c-ros knockout and wild-type mice with prepubertally ligated efferent ducts. **Cell and Tissue Research**, Londres, v. 317, p. 23–34, 2004.
- BANDOH, R.; YAMANO, S.; KAMADA, M.; DAITOH, T.; AONO, T. Effect of sperm-immobilizing antibodies on the acrosome reaction of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 57, n. 2, p. 387-392, 1992.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutaselike activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 66, n. 8, p. 1415-1419, 2005.
- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 71, n. 4, p. 461-70, 2005.
- BHATIA, V. N.; PERLMAN, D. H.; COSTELLO, C. E.; MCCOMB, M. E. Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. **Analytical Chemistry**, Urbana, v. 81, p. 9819–23, 2009.
- BOISVERT, M.; BERGERON, A.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and Characterization of Gelatin-Binding Bison Seminal Vesicle Secretory Proteins. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 70, p. 656–661, 2004.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdã, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRONSON, R. A.; COOPER, G. W.; ROSENFELD, D. L. Sperm-specific isoantibodies and autoantibodies inhibit the binding of human sperm to the human zona pellucida. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 38, n. 6, p. 724-729, 1982.
- CABALLERO, I.; PARRILLA, I.; ALMINAÑA, C.; DEL OLMO, D.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E. A.; VÁZQUEZ, J. M. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 47, suppl. 3, p. 12–21, 2012.
- CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHÄFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAIDA, M.; TÖPFER-PETERSEN E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemical Journal**, Londres, v. 310, p. 615-622, 1995.
- CENTURION, F.; VAZQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J.; ROCA, J.; SANZ, L.; PARRILLA, I.; GARCIA, E. M.; MARTINEZ, E. A. Influence of Porcine

Spermadhesins on the Susceptibility of Boar Spermatozoa to High Dilution. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 69, p. 640–646, 2003.

CURSINO, M. S.; PERONI, E. F. C.; ROLA, L. D.; CHRISTOFOLETTI, M. D.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Análise comparativa preliminar do ejaculado de veados – cinza brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*). In: XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, Florianópolis, Santa Catarina, 2012. **Anais XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens 2012**, p. 102-105.

CUVIER, G. L. C. F. D. Dictionnaire des Sciences Naturelles. Zoologie. **Mammifères**. Paris, F.G. Levrault, v. 7, p. 1-534, 1817.

DABBS, R. A.; WYATT, A. R.; YERBURY, J. J.; ECROYD, H.; WILSON, M. R. Extracellular chaperones. In: JACKSON, S. (Ed.). **Molecular Chaperones**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2013, p. 241-268.

DORUS, S.; SKERGET, S.; KARR, T. L. Proteomic discovery of diverse immunity molecules in mammalian Spermatozoa. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, Nova Iorque, v. 58, p. 218–228, 2012.

DRUART, X.; RICKARD, J. P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P. L.; KERSHAW-YOUNG, C. M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; CROSSETT, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C. G.; GRAAF S. P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of Proteomics**, Leuven, v. 91, p. 13–22, 2013.

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

DUARTE, J. M. B. **Análise citogenética e taxonômica do gênero Mazama (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. 45f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Reprodução assistida em cervídeos brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1-2, p. 111-121, 1995.

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

DUN, M. D.; SMITH N. D.; BAKER M. A.; LIN, M.; AITKEN, R. J.; NIXON, B. The chaperonin containing TCP1 complex (CCT/TRiC) is involved in mediating sperm-oocyte interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 286, p. 36875-36887, 2011.

EINSPANIER, R.; KRAUSE, I.; CALVETE, J. J.; TIIFPER-PETERSEN, E.; KLOSTERMEYER, H.; KARG, H. Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. **FEBS**

Letters, Amsterdã, v. 344, p. 61-64, 1994.

ELLERMAN, D. A.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P. A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. **Developmental Cell**, Maryland Heights, v. 10, p. 831–837, 2006.

FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, Amsterdã, v. 40, p. 395–405, 2003.

FIGUEIREDO, M. G. **Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*)**. 2014. 68 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

FOUCHÉCOURT, S.; LAREYRE, J-J.; CHAURAND, P.; DAGUE, B. Y. B.; SUZUKI, K.; ONG, D. E.; OLSON, G. E.; MATUSIK, R. J.; CAPRIOLI, R. M.; ORGBIN-CRIST, M-C. Identification, immunolocalization, regulation, and postnatal development of the lipocalin EP17 (Epididymal Protein of 17 Kilodaltons) in the Mouse and Rat Epididymis. **Endocrinology**, Washington, v. 144, p. 887–900, 2003.

FRANCAVILLA, F.; ROMANO, R.; SANTUCCI, R.; MARRONE, V.; PROPERZI, G.; RUVOLO G. Interference of antisperm antibodies with the induction of the acrosome reaction by zona pellucida (ZP) and its relationship with the inhibition of ZP binding. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 67, n. 6, p. 1128-1133, 1997.

HARSHAN, H. M.; SANKAR, S.; SINGH L. P.; SINGH M. K.; SUDHARANI, S.; ANSARI, M. R.; SINGH S. K.; MAJUMDAR A. C.; JOSHI, P. Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã, v. 115, p. 306–311, 2009.

HISCOX, S.; JIANG, W. G. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v.112, p. 3081-3090, 1999.

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

IGNOTZ, G. G.; CHO, M. Y.; SUAREZ, S. S. Annexins Are Candidate Oviductal Receptors for Bovine Sperm Surface Proteins and Thus May Serve to Hold Bovine Sperm in the Oviductal Reservoir. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 77, n. 6, p. 906-913, 2007.

IUCN 2013. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded em 09 Dezembro de 2013.

JAGER, S.; KREMER, J.; VAN SLOCHTEREN-DRAAISMA, T. A simple method of screening for antisperm antibodies in the human male. Detection of

spermatozoal surface IgG with the direct mixed antiglobulin reaction carried out on untreated fresh human semen. **International journal of fertility**, Port Washington, v. 23, n. 1, p. 12-21, 1978.

JUNK, S. M.; MATSON, P. L.; YOVICH, J. M.; BOOTSMA, B.; YOVICH, J. L. The fertilization of human oocytes by spermatozoa from men with antispermatozoal antibodies in semen. **Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer**, Nova Iorque, v. 3, n. 6, p. 350-352, 1986.

KAPUR, D. K., GUPTA, G. S. Purification, biochemical properties and active sites of N-acetyl-fl-D-hexosaminidases from human seminal plasma. **Biochemical Journal**, Londres, v. 236, p. 103-109, 1986.

KERSHAW-YOUNG, C. M.; MAXWELL, W. M. C. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 47, suppl. 4, p. 369–375, 2012.

KIVIRIKKO, K. I.; MYLLYHARJU, J. Prolyl 4-Hydroxylases and their Protein Disulfide Isomerase Subunit. **Matrix Biology**, Amsterdã, v. 16, p. 357-368, 1998.

KO, D. C.; BINLEY, J.; SIDOW, A.; SCOTT, M. P. The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann–Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 5, p. 2518-2525, 2003.

KUBOTA, H.; HYNES, G.; WILLISON, K. The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1) Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. **European Journal of Biochemistry**, Hoboken, v. 230, p. 3-16, 1995.

KWOK, S.C.; SOARES, M. J.; MCMURTRY, J. P.; YUREWICZ, E. C. Binding characteristics and immunolocalization of porcine seminal protein, PSP-I. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 35, n. 3, p. 244-50, 1993.

LEDESMA, A.; MANES, J.; CESARI, A.; ALBERIO, R.; HOZBOR, F. electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in corriedale rams. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 49, p. 324–332, 2014.

LIM, S. Y.; RAFTERY, M. J.; GOYETTE, J.; HSU, K.; GECZY, C. L. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 86, p. 577–587, 2009.

MALM, J.; SORENSEN, O.; PERSSON, T.; FROHM-NILSSON, M.; JOHANSSON, B.; BJARTELL, A.; LILJA, H.; STÅHLE-BÄCKDAHL, M.; BORREGAARD, N.; EGESTEN, A. the human cationic antimicrobial protein (hcap-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. **Infection And Immunity**, Washington, v. 68, n. 7, p. 4297–4302, 2000.

MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I. A.; HAVT, A.; CUNHA, J. M. S.; MARTINS, D. B. G.; CASTELLETTI, C. H. M.; SOUZA, P. R. E. R.; FILHO, J. L. L.; FREITAS, V. J. F.; CAVADA, B. S.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. **Molecular Reproduction And Development**, Malden, v. 75, p. 8–16, 2008.

MERINO, M. L.; ROSSI, R. V. Origin, systematics, and morphology radiation. In: DUARTE, J. M. B. & GONZÁLES, S. (Ed.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. 1ª Edição, FUNEP, Jaboticabal, 2010. p. 2-11.

MESTECKY, J.; FULTZ, P. N. Mucosal Immune System of the Human Genital Tract. **The Journal of Infectious Diseases**, Arlington, v. 179, n. 3, p. 470–474, 1999.

MILLER DJ, AX RL. Seminal plasma: what is it and why is it important. In: **Proceedings of the 12th technical conference on artificial insemination and reproduction**, 8–9 April, Milwaukee, WI, 1988; p. 97-107.

MIRANDA, P. V.; GONZÁLES-ECHEVERRÍA, F.; BLAQUIER, J. A.; MAHURAN, D. J.; TEZÓN, J. G. Evidence for the participation of β -hexosaminidase in human sperm-zona pelúcida interaction *in vitro*. **Molecular Human Reproduction**, Grimbergen, v. 6, n. 8, p. 699-706, 2000.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; KORDAN, W. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn, v. 14, n. 3, p. 489-499, 2011.

MORI, T.; HIRAYAMA, M.; SUZUKI, K.; SHIMIZU, H.; NAGAI, T. Effect of casein phospho peptides and Ca^{2+} on penetration of boar spermatozoa into pig oocytes matured *in vitro*. **Biology Of Reproduction**, Madison, v. 55, p. 364-369, 1996.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A Comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã, v. 98, p. 169–188, 2007.

MOURA, A. A.; SOUZA, C. E.; STANLEY, B. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls, **Journal of Proteomics**, Leuven, v. 73, p. 2006–2020, 2010.

OKABE, M.; KISHI, Y.; YING, X.; KOHAMA, Y.; MIMURA, T.; LI, S. S. Characterization of capacitation inhibitory protein from rabbit seminal plasma: homology with human annexins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 6, n. 5, p. 4536, 1993.

OKAMURA, N.; KIUCHI, S.; TAMBA, M.; KASHIMA, T.; HIRAMOTO, S.; BABA, T.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J-L.; SUGITA, Y.; JIN, Y-Z. A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v. 1438, p. 377-387, 1999.

PANDHARE, J.; DESHPANDE, V. Both chaperone and isomerase functions of protein disulfide isomerase are essential for acceleration of the oxidative refolding and reactivation of dimeric alkaline protease inhibitor. **Protein Science**, Malden, v. 13, p. 2493–2501, 2004

PATE, B. J.; WHITE, K. L.; CHEN, D.; ASTON, K. I.; SESSIONS, B. R.; BUNCH, T. D.; WEIMER, B. C. A novel approach to identify bovine sperm membrane proteins that interact with receptors on the vitelline membrane of bovine oocytes. **Molecular Reproduction And Development**, Malden, v. 75, p. 641–649, 2008.

PERONI, E. F. C.; SALVIANO, M. B.; CURSINO, M. S.; CHRISTOFOLETTI, M. D.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. The surprisingly characteristics of the Amazonian Brown Brocket deer (*Mazama nemorivaga*) semen: the red semen. In: 7th International Deer Biology Congress, 2010, Huilo Huilo. **Advances and Challenges in Deer Biology**, 2010. p. 78-79.

PHALIPON, A.; CORTHÉSY, B. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. **TRENDS in Immunology**, Cambridge, v. 24, n. 2, p. 55- 58, 2003.

POIANI A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Heidelberg, v. 60, p. 289–310, 2006

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 117, p. 2631-2639, 2004.

RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, Amsterdã, v. 38, p. 1543–1552, 2005.

ROCHE, M.; RONDEAU, P.; SINGH, N. R.; TARNUS, E.; BOURDON, E. The antioxidant properties of serum albumin. **FEBS Letters**, Amsterdã, v. 582, p. 1783–1787, 2008.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1917 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. 2000. 189 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROSSI, R. V.; BODMER R.; DUARTE J. M. B.; TROVATI, R. G. Amazonian brown brocket deer *Mazama nemorivaga* (Cuvier 1817). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEA, S. (Ed.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of**

Latin American Deer. 1ª Edição, FUNEP, Jaboticabal, 2010, p. 202-210.

ROSSI, R. V.; DUARTE, J. M. B. *Mazama nemorivaga*. 2008, in: IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species.** Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 July 2011.

SANTOS, E. A. A.; SOUZA, P. C.; MARTINS J. A. M.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MORENO, F. B. M. B.; OLIVEIRA, M. F.; MOURA, A. A.; SILVA, A. R. Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Reproduction**, Londres, v. 147, n. 6, p. 753-764, 2014.

SCHITTEK, B.; HIPFEL, R.; SAUER, B.; BAUER, J.; KALBACHER, H.; STEVANOVIC, S.; SCHIRLE, M.; SCHROEDER, K.; BLIN, N.; MEIER, F.; RASSNER, G.; GARBE, C. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. **Nature Immunology**, Nova Iorque, v. 2, p. 1133-1137, 2001.

SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal plasma protein a SFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, Nova Iorque, v. 45, p. 633-642, 1996.

SCOCCHI, M.; BONTEMPOA, D.; BOSCOLOA, S.; TOMASINSIG, L.; GIULOTTO, E.; ZANETTI, M. Novel cathelicidins in horse leukocytes. **FEBS Letters**, Amsterdã, v. 457, p. 459-464, 1999.

SOUZA, C. E. A.; ARAÚJO, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; SOUZA, A. C. L.; NEIVA, J. N. M.; MOURA, A. A. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 45, p. 644–53, 2010.

SOUZA, C. E. A.; REGO, J. P. A.; LOBO, C. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; NOGUEIRA, F. C. S.; DOMONT, G. B.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F. C.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; FIGUEIREDO, J. R.; MOURA, A. A. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal Of Proteomics**, Leuven, v. 75, p. 4436–4456, 2012.

SUN, S.; WONG, E. W. P.; LI, M. W. M.; LEE, W. M.; CHENG, C. Y. 14-3-3 and its binding partners are regulators of protein–protein interactions during spermatogenesis **Journal of Endocrinology**, Bristol, v 202, n. 3, p. 327–336, 2009.

SUZUKI, K.; LAREYRE, J-J.; SÁNCHEZ, D.; GUTIERREZ, G.; ARAKI, Y.; MATUSIK, R. J.; ORGEBIN-CRIST, M-C. Molecular evolution of epididymal lipocalin genes localized on mouse chromosome 2. **Gene**, Amsterdã, v. 339, p. 49–59, 2004.

TAVILANI, H.; GOODARZI, M. T.; VAISI-RAYGANI, A.; SALIMI, S;

HASSANZADEH, T. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. **International Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p. 485-491, 2008.

TULSIANI, D. R. P., SKUDLAREK, M. D., ORGEBIN-CRIST M-C. Novel C -D-mannosidase of rat sperm plasma membranes: characterization and potential role in sperm-egg interactions. **The Journal of Cell Biology**, Nova Iorque, v. 109, p. 1257-1267, 1989

TULSIANI, D. R. P.; COLEMAN, V. D.; TOUSTER, O. Rat epididymal a-D-mannosidase: purification, carbohydrate composition, substrate specificity, and antibody production. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdã, v. 267, n. 1, p. 60-68, 1988.

VAN TILBURG, M. F.; RODRIGUES, M. A. M.; MOREIRA, R. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; CÂNDIDO, M. J. D.; MOURA, A. A. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, Nova Iorque, v. 79, p. 1247–1261, 2013.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, Londres, v. 1, p. 1-39, 2003.

Vogl, T.; Gharibyan, A. L.; Morozova-Roche, L. A. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, p. 2893-2917, 2012.

WAKABAYASHI, H.; MATSUMOTO, H.; HASHIMOTO, K.; TERAGUCHI, S.; TAKASE, M.; HAYASAWA, H. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, n. 5, p. 955-957, 1999.

WANG, L.; CHEN, W.; ZHAO, C.; HUO, R.; GUO, X-J.; LIN, M.; HUANG, X-Y.; MAO, Y-D.; ZHOU, Z-M.; SHA, J-H. The role of ezrin-associated protein network in human sperm capacitation. **Asian Journal of Andrology**, Shanghai, v. 12, p. 667–676, 2010.

ZANETTI, M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. **Current Issues In Molecular Biology**, Poole, v. 7, p. 179–196, 2005.

ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B.; POLEGATO, B. F.; GARCIA, J. M.; CANOLA, J.C. Assisted reproductive technology. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. (Ed.). **Neotropical cervidology: biology and medicine of latin american deer**. FUNEP, Jaboticabal, 2010, p. 255-270.

ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Comparison of three protocols for superovulation of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Zoo Biology**, Hoboken, v. 30, p. 1-14, 2011.

ZIMMER, D. B.; CORNWALL, E. H.; IANDAR, A.; SONG, WEI. The S100

protein family: history, function, and expression. **Brain Research Bulletin**,
Amsterdã, v. 37, n. 4, p. 417-429, 1995.

CAPÍTULO 4 – Considerações Finais

Conclusão Geral

Existem diferenças significativas nas características seminais dos Mazama cinza brasileiros. Foram encontradas as seguintes diferenças entre *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*:

- Diferenças nas características do ejaculado, coletado por eletroejaculação.
- Diferenças na morfometria espermática.
- Diferenças no perfil bi-dimencional das proteínas do plasma seminal.
- Diferenças entre as proteínas identificadas no plasma seminal.

Implicações

Estes resultados agregam ainda mais valor aos fortes indícios moleculares de que os *Mazama* cinza brasileiros devem ser separados em dois gêneros distintos.

Além de aumentar o conhecimento sobre biologia reprodutiva de cervídeos brasileiros, as características seminais descritas neste trabalho podem auxiliar a criação de novos protocolos de criopreservação de gametas ou elaboração de meios para fertilização *in vitro* específicos para cada uma das espécies.