

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E RESFRIAMENTO DE SÊMEN DE
TAMANDUÁS-BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*) DE VIDA LIVRE

CAMILA DO NASCIMENTO LUBA

Botucatu - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E RESFRIAMENTO DE SÊMEN DE
TAMANDUÁS-BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*) DE VIDA LIVRE

CAMILA DO NASCIMENTO LUBA

Dissertação apresentada junto
ao programa de pós-
graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título
de mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Botucatu - SP

2014

Nome do autor: Camila do Nascimento Luba

Título: **CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E RESFRIAMENTO DE SÊMEN DE TAMANDUÁS-BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*) DE VIDA LIVRE**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Assistente Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

Prof. PhD. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP, São Paulo-SP

Data da defesa: 29 de agosto de 2014.

AGRADECIMENTOS

Professor João Carlos Pinheiro Ferreira, obrigada pela oportunidade e por ter me recebido de braços abertos, ainda que com uma idéia ousada e inovadora, pelos ensinamentos, broncas, incentivos e por ter confiado em mim até o final.

Família: Obrigada pelo apoio financeiro, psicológico e emocional, por acreditarem sempre em mim, aceitarem a minha ausência e me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos sempre. Vocês são a base de tudo.

CERAN: Obrigada **Professor Frederico Ozanan Papa, Gabriel Monteiro, Yamê Fabres, Felipe Hartwig, Camila Dell'Aqua e Priscilla Guasti** pela forma como me receberam no laboratório, por me passarem o conhecimento de vocês e me ajudarem a planejar o experimento.

Projeto Tamanduá:

Flávia Miranda obrigada por me fornecer toda a estrutura para conseguir trabalhar a campo e por todos os ensinamentos sobre Xenarthras e conservação.

Alexandre Martins obrigada pela disposição, pelos mapas, pela força e incentivo a campo quando o cansaço era grande na procura pelos tamanduás.

Marcelo Gomes obrigada por todas as anestésias impecáveis, pela companhia e risadas, por dividir comigo seus ensinamentos e sua experiência de vida, e por me abrir as portas do Zoo de SBC.

Vinícius Gasparotto obrigada pelas corridas ninjas e tiros em movimento com a zarabatana, por ser o melhor ASCP que existe, sempre me socorrer e ouvir minhas lamentações, me colocando para cima com nossos ideais em comum.

Paola Stramandinoli e Carolina Lorieri pela amizade e ajuda a campo.

Mariana Catapani obrigada pela irmandade, doçura, e parceria emocional e profissional.

Além disso, obrigada **EQUIPE** por dispenderem do tempo de vocês, me ajudarem de coração sem receber nada em troca, largarem os empregos, madrugarem (ou não dormirem), e ainda sempre bem humorados e dispostos. Eu devo muito a vocês e serei grata o resto da vida.

PZMQB: Rodrigo Teixeira sempre disposto a ajudar no que é preciso, **Adauto Nunes, Cecília Pessuti, Alícia Hippólito e Henrique Riva** obrigada a todos pela confiança, oportunidade de realização dos pilotos, anestésias e necropsias concedidas.

CEMPAS: Professor Carlinhos, Lígia Rigoletto Oliva, Diogo Rossetti, Daniela Akemi, Mariana Martins, Gustavo Calasans obrigada por cada telefonema de tamanduá recebido, por abrirem o cempas a noite quando precisei, coletarem por mim quando estava ausente, perderem vários dias de almoço com meus exames, e por aguentarem meus surtos quando tudo não saía conforme o esperado.

POUSADA AGUAPÉ: Joana, André, Sr. João, Jaira, Fabiano, Rosalino, e todos os funcionários, obrigada por conceder o espaço para a base de campo, auxiliares e pela boa vontade e disposição em ajudar sempre.

Aos amigos: Taina Gonçalves, Daniel Capucho, Andressa Tucholski, Carla Queiróz, Mariane Boaretto, Babi Del Corso obrigada pela amizade, incentivo, por torcerem por mim, aguentarem meus surtos e choros, e me levantarem todas as vezes que pensei em desistir.

Caroline Destro obrigada por me ajudar com as colorações no laboratório de FIV.

Professora Fabiana Ferreira de Souza obrigada pelo incentivo e ajuda em todas as correções.

Professor Sony e José Dell'Aqua obrigada pela banca de qualificação, vocês foram essenciais para a elaboração desta dissertação.

Professora Fernanda da Cruz Landim obrigada por aceitar meu convite para a banca e pela ajuda com a microscopia eletrônica.

Professor Marcelo Guimarães obrigada por se colocar sempre a disposição em ajudar desde o início do projeto e por aceitar o convite para a banca. Sua sabedoria e experiência não poderiam faltar neste trabalho.

À **FAPESP** obrigada pelo auxílio financeiro.

E a **Deus** por ter colocado os tamanduás no meu caminho, por me fazer uma pessoa forte e determinada. Obrigada por não me abandonar nem por um minuto.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Mapa de distribuição da espécie <i>Myrmecophaga tridactyla</i>	7
Figura 2: Foto ilustrativa do pênis de um tamanduá-bandeira, demonstrando o sulco medial ventral e a ausência de testículos externos.	10

ARTIGO 1

Figura 1: Animal após receber dardo anestésico, localizado na musculatura do membro torácico esquerdo.....	22
Figura 2: Probe confeccionada para realização de eletroejaculação em tamanduás-bandeira	24
Figura 3: Aspecto microscópico dos espermatozoides de tamanduá-bandeira corados pelo método Karras-modificado sob aumento de 1000x.....	31
Figura 4: Aspecto microscópico do sêmen de <i>Myrmecophaga tridactyla</i> em aumento de 200x, contendo grânulos arredondados (setas pretas) e espermatozoides (setas vermelhas).....	33
Figura 5: Grânulos de lipídio (seta) evidenciados pela coloração <i>oil-red O</i> observados no ejaculado de tamanduás-bandeira em aumento de 6300x	34
Figura 6: Aspecto microscópico da célula espermática de tamanduá-bandeira apresentando os seus valores morfométricos médios $\pm$ erro padrão	35

ARTIGO 2

Figura 1: Morfologia ultraestrutural dos espermatozoides de tamanduá-bandeira. (A) Corte longitudinal da célula espermática - PL: Palmalena; ES: segmento equatorial; PA: região pós-acrossomal. (B) Corte transversal da	
--	--

cabeça espermática – AC: crista apical. (C) A: acrosoma; AC: crista apical; NU: núcleo espermático; IF: fossa de implantação; CAP: *capitulum*; PC: centríolo proximal; M: mitocôndria; MS: bainha mitocondrial; setas pretas: segmento equatorial; setas vermelhas: pontos difusos elétron-lucentes presentes no núcleo. (D) MP: peça intermediária; PP: peça principal; AN: *annulus*; MS: bainha mitocondrial. (E) NU: núcleo; OAM: membrana acrossomal externa; IAM: membrana acrossomal interna; PL: plasmalema; AC: crista apical; PA: região pós-acrossomal; setas pretas: segmento equatorial; setas vermelhas: pontos difusos elétron-lucentes presentes no núcleo. (F) corte transversal da cauda – AX: axonema; MS: bainha mitocondrial; ODF: fibra densa externa.... **53**

Figura 2: Anormalidades encontradas nas células espermáticas de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). (A) Seta preta: *Dag-defect* – é possível observar uma massa citoplasmática contendo diversos cortes do axonema; (B/C/D) seta preta: perda de microtúbulos em um dos lados do axonema; (E) seta preta: reação acrossomal prematura; (F/G) seta preta: destacamento do acrossoma..... **54**

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1: Valores individuais e médios ($\pm$ erro padrão) das características seminais de tamanduá-bandeira de vida livre **30**

Tabela 2: Classes morfológicas encontradas em espermatozoides do tamanduá-bandeira espessas em porcentagem, sob coloração com Karras-modificado e DIC, e média ($\pm$ erro padrão) das alterações encontradas para cada técnica **32**

Tabela 3: Valores representativos de motilidade e vigor após até 24 horas da solução espermática de cada animal após refrigeração à 5°C em Botuflex®... **36**

LISTA DE ANEXOS

Figura 1: Morfologia espermática sob coloração com Karras-modificado. a) célula espermática normal; b) cabeça piriforme e cauda abaxial; c) cabeça com contorno anormal; d) cabeça subdesenvolvida; e) Acrossomo lesado e gota citoplasmática proximal; f) defeito em peça intermediária; g) gota citoplasmática distal; h) cauda abaxial; i) cauda fortemente dobrada; j) cauda dobrada com gota citoplasmática..... **77**

Figura 2: Morfolgia espermática em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). a, b, c) células espermáticas normais; d) defeito de acrossomo e cauda dobrada; e) cauda dobrada com gota citoplasmática; f) gota citoplasmática proximal; g) gota citoplasmática distal; h) cauda abaxial; i) cauda enrolada..... **78**

Figura 3: Morfologia espermática em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). a) Defeito de acrossoma; b,c) Knobbed; d) cabeça subdesenvolvida; e) cabeça estreita na base; f) cabeça piriforme; g,h) vacúolos nucleares..... **79**

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CEMPAS	Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
DIC	Microscopia de contraste de interferência diferencial
EP	Erro Padrão
I.M.P.	Índice de integridade da membrana plasmática
IUCN	International Union for Conservation of Nature
MA1	Primeiro animal da espécie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> encontrado em Aquidauana
MA2	Segundo animal da espécie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> encontrado em Aquidauana
MA3	Terceiro animal da espécie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> encontrado em Aquidauana
MA4	Quarto animal da espécie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> encontrado em Aquidauana
MA5	Quinto animal da espécie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> encontrado em Aquidauana
MA6	Sexto animal da espécie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> encontrado em Aquidauana
MA7	Sétimo animal da espécie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> encontrado em Aquidauana

- MB1** Primeiro animal da espécie *Myrmecophaga tridactyla* apreendido em Botucatu
- M6** Momento após 6 horas de refrigeração do sêmen diluído
- M12** Momento após 12 horas de refrigeração do sêmen diluído
- M18** Momento após 18 horas de refrigeração do sêmen diluído
- M24** Momento após 24 horas de refrigeração do sêmen diluído

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
LISTA DE ABREVIações E SIGLAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	2
OBJETIVOS	5
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1. Taxonomia e características da espécie.....	6
2. Habitat e distribuição geográfica.....	7
3. Situação atual da espécie.....	7
4. Características Reprodutivas do tamanduá-bandeira.....	8
5. Características seminais da espécie	10
6. Colheita de sêmen.....	11
7. Análise subjetiva convencional da motilidade e vigor espermáticos	12
8. Avaliação da integridade de membrana plasmática e morfologia espermática ..	13
9. Microscopia eletrônica de transmissão.....	15
10. Refrigeração de sêmen.....	15
TRABALHOS CIENTÍFICOS	17
DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN DE TAMANDUÁS-BANDEIRA (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>) DE VIDA LIVRE	17
AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE TAMANDUÁS-BANDEIRA (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>) DE VIDA LIVRE	45
DISCUSSÃO GERAL.....	60
CONCLUSÕES GERAIS.....	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS.....	77
APÊNDICE	80
Normas dos trabalhos científicos	80

RESUMO

LUBA, C. N. **Características seminais e resfriamento de sêmen de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) de vida livre**. Botucatu, 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) é considerado vulnerável à extinção e dados científicos em relação à andrologia e características seminais são escassos. Colheu-se sêmen de oito animais com o intuito de estabelecer parâmetros seminais de tamanduás-bandeira de vida livre no que se refere a volume, odor, coloração, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática, e investigar o tempo em que o sêmen mantém-se com motilidade e vigor sob refrigeração à 5°C. A motilidade e vigor espermáticos foram avaliados de forma subjetiva por microscopia óptica convencional, e a análise morfológica dos espermatozoides foi realizada por microscopia de luz, microscopia de contraste e interferência diferencial e microscopia eletrônica de transmissão. O ejaculado foi caracterizado com duas frações distintas (fração esbranquiçada, leitosa e rica em células espermáticas, e fração gel, incolor e viscosa com ausência de espermatozoides) e volume médio 0,75 ml ($\pm 0,13$). Os valores médios dos parâmetros ($\pm$ erro padrão) encontrados nas amostras seminais à fresco foram motilidade 75% ($\pm 2,98$), vigor 3,21($\pm 0,29$), concentração $108,5 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 13,46$), índice de integridade de membrana plasmática de 71% ($\pm 4,01$), anormalidades espermáticas em coloração karras-modificado 35,5% ($\pm 3,38$) e 48,37% ($\pm 6,83$) em microscopia de contraste de interferência diferencial. Quando submetido a refrigeração o sêmen apresentou

motilidade e vigor até no máximo 24 horas, com valores decrescentes em ambos os parâmetros com o decorrer do tempo.

Palavras-chave: *in-situ*, eletroejaculação, reprodução, Myrmecophagidae, Pilosa, Xenarthra.

ABSTRACT

LUBA, C. N. **Seminal characteristics and cooling semen of *in situ* anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*)**. Botucatu, 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) is considered vulnerable to extinction and scientific data regarding andrology and seminal characteristics are scarce. The semen were collected from eight animals with the intention of seminal parameters to establish anteaters free life as regards the volume, odor, color, motility, vigor, concentration and morphology, and to investigate the time the semen remains with motility and vigor under refrigeration at a temperature of 5 ° C. The sperm motility and vigor were subjectively assessed by light microscopy and morphological analysis of sperm were performed by conventional optical microscopy, differential interference contrast microscopy and transmission electron microscopy. The ejaculate was characterized with two distinct fractions (fraction whitish, milky and rich in sperm cells, and gel fraction colorless and viscous with absence of sperm) and average volume 0.75 ml (± 0.13). The mean values of the parameters ($\pm$ standard error) found in the fresh semen samples motility were 75% (± 2.98), vigor 3.21 (± 0.29), concentration $\times 10^6/\text{ml}$ 108.5 (± 13.46), index of plasma membrane integrity of 71% (± 4.01) and sperm abnormalities in karras-modified staining 35.5% (± 3.38) and 48.37% (± 6.83) in contrast microscopy differential interference. When subjected to cooled semen presented motility and vigor up to 24 hours, with decreasing values in both parameters over time.

Keywords: *in-situ*, electroejaculation, reproduction, Myrmecophagidae, Pilosa, Xenarthra.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O Brasil representa uma importante reserva de biodiversidade de flora e fauna mundial, o que oferece muitas possibilidades de estudo e avanços científicos para o país, principalmente em relação a conservação de espécies. Dentre essas possibilidades, uma das áreas mais importantes é a reprodução de animais silvestres. Porém, para que se possa contribuir e utilizar biotecnologias da reprodução é necessário desenvolver pesquisas básicas sobre os mecanismos e estruturas envolvidos no processo reprodutivo de cada espécie (GUIMARÃES, 2008).

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) é o maior representante da família Myrmecophagidae, pertencente a ordem Pilosa e Superordem Xenarthra. A espécie é restrita às Américas Central e do Sul, sendo encontrado em todo o território brasileiro (MEDRI & MIRANDA, 2010) e considerada extinta no Uruguai (FALLABRINO & CASTIÑEIRA, 2006), Belize, Guatemala e Costa Rica. Considerando-se que as populações da espécie diminuíram cerca de 30% nos últimos 10 anos, a União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN) inclui esta espécie na categoria Vulnerável, ou seja, enfrenta um grande risco de extinção em médio prazo. Ainda assim, pouco se sabe sobre aspectos reprodutivos do tamanduá-bandeira, o que torna ainda mais difícil a utilização de algumas técnicas de reprodução assistida para auxiliar a conservação da espécie.

As principais ameaças ao tamanduá-bandeira são os incêndios, desmatamentos e atropelamentos (MEDRI & MIRANDA, 2010). Essa constante destruição de habitats representa um dos principais fatores para a diminuição

da biodiversidade. As perdas de grandes áreas naturais e a fragmentação de matas geram pequenas populações isoladas, o que pode acarretar em superlotação, aumento da endogamia, e aumento da susceptibilidade à doenças (LASLEY et al., 1994). Desta forma, a reprodução é fundamental para a conservação de espécies, populações e indiretamente à vitalidade de todos os ecossistemas (WILDT et al, 2003).

A fertilidade em animais do sexo masculino é o resultado de uma série de fatores que envolvem a capacidade do macho de produzir e ejacular gametas saudáveis (*potentia generandi*) e de realizar adequadamente a cópula (*potentia coeundi*). O recurso biotecnológico mais adequado para se inferir a *potentia generandi* é o exame andrológico. As etapas fundamentais deste exame são o exame físico geral do animal, associado a um exame rigoroso dos órgãos do sistema reprodutor masculino, seguido da colheita e avaliação seminal (CBRA, 1998).

Mendonça (2010) avaliou o sêmen de tamanduás-bandeira de cativeiro em zoológicos do estado de São Paulo e encontrou grande proporção de indivíduos com alterações seminais graves. Ao final do estudo o autor ressaltou a necessidade de serem estudadas características seminais de animais de vida livre, pois posto que, a qualidade espermática é resultado de fatores envolvendo a sanidade genética e a qualidade dos manejos ambiental, sanitário e nutricional, entre outros, só assim torna-se possível uma compreensão real das características espermáticas da espécie.

Assim, foi realizada a colheita de sêmen por eletroejaculação de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) de vida livre, com o objetivo de estabelecer as características do ejaculado por meio de microscopia de luz,

microscopia óptica com contraste de fase de interferência diferencial (DIC) e microscopia eletrônica de transmissão, e avaliar motilidade e vigor após refrigeração a 5°C.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Caracterizar o aspecto macroscópico como volume, cor, odor, aspecto e pH do sêmen de tamanduás-bandeira de vida livre.
- Determinar os parâmetros motilidade, vigor, concentração e integridade de membrana plasmática de amostras seminais da espécie.
- Estabelecer a morfologia espermática por meio de microscopia de luz e microscopia com contraste de fase de interferência diferencial (DIC).
- Analisar ultraestruturalmente as células espermáticas por meio de microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar motilidade e vigor das amostras seminais após diluição em meio Botucrio® e refrigeração a 5°C.

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1. Taxonomia e características da espécie

A superordem Xenarthra é dividida em duas ordens: Cingulata (Tatus) e Pilosa (Tamanduás e Preguiças). São mamíferos com características únicas como: articulações secundárias denominadas “xenarthrales” localizadas entre as vértebras lombares, ossos pélvicos fusionados, taxa metabólica baixa e temperatura corporal variável sendo em média de 33°C (VALDES e SOTO, 2011). A ordem Pilosa engloba a Subordem Vermilingua, e esta por sua vez a família Myrmecophagidae, formada por tamanduás (MACKENNAL & BELL, 1997).

Myrmecophaga tridactyla é o maior membro da família, pode medir até 2,1 m de comprimento e pesar até 45 kg (MEDRI et al., 2006). Muitas características anatômicas dos tamanduás refletem sua extrema especialização em uma dieta mirmecófaga, ou seja, baseada em formigas e cupins. Seus fortes membros anteriores são providos de grandes garras, que lhes permitem não só despedaçar formigueiros e cupinzeiros, como também se defender de predadores (SUPERINA, 2012).

Em vida livre os tamanduás-bandeira dormem em poços cavados no solo, geralmente abaixo de árvores ou arbustos, onde se enrolam e se cobrem com a cauda espessa se camuflando. Geralmente saem a noite a procura de alimento, sendo vistos durante o dia somente em regiões raramente habitadas e podendo ser encontrados em certos momentos do dia no mesmo local do dia anterior (SCHAUERTE, 2005).

2. Habitat e distribuição geográfica

O tamanduá-bandeira habita florestas tropicais úmidas, florestas secas, savanas e pradarias (MERITT, 2008). É encontrado na Colômbia, Equador, Venezuela, do Sul das Guianas até o Peru, Brasil, Bolívia e do Paraguai ao Norte da Argentina (GARDNER, 2007) (Figura 1).

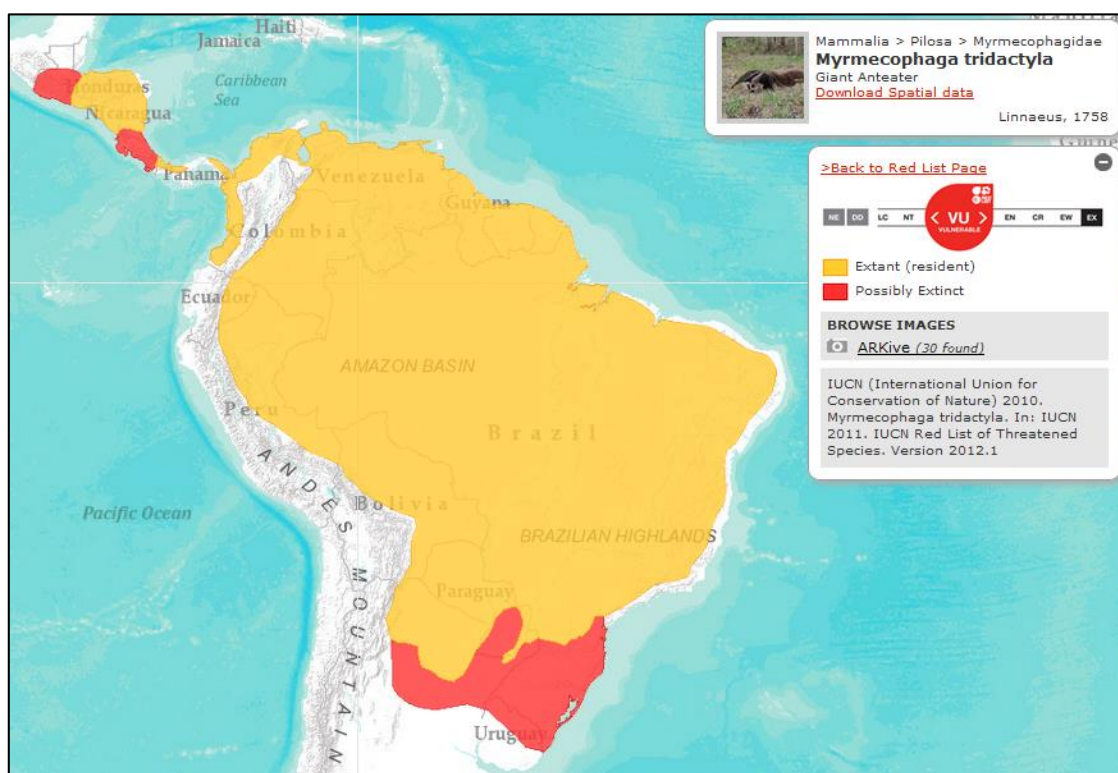


Figura 1: Mapa de distribuição da espécie *Myrmecophaga tridactyla* (IUCN, 2012).

3. Situação atual da espécie

O tamanduá-bandeira é considerado um dos mamíferos mais ameaçados do continente americano. A espécie é decretada extinta em Belize,

Guatemala, Costa Rica (MEDRI & MIRANDA, 2010) e Uruguai (FALLABRINO & CASTIÑEIRA, 2006). No Brasil já desapareceu no estado de Santa Catarina (CHEREM et al., 2004) e ainda é considerado criticamente em perigo de extinção no Rio Grande do Sul (FONTANA et al., 2003).

Devido à situação crítica, esta espécie é avaliada como “Vulnerável” pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) (MEDRI e MIRANDA, 2010) e listada no Apêndice II do CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) como uma espécie de alta probabilidade de extinção, a menos que suas ameaças sejam rigorosamente controladas (CITES, 2014).

Quando considerados os últimos 10 anos, nota-se que mais de 30% das populações de natureza diminuíram, devido a perdas de habitats e mortes causadas por incêndios e atropelamentos. Outros fatores importantes para o declínio destas populações *in-situ* são: dieta altamente específica, baixas taxas reprodutivas, e tamanho corporal avantajado (MEDRI & MIRANDA, 2010).

4. Características Reprodutivas do tamanduá-bandeira

O trato reprodutivo da fêmea de tamanduá-bandeira apresenta em torno 11 cm de vestíbulo vaginal, 10 cm de vagina e um útero simples piriforme de 4 cm de comprimento por 3 cm de largura (SCHAUERTE, 2005). As fêmeas são poliétricas não sazonais, os sinais de cio são pouco visíveis, podendo ser observada descarga vaginal sanguinolenta, a qual varia de um indivíduo para outro (BARTMANN, 1993; SCHRATTER, 2001). Patzl et al. (1998) avaliaram os perfis de estrógeno e progestágeno por meio de metabólitos fecais e observou

um ciclo estral com duração média de 51 dias, com fase folicular e luteal com cerca de 2 semanas cada uma, e um período médio de anestro de 3 semanas.

Segundo Bartmann (1983) a cópula ocorre por 3 dias consecutivos, com a fêmea em decúbito lateral e o macho sobre ela em decúbito esternal, pressionando-a contra o solo. A gestação dura cerca de 180 dias e geralmente nasce apenas um filhote (PATZL et al., 1998; SCHAUERTE, 2005). Em natureza os tamanduás vivem solitários, com exceção de pares em período de acasalamento e de mães que permanecem com os filhotes por aproximadamente seis meses (SHAW et al. 1987).

Os machos da espécie possuem um sulco grande e nítido no pênis na zona mediana ventral que termina em uma abertura prepucial de aproximadamente um centímetro de longitude (Figura 2). A constituição interna e externa do pênis permite apenas ereções brandas, sem introdução profunda no canal vaginal (BARTMANN, 1991).

Os testículos estão dentro da cavidade abdominal, expostos à temperatura corporal de aproximadamente 32 a 34°C, e a espermatogênese é ativa o ano todo (BARTMANN, 1991). Assim como o tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) (ROSSI et al., 2012), os tamanduás-bandeira possuem próstata, glândula vesicular e glândula bulbouretral, as quais estão diretamente envolvidas com o transporte da secreção espermática (BARTMANN, 1991).



Figura 2: Foto ilustrativa do pênis de um tamanduá-bandeira, demonstrando o sulco medial ventral e a ausência de testículos externos.

Não existem dados sobre longevidade, taxas de sobrevivência ou de reprodução de tamanduás selvagens, uma vez que não é possível determinar a idade de um indivíduo ao atingir o tamanho adulto (MEDRI & MIRANDA, 2010).

5. Características seminais da espécie

Até o presente momento, somente MENDONÇA (2010) relatou a colheita e avaliação de sêmen de tamanduás-bandeira. Realizou-se contenção química de 13 animais de cativeiro e obtenção do ejaculado utilizando eletroejaculação. O sêmen apresentou duas frações: a primeira translúcida de aspecto viscoso e sem presença de células espermáticas, e a segunda cremosa de coloração variando do branco ao marrom claro e rica em células

espermáticas. Observou-se ainda a presença de grânulos com aspecto circular em ambas as frações do ejaculado.

As características médias do ejaculado foram: volume de $1,3 \pm 0,86$ ml, pH de $7,44 \pm 0,6$, vigor espermático de $2,27 \pm 0,35$ e motilidade espermática de $33,18 \pm 20,14\%$, com grande dispersão entre os resultados de motilidade. A avaliação morfológica evidenciou maior incidência de defeitos maiores (cauda fortemente dobrada, defeito na peça intermediária e cauda dobrada com gota) do que de menores (cauda dobrada, cabeça isolada normal e abaxial). Por fim, os testes funcionais, as análises de integridade do acrossoma e de membrana plasmática apresentaram prevalência de acrossomas e membranas intactos, e bom potencial de mitocôndria para a maioria dos animais (MENDONÇA, 2010).

6. Colheita de sêmen

O volume e a composição do sêmen variam entre as espécies, sendo influenciados pelas características anatomofisiológicas do aparelho reprodutor masculino e feminino. Durante a evolução, fatores como volume, concentração e presença de gel, foram determinados mediante anatomia do útero, do pênis e do local onde o sêmen é depositado (MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

O procedimento de eletroejaculação baseia-se na indução da ejaculação através de estímulos elétricos na região da ampola retal do animal, com o auxílio de uma probe transretal com eletrodo conectado a uma fonte de estimulação elétrica (SILVA et al., 2004). Esse método é empregado com frequência em animais domésticos para avaliação andrológica e vem sendo utilizado com sucesso também em animais silvestres. Contudo, devido a

elevada sensibilidade desses animais à manipulação e para evitar o estresse e garantir a segurança dos animais e da equipe envolvida, o método é praticado sob contenção química (MORATO & BARNABE, 1998).

A anestesia representa o principal fator de risco no procedimento, tanto para a vida do animal mediante alterações nos parâmetros fisiológicos, como para o ejaculado (DURRANT, 1990), pois pode contaminar a amostra com urina, diminuir o volume seminal, ocasionar uma ejaculação retrógrada para a bexiga, além de planos anestésicos inadequados e ineficácia de algumas colheitas (QUEIROZ, 2003; TEBET, 2004). Entretanto, a eletroejaculação transretal tem sido utilizada com sucesso na obtenção de sêmen de diversos animais selvagens, como felinos, cervos, primatas não humanos e catetos (KAHWAGE, 2010; MORATTO et al, 1998; SILVA et al., 2004; TEBET, 2004) e é considerada o recurso mais seguro e apropriado para colher sêmen desses animais, devendo-se, contudo, estabelecer um protocolo para cada espécie e de acordo com a resposta de cada indivíduo (DURRANT, 1990).

7. Análise subjetiva convencional da motilidade e vigor espermáticos

Uma das principais características evolutivas de animais com fecundação interna é o desenvolvimento de uma célula germinativa móvel, capaz de se locomover em progressão no trato reprodutor feminino (FAWCETT, 1970). A eficácia no movimento progressivo representa um dos principais fatores determinantes para a fertilização (HOLT, 2000), sendo incontestável a associação entre infertilidade e ausência de motilidade espermática (OLDS-CLARKE, 1996).

Os parâmetros motilidade e vigor espermáticos são os mais empregados para determinar o estado fisiológico da célula e devem ser mensurados simultaneamente (SEAGER & FLETCHER, 1972). Usualmente a motilidade espermática é estimada de forma subjetiva através da avaliação visual das células sob microscopia de luz (CRESPILHO et al., 2006) determinando a percentagem de espermatozoides com movimentos progressivos na amostra (CBRA, 1998). Já o vigor espermático classifica de 0 a 5 a qualidade da motilidade observada nas células espermáticas (SILVA et al., 2003).

8. Avaliação da integridade de membrana plasmática e morfologia espermática

Já foi comprovada a relação existente entre morfologia espermática e a taxa de fertilização (FRENEAU et al., 2000; SAACKKE et al., 2000). A fim de avaliar as anormalidades morfológicas, Blom (1973) subdividiu os defeitos encontrados em primários e secundários. Paralelamente, Rao (1971) sugeriu uma classificação baseada nos prejuízos causados à fertilidade, dividindo os defeitos em maiores e menores. Posteriormente, os defeitos passaram a ser classificados como compensatórios e não compensatórios (SAACKKE et al., 1990). Desta forma, defeitos que envolvem motilidade e transporte no trato genital da fêmea e podem ser compensados com o aumento do número de células espermáticas, enquanto aqueles ligados às falhas na fecundação do ovócito e manutenção do desenvolvimento embrionário não podem ser compensados, pois uma quantidade maior de células não aumentaria a taxa fertilizante do animal (CHENOWETH, 2005).

As avaliações da morfologia espermática e/ou da integridade acrossomal podem ser realizadas através de sondas fluorescentes (KALLAJOKI et al., 1986; MORTIMER et al., 1987), esfregaços corados (DIDION et al., 1989; TALBOT & CHACON, 1981; PAPA et al., 1988) ou preparações úmidas (SAACKE & MARSHALL, 1968; PURSEL et al., 1972).

Esfregaços corados com eosina têm sido utilizados com eficácia para avaliar a integridade de membrana das células espermáticas. A eosina é um corante supra vital que penetra somente em células com a membrana plasmática lesada, ligando-se aos ácidos nucléicos e conferindo uma coloração rosa ao espermatozoide (BRITO et al., 2003). A coloração pelo método Karras-modificado sugerido por PAPA et al. (1988), consiste na utilização de três corantes: Rosa Bengala, Tanino e Azul Vitória e tem sido muito utilizado com sucesso no que diz respeito à coloração da célula espermática, inclusive acrossomo.

A técnica de preparação úmida, na qual os espermatozoides não são corados, deve ser realizada utilizando-se microscopia capaz de destacar os contornos celulares, como microscopia de contraste de fase ou microscopia de contraste de interferência diferencial - DIC (JOHNSON et al., 1997; CELEGHINI, 2005). A metodologia com lâmina úmida em microscopia de contraste de interferência diferencial deve ser priorizada pela melhor observação dos defeitos espermáticos, uma vez que esfregaços corados apresentam mais artefatos de técnica aumentando os defeitos de cauda, peça intermediária e cabeça isolada. Adicionalmente, lâminas coradas exibem uma diminuição da observação de alguns defeitos maiores como alterações de acrossoma, vacúolos e gotas citoplasmáticas (FRENEAU et al., 2010).

9. Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão tem sido muito utilizada para avaliação ultraestrutural dos espermatozoides de diversas espécies animais. Baseada na interação de elétrons incidentes sobre a matéria a técnica determina o tamanho e a forma de estruturas inorgânicas e biológicas (SILVA et al., 2009). Quando se pretende avaliar a morfologia e defeitos de células espermáticas em escala nanométrica (nm) há a necessidade do uso da microscopia eletrônica, pois ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação (JOSHI et al., 2001).

10. Refrigeração de sêmen

A refrigeração do sêmen permite estocar e preservar o material genético de um animal por um período prolongado de tempo. Esta biotecnologia tem sido amplamente utilizada por criadores de animais domésticos (CARDOSO et al., 2002). As baixas temperaturas diminuem as taxas metabólicas do espermatozoide e prolongam sua longevidade (WATSON, 1995) devido às características da membrana plasmática das células espermáticas que nestas condições mantém menor mobilidade dos lipídios da dupla membrana, os quais se solidificam, impedindo que estes e proteínas celulares se alterem, o que mantém a estrutura da membrana celular (SÁNCHEZ, 2003).

Para uma refrigeração adequada do sêmen é necessário o uso de diluidores que garantam a sobrevivência dos espermatozoides em baixas temperaturas. Assim, após diluição, a queda da temperatura deve ser gradativa até manter-se a solução seminal entre 4 e 6°C (HAFEZ & HAFEZ, 2003). FELDMAN & NELSON (1996) afirmam que o sêmen de espécies domésticas quando adequadamente diluído e refrigerado, podem manter-se viáveis por até cinco dias.

O sistema de refrigeração de sêmen passivo tem sido o mais utilizado em animais domésticos devido ao menor preço e maior facilidade prática a campo (VALLE et al., 1999). Este método é desenvolvido em contêineres que garantem taxas lentas de refrigeração em torno de 0,05°C/min (BRINSKO et al., 2000) e mantêm a temperatura em média de 5°C (VARNER et al., 1998). O *Equitainer* foi o primeiro contêiner fabricado para resfriar sêmen equino e garante que tais taxas de refrigeração e temperatura final sejam adequadas (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984). AVANZI et al. (2006) compararam outros sistemas passivos com o *Equitainer*, como Botutainer e Botubox, e afirmam não existir diferenças entre os contêineres quando mantidos a temperatura ambiente de cerca de 24°C.

O uso destas caixas isotérmicas para o envio de amostra de sêmen entre regiões distantes permite uma melhor programação para o destino das amostras e evita a perda do material (MOTA-FILHO et al., 2007). O sistema Botuflex tem sido muito utilizado para resfriamento de sêmen equino, mantendo a temperatura de 5°C por um período máximo de 48 horas com eficácia, quando armazenado um volume total de 150 a 200 ml de solução espermática (PAPA et al., 2011).

TRABALHOS CIENTÍFICOS

**DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E REFRIGERAÇÃO
DE SÊMEN DE TAMANDUÁS-BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*) DE
VIDA LIVRE**

Camila do Nascimento Luba^{a,b} - camilaluba@gmail.com

Flávia Regina Miranda^b - flavia@tamandua.org

Alexandre Martins Costa Lopes^b - alemclzoo@hotmail.com

Marcelo da Silva Gomes^b - zoosbc.marcelo@gmail.com

Frederico Ozanan Papa^a - papa@fmvz.unesp.br

João Carlos Pinheiro Ferreira^a - jcferreira@fmvz.unesp.br

^a Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil. Endereço: Rubião Junior, s/n CEP: 18.618-000.

^b Instituto de Pesquisa e Conservação de Tamanduás no Brasil – Projeto Tamanduá. Endereço: Rua Pastor Carlos Frank, 458. Boqueirão, Curitiba, Paraná, Brasil. Cep: 81.730-340.

Autor correspondente:

João Carlos Pinheiro Ferreira - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP. Distrito de Rubião Junior, s/n Botucatu-São Paulo, Brasil. Cep: 18.618-970. jcferreira@fmvz.unesp.br.

RESUMO

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) é considerado vulnerável à extinção e dados científicos em relação aos parâmetros reprodutivos da espécie são escassos. Colheu-se sêmen de oito tamanduás-bandeira de vida livre com o intuito de estabelecer parâmetros de amostras seminais relacionados ao volume, odor, coloração, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática, e investigar o tempo em que o sêmen mantém-se com motilidade e vigor quando submetido à refrigeração à 5°C. A motilidade e vigor espermáticos foram avaliados de forma subjetiva, e a avaliação de morfologia espermática foi realizada por microscopia óptica convencional e microscopia de contraste e interferência diferencial. O ejaculado apresentou duas frações distintas sequenciais: fração esbranquiçada - leitosa e rica em células espermáticas, e fração gel - incolor, viscosa e azoospermica). Os valores médios ($\pm$ erro padrão) das características seminais foram: volume da primeira fração 0,75 ($\pm 0,1$) mL, motilidade 75 ($\pm 2,9$) %, vigor 3,2 ($\pm 0,3$), concentração 108,5 $\times 10^6$ /ml ($\pm 13,4$), índice de integridade de membrana plasmática de 71% ($\pm 4,0$), alterações espermáticas em coloração karras-modificado 35,5% ($\pm 3,3$) e 48,3% ($\pm 6,8$) em microscopia de contraste de interferência diferencial. Quando diluído em Botucurio® e refrigerado, o sêmen apresentou motilidade e vigor por no máximo 24 horas, com valores decrescentes em ambos os parâmetros no decorrer do tempo.

Palavras-chave: *in-situ*, eletroejaculação, reprodução, Xenarthra, Pilosa, Myrmecophagidae

ABSTRACT

The giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) is considered vulnerable to extinction. Scientific data in relation to species reproductive parameters are scarce. Semen from eight free-living giant anteaters was collected to establish parameters from seminal samples related to volume, odor, color, motility, vigor, concentration and spermatid morphology. Also, the period that the semen maintains motility and vigor when submitted to 5°C refrigeration was investigated. Motility and spermatid vigor were evaluated subjectively. Evaluation of spermatid morphology was performed with conventional optical microscopy, contrast microscopy and differential interference contrast microscopy. The ejaculate presented two distinct sequential fractions: a whitish fraction-milky and rich in sperm cells, and a gel fraction-colorless, viscous and azospermic. Mean values ($\pm$ SEM) of seminal characteristics were: volume of first fraction 0.75 ($\pm$ 0.1) mL, motility 75 ($\pm$ 2.9) %, vigor 3.2 ($\pm$ 0.3), concentration 108.5 $\times 10^6$ /mL ($\pm$ 13.4), plasma membrane integrity index of 71% ($\pm$ 4.0), spermatid alterations with the modified Karras staining 35.5% ($\pm$ 3.3) and 48.3% ($\pm$ 6.8) in differential interference contrast microscopy. When diluted in Botucurio[®] and refrigerated, the semen maintained motility and vigor for a maximum of 24 hours, with decreasing values in both parameters over time.

Keywords: *in-situ*, electroejaculation, reproduction, Myrmecophagidae, Pilosa, Xenarthra.

1. INTRODUÇÃO

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) é o maior representante da família Myrmecophagidae, pertencente a ordem Pilosa e Superordem Xenarthra. A espécie é restrita às Américas Central e do Sul, sendo encontrado em todo o território brasileiro [1] e considerada extinta no Uruguai [2], Belize, Guatemala e Costa Rica. Considerando-se que as populações da espécie diminuíram cerca de 30% nos últimos 10 anos, a União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN) inclui esta espécie na categoria Vulnerável, ou seja, enfrenta um grande risco de extinção em médio prazo [1]. Sabe-se que a espécie não possui sazonalidade, tem hábito solitário, gestação de 180 dias e que origina somente um filhote, o qual permanece com a mãe por cerca de seis meses. Porém, pouco se conhece sobre mais aspectos reprodutivos do tamanduá-bandeira, o que torna difícil a utilização de técnicas de reprodução assistida para auxiliar na conservação da espécie.

As principais ameaças ao tamanduá-bandeira são atropelamentos, incêndios e desmatamentos [1]. As perdas de grandes áreas naturais e a fragmentação de matas representa um dos principais fatores para a diminuição da biodiversidade, pois geram pequenas populações isoladas, o que pode acarretar em superlotação, aumento da endogamia, e aumento da susceptibilidade à doenças [3]. Desta forma, a reprodução é fundamental para a conservação de espécies, populações e indiretamente à vitalidade de todos os ecossistemas [4].

Mendonça [5] avaliou o sêmen de tamanduás-bandeira de cativeiro e encontrou grande proporção de indivíduos com alterações seminais graves. Ao

final do estudo o autor ressalta a necessidade de se estudar características seminais de animais de vida livre, pois uma vez que a qualidade espermática é resultado de fatores que envolvem manejos ambiental, sanitário e nutricional adequados, entre outros, somente assim torna-se possível compreender as reais características espermáticas de uma espécie.

O objetivo do presente estudo foi estabelecer características do sêmen fresco de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) de vida livre como volume, odor, coloração, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática, assim como avaliar motilidade e vigor do sêmen após refrigeração a 5° C durante 24 horas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e Local de Captura

Foi colhido sêmen por eletroejaculação de oito tamanduás-bandeira adultos de vida livre. Destes, um animal foi apreendido em área urbana da cidade de Botucatu (22°53'09"/48°26'42"), passou por triagem no CEMPAS (Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens – Universidade Estadual de São Paulo) e após colheita de sêmen foi liberado em natureza. Os outros sete tamanduás foram capturados na fazenda São José, região de Aquidauana, no estado brasileiro de Mato Grosso do Sul (20°05'43.46"S/55°57'53.25") em quatro expedições de sete dias cada, nos meses de outubro de 2012, abril, julho e novembro de 2013, considerando-se que os animais não são sazonais.

As capturas foram realizadas por busca ativa, com procura e avistamento do animal, sem uso de armadilhas. O local selecionado apresentava vegetação característica de cerrado, que atua como facilitador em capturas de animais desta espécie por propiciar melhor visualização dos espécimes e poucas áreas de fuga. A procura dos animais foi realizada ao amanhecer e ao anoitecer, devido ao hábito vespertino/noturno da espécie. Uma vez encontrado, estimou-se visualmente o peso do animal e este foi cercado e contido quimicamente com dardo anestésico e zarabatana (Figura 1).

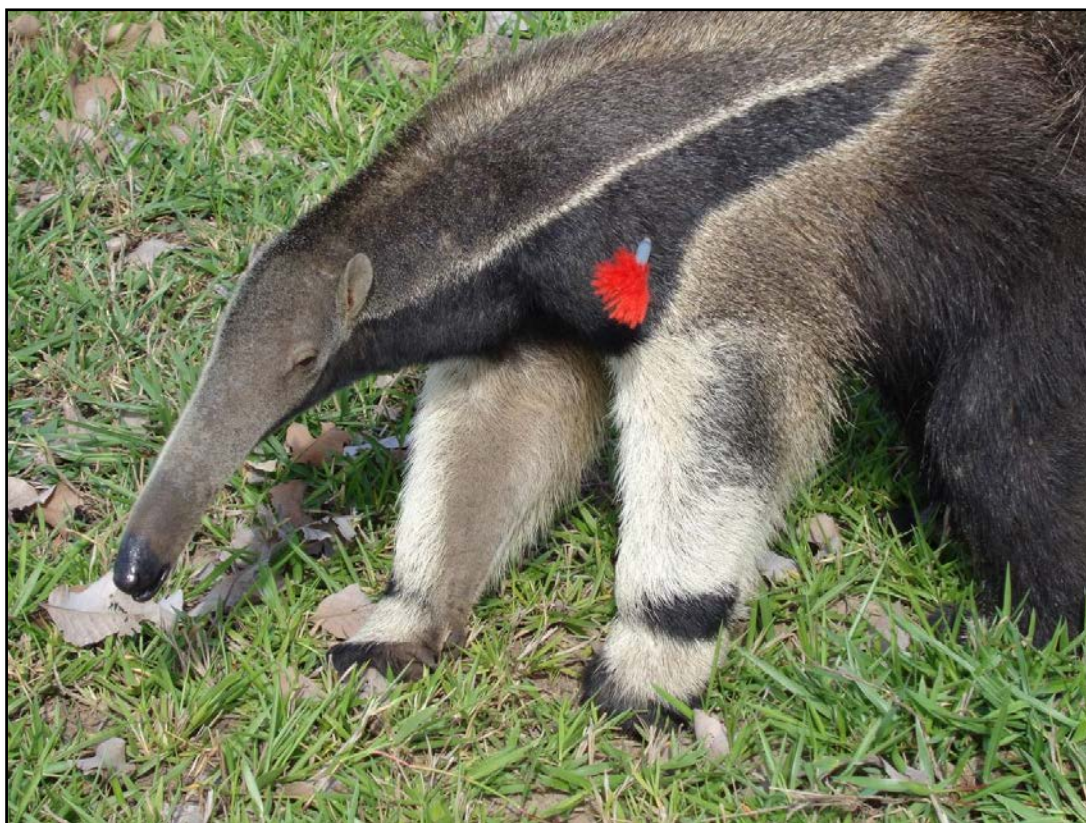


Figura 1: Animal após receber dardo anestésico, localizado na musculatura do membro torácico esquerdo.

O protocolo utilizado para anestesiá-los os animais foi a associação de 8,0 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Cetamina, Syntec®, Cotia, estado de São Paulo, Brasil), 0,5 mg/kg de midazolam (Dormire®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA., São Paulo, Brasil) e 0,5 mg/kg de cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec®, Cotia, estado de São Paulo, Brasil).

Todos os animais capturados foram marcados individualmente com implantação de *microchip* subcutâneo em região dorsal. Os indivíduos utilizados no experimento foram identificados com a primeira letra do gênero *Myrmecophaga* seguida da letra inicial da cidade onde foram encontrados, utilizando-se MB1 (tamanduá encontrado em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil), MA1, MA2, MA3, MA4, MA5, MA6 e MA7 (animais capturados em Aquidauana, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil).

2.2. Colheita de sêmen

Após contenção química foi realizada tricotomia e lavagem com solução de 0,9% de NaCl da área genital. Utilizou-se um aparelho de eletroestimulação (Eletrojet Premium, Eletrovet®, Eletrovet LTDA, Valinhos, estado de São Paulo, Brasil) e uma probe com 1,3 cm de diâmetro, 17 cm de comprimento e dois eletrodos com 7 cm de extensão (Figura 2). A probe foi lubrificada com carboximetil celulose, cerca de 16 cm da sua extensão total foi introduzida no reto, sendo assim posicionada sobre as glândulas sexuais acessórias [6].



Figura 2: Probe confeccionada para realização de eletroejaculação em tamanduás-bandeira.

O protocolo de eletroejaculação foi baseado nos estudos de PLATZ e SEAGER em felinos [7], no qual são descritos 80 estímulos, divididos em três séries. A primeira série composta de 10 estímulos elétricos de 2 V, 10 de 3 V e 10 de 4 V, seguidos por um período de descanso de dois minutos. A segunda série consiste de 10 estímulos de 3 V, 10 de 4 V e 10 de 5 V, seguidos novamente de um período de descanso de dois minutos. Por fim, a última série com 10 estímulos elétricos de 5 V e 10 de 6 V. O procedimento de eletroestimulação foi interrompido assim que se obteve a fração rica em células espermáticas do ejaculado, exceto em 3 procedimentos nos quais os estímulos foram prolongados até a obtenção da fração gel do ejaculado.

As amostras seminas foram acondicionadas em tubos plásticos de 2,0 mL e transportadas ao laboratório em cerca de 10 a 15 minutos.

2.3. Avaliação do sêmen

O volume do ejaculado foi mensurado com micropipeta variável de 100 a 1.000 μ L. O aspecto foi determinado visualmente e classificado como viscoso, cremoso ou aquoso. A cor foi classificada como translúcida, opalescente ou esbranquiçada. O pH foi aferido com tiras indicadoras (pH - indicator strips 0-14, Universal indicator, Merck®, Merck KGaA, Hessen, Alemanha).

Subsequentemente, realizou-se exames subjetivos de motilidade e vigor espermáticos, entre lâmina e lamínula aquecidas a 30°C em placa aquecedora, utilizando-se microscópio de luz (DM500, Leica®, Wetzlar, Alemanha) com câmera digital (ICC50 HD, Leica®, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplada, em aumento de 200x. A temperatura de 30°C foi selecionada a partir dos resultados de estudos preliminares, nos quais obteve-se maior tempo de manutenção da motilidade e vigor espermáticos. Os resultados foram expressos em porcentagem (0 a 100%) para a motilidade e em escore de 0 a 5 para vigor.

A concentração espermática foi determinada em câmara hematimétrica de Neubauer sob microscopia de luz (aumento de 400x), após diluição de 1:20 em água destilada. Os resultados foram apresentados em número de espermatozoides/mL.

A integridade de membrana plasmática foi avaliada pela coloração com eosina 3% em água destilada, após confecção de dois esfregaços para cada

201 animal com 10 μ L de sêmen fresco e 10 μ L da solução de coloração. A leitura
202 das lâminas foi realizada em aumento de 400x, classificando-se as células
203 coradas em vermelho como apresentando membrana lesada e as células sem
204 coloração com a membrana íntegra. O resultado foi expresso em porcentagem
205 (0 a 100%) de células com a membrana íntegra.

206 A morfologia espermática foi avaliada por dois métodos, nos quais foram
207 contadas 200 células. Utilizou-se método Karras-modificado [8], para o qual
208 foram confeccionados três esfregaços com 10 μ L de sêmen fresco fixados em
209 metanol. Concomitantemente, uma alíquota de 10 μ L de sêmen fresco foi
210 conservada em 500 μ L de formol salina para realização do segundo teste em
211 microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC).

212 Para dimensionar a morfometria espermática foi utilizado o software
213 LAS EZ (Leica®, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Foram avaliadas
214 trinta células de cada indivíduo em esfregaço corado com Karras-modificado e
215 aumento de 1000x, nas quais aferiu-se a largura da cabeça, comprimento de
216 cabeça e da peça intermediária, comprimento total da cauda e comprimento
217 total do espermatozoide.

218 Para identificação da constituição dos grânulos presentes no ejaculado
219 da espécie, descritos por Mendonça [5] foi utilizada a coloração de
220 diferenciação lipídica com o corante *oil-red O* (Invitrogen Life Science
221 Technologies, Carlsbad, CA, USA), que faz com que moléculas de lipídio
222 tornem-se avermelhadas. Para isto empregou-se alíquotas de 200 μ L de cada
223 fração da amostra seminal (frações rica espermática e gel), que foram
224 depositadas separadamente em placas de petri. Subsequentemente, foi
225 adicionado 1 mL do corante em cada placa e após 20 minutos lavou-se ambas

com água destilada, retirando posteriormente o conteúdo líquido em excesso. A solução restante em cada placa de petri foi observada em microscopia de luz sob aumento de 2000 a 6300x.

2.4. Refrigeração do sêmen

Após colheita e avaliação do ejaculado, diluiu-se uma parte do sêmen em duas partes do diluente Botucrio® sem crioprotetor (Botupharma Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil), em recipientes plásticos com capacidade volumétrica de 2 mL. O sêmen diluído foi armazenado em sistema Botuflex® (Botupharma®, Botupharma Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil), adequando-se o volume necessário para uma taxa eficiente de refrigeração (-0,05°C/min até 5°C) com dois frascos contendo 90 mL de água, de acordo com a metodologia descrita por Papa et al [9] . A motilidade e vigor espermáticos foram avaliados a cada seis horas, utilizando-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente, até que não fossem observados espermatozoides móveis na amostra.

2.5. Análise estatística dos dados

Para os parâmetros seminais foi utilizado a média e erro padrão dos valores encontrados para os oito animais. Já para refrigeração de sêmen foi utilizada análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida pelo teste tukey, no programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., 2008). Para

avaliação estatística dos dados, considerou-se M0 para o sêmen fresco, M6, M12, M18 e M24, para 6, 12, 18 e 24 horas após o início do resfriamento, respectivamente.

3. RESULTADOS

Durante o período experimental foram capturados um macho no mês de abril, um no mês de julho e cinco machos no mês de novembro de 2013. Nenhum indivíduo foi recapturado e todos foram considerados saudáveis e mantiveram-se estáveis durante todo o procedimento de colheita do sêmen, com bom retorno anestésico.

As amostras seminais apresentaram duas frações distintas: a primeira de coloração esbranquiçada, aspecto leitoso e rica em células espermáticas, e a segunda incolor, de aspecto viscoso e ausência de espermatozoides. A segunda fração, denominada gel espermático, foi de difícil dissolução, não podendo ser liquefeita em até 6 horas de aquecimento em banho-maria a 37°C.

A primeira fração do ejaculado, em todos os animais, foi obtida com o emprego apenas da primeira série de estímulos elétricos, não sendo necessária a execução completa do protocolo de eletroestimulação. O término da primeira fração foi caracterizado pelo início da expulsão da segunda fração de aspecto gel.

O volume da fração gel variou entre os indivíduos, de forma que o animal MB1 ejaculou 1,2 mL, o MA1 0,3 mL e o MA2 0,4 mL. Observou-se maior quantidade de gel conforme o aumento do número e intensidade dos estímulos elétricos e maior profundidade da probe no reto.

276 O odor foi caracterizado como suis-generis e o pH de todos os
277 ejaculados foi 10, conferindo caráter básico ao sêmen.

278 Os valores individuais e médios ($\pm$ erro padrão) encontrados para
279 volume, motilidade, vigor e concentração espermáticos, e integridade de
280 membrana plasmática, estão expressos na Tabela 1.

281

Tabela 1: Valores individuais e médios ($\pm$ erro padrão) das características seminais de tamanduá-bandeira de vida livre.

Animais	Volume (ml)		Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração ($\times 10^6/\text{ml}$)	I.M.P(%)*
	Fração rica	Gel				
MB1	0,7	1,2	70	2	52	68
MA1	1,5	0,4	75	3	102	77
MA2	1	0,3	60	3	60	58
MA3	0,2	0	70	2	99	53
MA4	0,6	0	80	3	157	74
MA5	0,9	0	85	4	131	70
MA6	0,6	0	85	4	147	87
MA7	0,5	0	75	4	120	81
Média $\pm$ EP	0,75 ($\pm$ 0,1)	0,6 ($\pm$ 0,1)	75 ($\pm$ 2,9)	3,1 ($\pm$ 0,3)	108,5 ($\pm$ 13,4)	71 ($\pm$ 4,0)

282

* I.M.P: Índice de integridade da membrana plasmática

Os espermatozoides apresentaram cabeça de formato oval, com acrossoomo ocupando cerca de metade da sua área (Figura 3). A morfologia espermática mediante Karras-modificado e DIC estão exibidas na tabela 2.

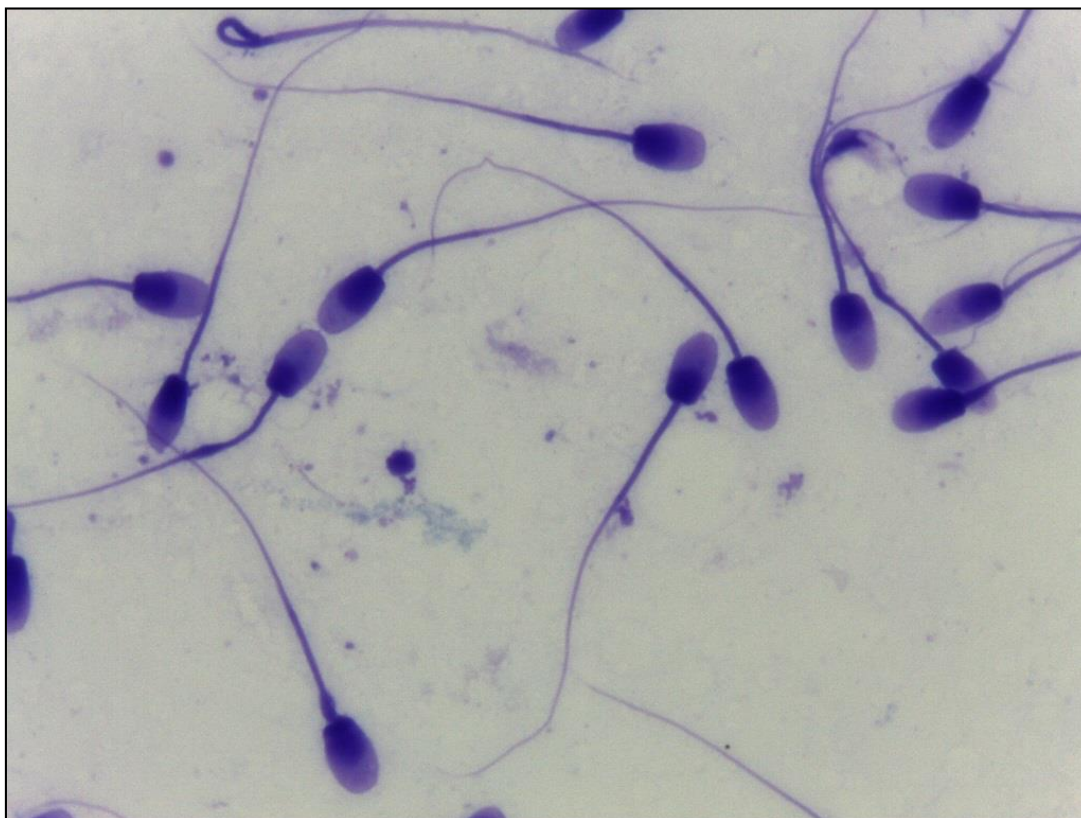


Figura 3: Aspecto microscópico dos espermatozoides de tamanduá-bandeira corados pelo método Karras-modificado sob aumento de 1000x.

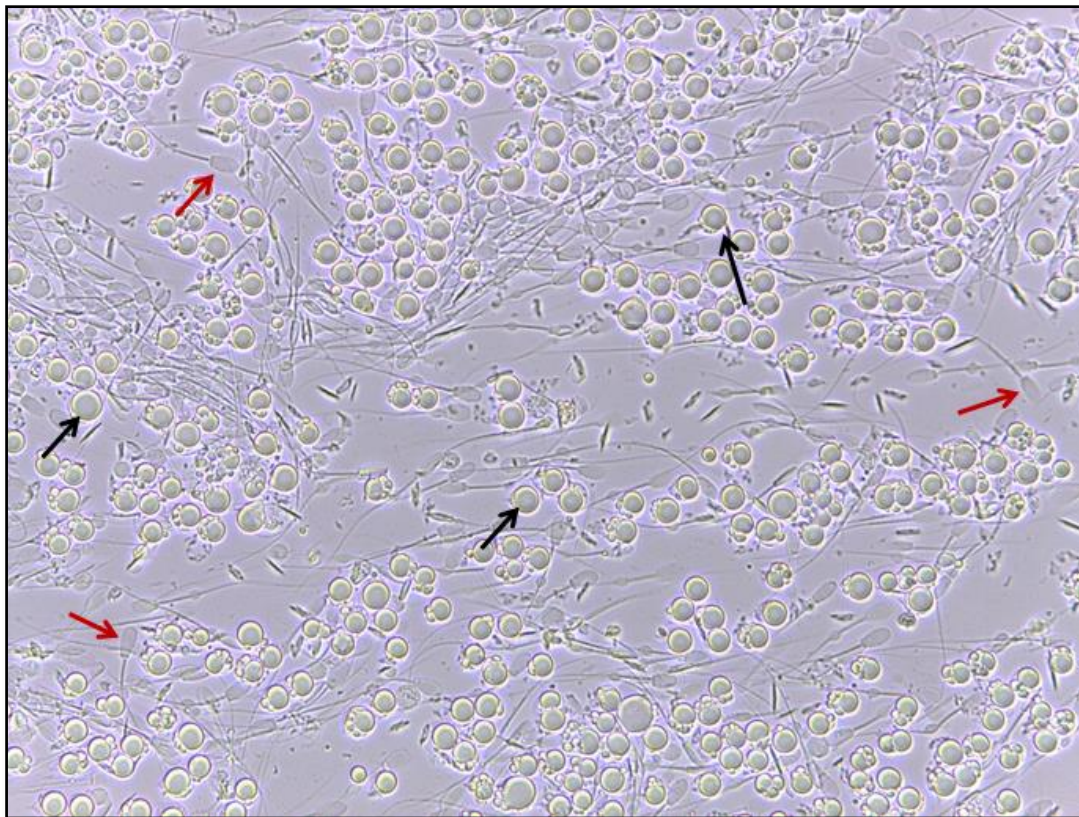
297 **Tabela 2:** Classes morfológicas encontradas em espermatozoides do tamanduá-
 298 bandeira espessas em porcentagem, sob coloração com Karras-modificado e DIC, e
 299 média ($\pm$ erro padrão) das alterações encontradas para cada técnica.

Morfologia espermática	KARRAS - modificado	DIC
Acrossoma lesado	4,37 $\pm$ 1,01	8,25 $\pm$ 1,80
Knobedd	0	2,50 $\pm$ 0,56
Cabeça		
Piriforme	2,00 $\pm$ 0,56	2,50 $\pm$ 0,56
Subdesenvolvida	1,62 $\pm$ 0,46	2,12 $\pm$ 0,69
Estreita na base	0	0,12 $\pm$ 0,12
Pequena anormal	0,50 $\pm$ 0,37	0,37 $\pm$ 0,26
Contorno anormal	0,50 $\pm$ 0,26	0,62 $\pm$ 0,41
Isolada patológica	0,50 $\pm$ 0,50	0,25 $\pm$ 0,16
Vacúolos nucleares	0	3,25 $\pm$ 0,95
Defeito de peça intermediária	0,87 $\pm$ 0,35	1,50 $\pm$ 0,37
Cauda		
Gota citoplasmática proximal	5,25 $\pm$ 1,42	6,00 $\pm$ 1,34
Gota citoplasmática distal	6,00 $\pm$ 1,40	13,5 $\pm$ 4,53
Fortemente dobrada	2,62 $\pm$ 1,08	1,75 $\pm$ 1,84
Dobrada com gota	4,37 $\pm$ 1,03	7,00 $\pm$ 0,64
Enrolada/dobrada	6,62 $\pm$ 2,40	6,25 $\pm$ 4,46
Abaxial	4,37 $\pm$ 1,55	6,75 $\pm$ 1,97
Média $\pm$ EP	35,5% ($\pm$3,3)	48,3% ($\pm$6,8)

300

301 A presença de grânulos arredondados simétricos, com borda regular, de
 302 diversos tamanhos e de difícil dissolução foi identificada em ambas as frações
 303 espermáticas, porém em maior quantidade na primeira (Figura 4). Sob a
 304 coloração por *oil-red O*, os grânulos tornaram-se avermelhados, o que
 305 caracteriza sua constituição lipídica (figura 5).

306



307

308 **Figura 4:** Aspecto microscópico do sêmen de *Myrmecophaga tridactyla* em aumento
309 de 200x, contendo grânulos arredondados (setas pretas) e espermatozoides (setas
310 vermelhas).

311

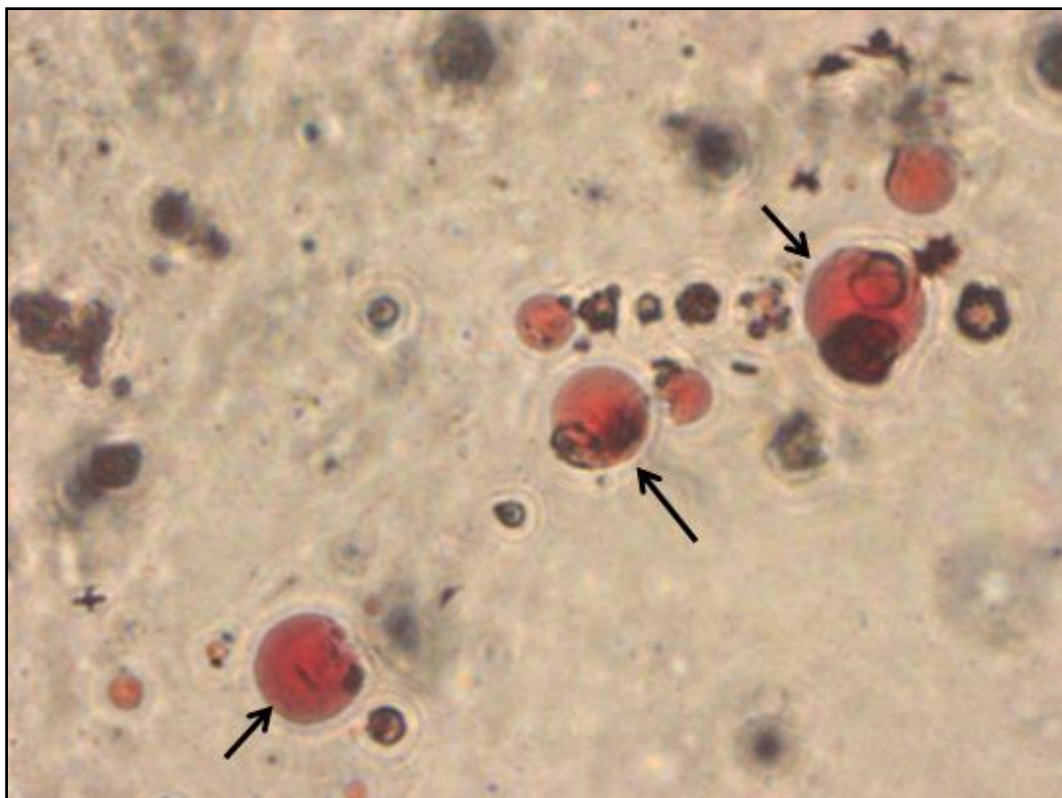


Figura 5: Grânulos de lipídio (seta) evidenciados pela coloração *oil-red O* observados no ejaculado de tamanduás-bandeira em aumento de 6300x.

Os valores morfométricos médios $\pm$ erro padrão dos espermatozoides foram: largura de cabeça de $5,1 \pm 0,09 \mu\text{m}$, comprimento de cabeça $9,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$, comprimento de peça intermediária $14,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$, comprimento de cauda $55,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$, comprimento total da célula espermática $64,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (figura 6).

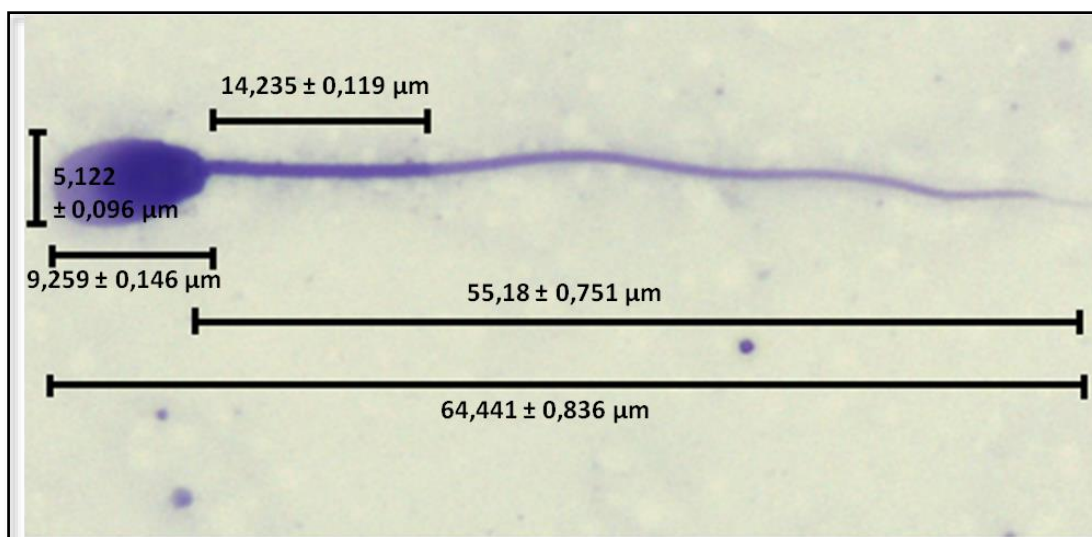


Figura 6: Aspecto microscópico da célula espermática de tamanduá-bandeira apresentando os seus valores morfométricos médios $\pm$ erro padrão.

3.1. Refrigeração do sêmen

Os ejaculados obtidos dos animais MB1 e MA3 não foram refrigerados, pois não apresentaram volume suficiente.

A motilidade espermática diminuiu de acordo com o tempo de refrigeração ($p < 0,05$), com exceção dos momentos M18 e M24, que não apresentaram diferenças ($p > 0,05$). Já vigor manteve-se constante até M6 ($p > 0,05$), quando teve uma diminuição significativa de M6 para M18 ($p < 0,05$) e manteve-se novamente constante de M18 a M24 ($p > 0,05$). Os valores para cada animal pós-refrigeração do sêmen estão expressos na tabela 3.

338 **Tabela 3:** Valores representativos de motilidade e vigor após até 24 horas da solução espermática de cada animal após refrigeração à 5°C em
 339 Botuflex®.

Animais	Sêmen fresco		6 horas		12 horas		18 horas		24 horas	
	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)
MA1	75	3	60	3	40	2	10	1	0	0
MA2	60	3	30	2	10	1	0	0	0	0
MA4	80	3	65	3	50	3	30	2	10	2
MA5	85	4	75	3	50	2	10	1	0	0
MA6	85	4	55	3	20	2	10	1	0	0
MA7	75	4	65	3	50	2	30	1	10	1

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a respeito das características seminais de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) realizado *in situ*, o que representa um importante avanço científico e início de um banco de dados para a superordem Xenarthra.

Foi possível demonstrar que a eletroejaculação é um método efetivo para colheita de sêmen de tamanduás-bandeira de vida livre, assim como descrito por Mendonça [5] em espécimes de cativeiro, e para tatus [10, 11] e preguiças [12].

O ejaculado formado por duas frações distintas também pode ser observado em outros animais como cavalos [13], cachacos [14], javalis [15] e catetos [16], porém a função fisiológica deste gel ainda é desconhecida e pode variar conforme a espécie.

O gel encontrado em amostras seminais de tamanduás-bandeira de vida livre também foi descrito no ejaculado de outros membros da superordem Xenarthra como preguiças do gênero *Bradypus* [12] e tatus da espécie *Euphractus sexcinctus* [10, 11]. Santos et al. [17], relata ainda a ausência de motilidade progressiva em tatus devido a alta viscosidade do gel e a dificuldade de liquefação deste conteúdo. Contudo, verificou-se durante o procedimento de eletroejaculação dos tamanduás *in-situ* a ejeção inicial da fração rica em espermatozoides, ao contrário daquilo referido para tamanduás cativos, os quais expulsam primeiramente a fração gel [5].

Conforme descrito por Mendonça e observado em etapas preliminares deste estudo, as amostras seminais obtidas de tamanduás-bandeira cativos

apresentam diferenças marcantes em relação aos espécimes de vida livre. Os animais *in-situ* apresentaram valores superiores de motilidade e vigor espermáticos, assim como valores inferiores de alterações nos espermatozoides, quando comparados com tamanduás de cativeiro [5]. Além disso, evidencia-se o pH alcalino encontrado em ejaculados de animais livres, condizente com o sêmen de tatus *ex situ* [10], porém diferente do observado em *Myrmecophaga tridactyla* de cativeiro, relatado em torno de 7 [5]. Segundo Setchell et al. [18] a eletroejaculação pode elevar o pH do sêmen devido a uma superestimulação de glândulas acessórias e consequentemente maior quantidade de plasma seminal. No entanto, o volume adquirido em animais *ex situ* foi maior [5] do que o encontrado em animais de vida livre, o que torna plausível uma alteração seminal devido as modificações nutricionais e no bem-estar destes animais quando submetidos ao cativeiro.

Outro aspecto de relevância no sêmen de tamanduás livres e cativos [5] é a presença de grânulos de lipídio no ejaculado, o que não foi descrito para outros xenarthros. A função deste componente no plasma seminal não foi elucidada e não está disponível em literatura. Sabe-se que lipídio é um dos componentes do plasma seminal e que este fluido tem papel essencial nas funções espermáticas desde a ejaculação até a sobrevivência no trato reprodutivo das fêmeas [19]. Considerando ainda o pênis diminuto e limitada penetração peniana durante a cópula [6], é possível relacionar tais achados com o longo percurso espermático no aparelho reprodutivo das fêmeas da espécie, que possuem grande comprimento de vagina e vestíbulo vaginal, medindo cerca de 10 cm cada [20].

Em geral, a morfologia do espermatozoide de tamanduás-bandeira é semelhante a de outros mamíferos, incluindo os membros da ordem Pilosa *Bradypus variegatus* [12], porém, difere em formato do espermatozoide de *Euphractus sexcinctus*, que possui cabeça mais arredondada e achatada [10,11]. As anormalidades mais encontradas em células espermáticas de tamanduás de vida livre, tais como gota citoplasmática distal e cauda dobrada, consideradas por Blom como defeitos menores [21], também foram verificadas em tamanduás-bandeira cativos [5], tatus [11] e preguiças [12]. Essas alterações podem ainda ser sugestivas da menor atividade sexual observada em animais com hábitos solitários *in situ*.

A morfometria dos espermatozoides de *Myrmecophaga tridactyla* ($64,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$) encontra-se próxima a média de mamíferos placentários que medem $69,2 (\pm 4,1 \mu\text{m})$ [22], sendo maior do que de Preguiças de três dedos (*Bradypus tridactylus*) com comprimento de $33,2 \pm 0,7 \mu\text{m}$ [12], porém semelhante a *Tamandua tetradactyla*, que mede $67,0 \pm 1,6 \mu\text{m}$ [23].

As células espermáticas de tamanduás-bandeira de vida livre quando submetidas a 5°C permaneceram com motilidade e vigor por no máximo 24 horas, o que não corresponde com padrões encontrados para animais domésticos, em que os espermatozoides permanecem com movimento progressivo até 48 horas sob mesmas condições de temperatura e volume [9]. Segundo Darenius [24], para uma boa refrigeração do sêmen a pressão osmótica e o pH do meio diluente devem ser semelhantes aqueles encontrados no ejaculado de garanhões, ou seja 300 a 350 mOsm e 7,0 a 7,2, respectivamente. Sabendo-se que o meio diluente Botucurio é formulado em pH

7 para a espécie equina, sugere-se que o resfriamento foi ineficaz devido as diferenças físico-químicas encontradas no sêmen dos tamanduás.

Sabe-se que condições de cativeiro como nutrição, sanidade e ambiente inadequados, juntamente com o estresse podem alterar os parâmetros reprodutivos e limitar o uso de estratégias tradicionais de reprodução de animais *ex situ* [3, 25]. Assim, o presente estudo proporciona um incentivo para o contínuo estudo com animais da espécie *in-situ* em relação a criopreservação do sêmen, bancos genéticos e uso de biotecnologias da reprodução, que podem futuramente auxiliar em programas de conservação para os membros da família Myrmecophagidae.

Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio ao processo nº 2012/24538-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e a Pousada Aguapé por todo o apoio pessoal e estrutural a campo.

REFERÊNCIAS

- [1] Medri I, Miranda F. 2010. *Myrmecophaga tridactyla*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. 2012. www.iucnredlist.org - Accessed on 30/07/2014.
- [2] Fallabrino A, Castiñeira E. Situacion de los Edentados en Uruguay. *Edentata* 2006; 7:1-3.

- 437 [3] Lasley BL, Loskutoff NM, Anderson GB. The limitation of conventional
438 breeding programs and the need promise of assisted reproduction in
439 nondomestic species. *Theriogenology* 1994; 41:119-132.
- 440 [4] Wildt DE, Ellis S, Janssen D, Buff J. Toward more effective reproductive
441 science for conservation. In: Holt WV, Pickard AR, Rodger J, Wildt DE,
442 editors. *Reproductive Science and Integrated Conservation*, New York:
443 Cambridge University Press 2003; p.2-20.
- 444 [5] Mendonça MAC. Análise descritiva do perfil espermático do Tamanduá-
445 bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus 1758) de cativeiro.
446 Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.
- 447 [6] Bartmann CP, Beyer C, Wissdorf, H. Topographie der Beckenhöhlenorgane
448 sowie Befunde zur Makroskopie und Histologie der Geschlechtsorgane
449 eines männlichen Großen Ameisenbären (*Myrmecophaga tridactyla*) im
450 Hinblick auf seine Fertilität. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr* 1991; 104:41-46.
- 451 [7] Platz CC, Seager SWJ. Semen collection by electroejaculation in the
452 domestic cat. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173:1353-1355.
- 453 [8] Papa FO, Alvarenga MA, Carvalho IM, Bicudo SD, Ramires PRN, Lopes
454 MD. Coloração espermática segundo Karras modificada pelo emprego do
455 Barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). *Arq Bras Med Vet Zootec*
456 1988; 40:115-123.
- 457 [9] Papa FO, Alvarenga MA, Dell'aqua JA, Monteiro, GA. Manual de Andrologia
458 e Manipulação de sêmen equino. 2011. www.botupharma.com.br -
459 Accessed on 30/07/2014.
- 460 [10] Serafim MKB, Lira RA, Costa LLM, Gadelha ICN, Freitas CIA, Silva AR.
461 Description of semen characteristics from six-banded armadillos

- 462 (*Euphractus sexcinctus*) collected by electroejaculation. Anim reprod sci
463 2010; 118:362-36.
- 464 [11] Sousa SPC, Santos EAA, Bezerra JAB, Lima GL, Castelo TS, Fontenele-
465 Neto JD, Silva AR. Morphology, morphometry and ultrastructure of
466 captivesix-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) sperm. Anim reprod
467 sci 2013; 140:279-285.
- 468 [12] Peres MA, Benetti EJ, Milazzotto MP, Visitin JA, Miglino MA, Assumpção
469 ME. Collection and evaluation of semen from the three-toad sloth (*Bradypus*
470 *tridactylus*). Tissue Cell 2008; 40:325-331.
- 471 [13] Ginther OJ. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses. 2th ed.
472 Wisconsin: Equiservices Publishing; 1995.
- 473 [14] Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. 2th ed. Washington:
474 Current Conceptions; 1997.
- 475 [15] Pursel VG. Effect of uterine ligation and cervical plugs on retention of
476 frozen-thawed boar sperm. J Anim Sci 1982; 54:137-141.
- 477 [16] Hellgren EC, Lochmiller MS, Amoss JR, Grant WE. Seasonal variation in
478 serum testosterone, testicular measurement and semen characteristics in
479 the collared peccary (*Tayassu Tajacu*). J Reprod Fertil 1989; 85:677-686.
- 480 [17] Santos EAA, Sousa PC, Dias CEV, Castelo TS, Peixoto GCX, Lima GL,
481 Ricarte ARF, Simão BR, Freitas CIA, Silva AR. Assessment of sperm
482 survival and functional membrane integrity of the six-banded armadillo
483 (*Euphractus sexcinctus*). Theriogenology 2011; 76:623-629.
- 484

- 485 [18] Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. Anatomy, vasculature, innervation
486 and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E, Neil JD, editors.
487 Physiology of Reproduction, New York: Raven Press; 1994. p.1063–1175.
- 488 [19] Johnston SD, Osborne CA, Lipowitz AJ. Characterization of seminal
489 plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretions in the domestic
490 cat. In: Proceedings of the 11th International Congress on Animal
491 Reproduction and Artificial Insemination 1988, Dublin, 4:560.
- 492 [20] Schauerte, N. Untersuchungen zur Zyklus- und Graviditätsdiagnostik beim
493 Großen Ameisenbären (*Myrmecophaga tridactyla*). Tese de Doutorado –
494 Giessen, Alemanha, 2005.
- 495 [21] Blom, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a
496 proposal for a new classification of the bull spermogram. Nord Vet Med
497 1973; 25:383-391.
- 498 [22] Roldan ERS, Gomendio M, Vitullo AD. The evolution of eutherian
499 spermatozoa and underlying selective forces: females selection and sperm
500 competition. Biol Rev Camb Philos Soc 1992; 67:551-593.
- 501 [23] Rossi LF, Luaces JP, Aldana-Marcos HJ, Cetica PD, Perez-Jimeno G,
502 Merani MS. Anatomy and Histology of the Male Reproductive Tract, and
503 Spermatogenesis Fine Structure in the Lesser Anteater (*Tamandua*
504 *tetradactyla*, Myrmecophagidae, Xenarthra): Morphological Evidences of
505 Reproductive Functions. Anat Histol Embryol 2013; 42:247-256.
- 506 [24] Darenius A. Experiences with chilled, transported equine semen. In:
507 Stallion Reproduction Symposium of Society for Theriogenology, American
508 Association of Equine Practitioners 1998; p.60-70.

- 509 [25] Moratto RG, Conforti VA, Azevedo FC, Jacomo ATA, Silveira L, Sana D,
510 Nunes ALV, Guimarães MABV, Barnabé RC. Comparative analyses of
511 semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars
512 (*Panthera onca*). Reproduction 2001; 122:745-751.

**AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS
ESPERMATOZOIDES DE TAMANDUÁS-BANDEIRA (*Myrmecophaga
tridactyla*) DE VIDA LIVRE**

Camila do Nascimento Luba^{a,b} - camilaluba@gmail.com

Flávia Regina Miranda^b - flavia@tamandua.org

Vinícius Peron de Oliveira Gasparotto^b - vini_peron@msn.com

Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga^a - fernanda@fmvz.unesp.br

Frederico Ozanan Papa^a - papa@fmvz.unesp.br

João Carlos Pinheiro Ferreira^a - jcferreira@fmvz.unesp.br

^a Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil. Endereço: Rubião Junior, s/n CEP: 18.618-000.

^b Instituto de Pesquisa e Conservação de Tamanduás no Brasil – Projeto Tamanduá. Endereço: Rua Pastor Carlos Frank, 458. Boqueirão, Curitiba, Paraná, Brasil. Cep: 81.730-340.

Autor correspondente:

João Carlos Pinheiro Ferreira - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP. Distrito de Rubião Junior, s/n Botucatu- São Paulo, Brasil. Cep: 18.618-970. jcferreira@fmvz.unesp.br.

RESUMO

Foram realizadas avaliações ultraestruturais sob microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de oito tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) de vida livre. As amostras seminais foram colhidas por eletroejaculação e armazenadas em glutaraldeído 2,5%. As células espermáticas apresentaram-se com formato cônico, acrossoma ocupando dois terços da cabeça e núcleo espermático elétron-denso com pontos elétron-lucentes distribuídos por toda a cabeça espermática. Na região do pescoço observou-se a presença do *capitulum* e centríolo proximal. A estrutura da cauda dos espermatozoides é semelhante a maioria dos mamíferos, com um axonema central e uma bainha mitocondrial helicoidal na peça intermediária. Quanto as anormalidades, observou-se destacamento do acrossoma e *dag-defect* em algumas células.

Palavras-chave: Myrmecophagidae, Xenarthra, sêmen

ABSTRACT

Ultrastructural evaluations were performed under transmission electron microscopy of sperm eight free-living giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). The seminal samples were collected by electroejaculation and stored in glutaraldehyde 2.5%. Sperm cells presented with conical shape, acrosome occupying two thirds of the sperm head. Observed electron-dense nucleus with electron-lucent points distributed throughout the sperm head. In the neck it was observed the presence of the *capitulum* and proximal centriole. The structure of the tail of the sperm is similar to most mammals, with a central axoneme and mitochondrial sheath helical in midpiece. The abnormalities observed in some cells it was detachment of the acrosome and flagellum defect.

Keywords: Myrmecophagidae, Xenarthra, Semen

1. INTRODUÇÃO

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) é um dos mamíferos mais ameaçados da América do Sul, listado na categoria Vulnerável pela IUCN (União Internacional de Conservação da Natureza). Devido a ameaças como atropelamentos, incêndios e desmatamentos, essa espécie teve sua população diminuída em cerca de 30% nos últimos 10 anos [1].

O maior representante da família Myrmecophagidae, o tamanduá-bandeira, pertence a ordem Pilosa e Superordem Xenarthra, ocorre em todos os biomas brasileiros e tem sua distribuição restrita às Américas Central e do Sul [1]. Considerada extinta no Uruguai [2], Belize, Guatemala e Costa Rica, a espécie enfrenta um grande risco de extinção em médio prazo [1].

O conhecimento morfofisiológico reprodutivo é fundamental para a conservação de espécies, populações e indiretamente à vitalidade dos ecossistemas [3]. Dados reprodutivos de *Myrmecophaga tridactyla* são escassos, há poucos estudos disponíveis sobre aspectos reprodutivos do macho da espécie e até o presente momento não existem relatos científicos sobre a morfologia ultraestrutural dos seus espermatozoides.

O conhecimento da morfologia da célula espermática é a base para a compreensão de mecanismos reprodutivos relacionados ao sexo masculino. A microscopia eletrônica de transmissão permite a avaliação de aspectos morfológicos dos espermatozoides em escala nanométrica (nm), o que não é possível com os métodos tradicionais de microscopia de luz [4]. Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever a ultraestrutura das células espermáticas utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Colheu-se sêmen por eletroejaculação de oito tamanduás-bandeira adultos de vida livre capturados na Fazenda São José, região de Aquidauana, no estado brasileiro de Mato Grosso do Sul (20°05'43.46"S/55°57'53.25"), em quatro expedições de sete dias cada uma, nos meses de outubro de 2012, abril, julho e novembro de 2013.

As capturas foram realizadas por busca ativa, com procura e avistamento do animal, sem uso de armadilhas. O local foi selecionado por apresentar vegetação característica de cerrado, que atua como facilitador em capturas de animais desta espécie devido à melhor visualização dos espécimes e poucas áreas de fuga. Devido às características sono-vigília da espécie, a procura pelos animais foi realizada sempre ao amanhecer e a partir do anoitecer. Uma vez encontrado, estimava-se visualmente o peso do animal, o qual era cercado e contido quimicamente com dardo anestésico e zarabatana.

O protocolo utilizado para anestésiar os animais foi a associação de 8,0 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Cetamina, Syntec®, Cotia, estado de São Paulo, Brasil), 0,5 mg/kg de midazolam (Dormire®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA., São Paulo, Brasil) e 0,5 mg/kg de cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec®, Cotia, estado de São Paulo, Brasil).

Após contenção química foi realizada tricotomia e lavagem com solução de 0,9% de NaCl da área genital. Utilizou-se um aparelho de eletroestimulação (Eletrojet Premium, Eletrovet®, Eletrovet LTDA, Valinhos, estado de São Paulo,

Brasil) e uma probe com 1,3 cm de diâmetro, 17 cm de comprimento e dois eletrodos com 7 cm de extensão. A probe foi lubrificada com carboximetil celulose e introduzida no reto sobre as glândulas sexuais acessórias [5]. O protocolo de eletroejaculação foi baseado nos estudos de Platz e Seager em felinos [6], no qual utilizou-se 80 estímulos, divididos em três séries. A primeira série foi composta de 10 estímulos elétricos de 2 V, 10 de 3 V e 10 de 4 V, seguidos por um período de descanso de dois minutos. A segunda série consistiu de 10 estímulos de 3 V, 10 de 4 V e 10 de 5 V, seguidos novamente de um período de descanso de dois minutos. Por fim, na terceira série utilizou-se 10 estímulos elétricos de 5 V e 10 de 6 V.

Após as colheitas, alíquotas de 50 µL da amostra seminal de cada animal foram armazenadas em tubos plásticos contendo 2,0 mL de glutaraldeído a 2,5% com tampão fosfato 0,1mol l⁻¹, em pH 7,4. Posteriormente, no laboratório de morfologia celular (Instituto de biociências – UNESP, Campus de Botucatu-SP, Brasil) a solução foi centrifugada a 300x g por 10 minutos e os *pellets* foram enxaguados com solução tampão fosfato e fixados em solução de tetróxido de ósmio 1%, tamponada em PBS, durante 3 horas a 4°C. Subsequentemente, as células espermáticas foram desidratadas em gradiente crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) por 5 minutos em cada escala. Utilizou-se resina Araldite 502 para as inclusões do material, que foi então cortado (cortes ultrafinos de 50 nm) e corado com solução saturada de acetato de uranila em álcool etílico 50% e, posteriormente, em citrato de chumbo. As amostras foram avaliadas e fotografadas em aparelho Tecnai G2 Spirit® (Fei Company®).

3. RESULTADOS

A avaliação dos espermatozoides foi realizada somente de maneira descritiva. As células espermáticas apresentaram cabeça de formato cônico e acrossoma estendendo-se por dois terços da cabeça espermática (figura 1A e 1C). O acrossoma apresentou elétron-densidade homogênea, com duas cristas apicais, na porção apical, caracterizadas como protuberâncias similares em tamanho e em extremidades opostas (figura 1B, 1C e 1E). O segmento equatorial do acrossoma apresentou um estreitamento sutil terminando na região pós-acrossomal onde está presente uma lâmina densa entre o núcleo e a membrana plasmática (figura 1A). Não foi observada estrutura condizente com *perforatorium*.

O núcleo mostrou-se significativamente elétron-denso com pontos elétron-lucentes pequenos e difusos espalhados por toda a cabeça espermática (figura 1C e 1E). A parte caudal do núcleo apresentou-se praticamente plana formando a fossa de implantação. Associada a membrana nuclear desta região foi observada uma camada espessa de material fibroso formando o *capitulum*, alongado no seu eixo transversal, e ligando-se as fibras densas da peça intermediária. Além do *capitulum*, é possível observar na região do colo espermático o centríolo proximal (figura 1C).

A peça intermediária apareceu composta por um axonema típico (com um par central e nove pares periféricos de microtúbulos) envolto por mitocôndrias dispostas aparentemente de maneira longitudinal e helicoidal (1D e 1F). Na transição entre a peça intermediária e peça principal foi observado o

176 *annulus* marcando o fim do cinturão mitocondrial, porém sem diminuição do
177 diâmetro do axonema (figura 1D).

178 Em todas as amostras examinadas foi observada uma pequena
179 porcentagem de espermatozoides anormais. As anormalidades morfológicas
180 mais observadas foram cauda enrolada e destacamento do acrossomo. A
181 primeira, também conhecida como *Dag defect*, foi caracterizada pela presença
182 de grandes massas citoplasmáticas contendo vários cortes do axonema (figura
183 2A). Nestes casos, com frequência observou-se perda de microtúbulos em um
184 dos lados do axonema (figura 2B, 2C e 2D). Já em células espermáticas que
185 exibiram destacamento do acrossoma, este apresentou-se com elétrondensidade normal, porém com aspecto ondulado e completamente destacado
186 da membrana nuclear externa (figura 2F e 2G). Este aspecto foi diferente das
187 eventuais observações de espermatozoides que sofreram reação acrossomal
188 prematura (figura 2E).

190

191

192

193

194

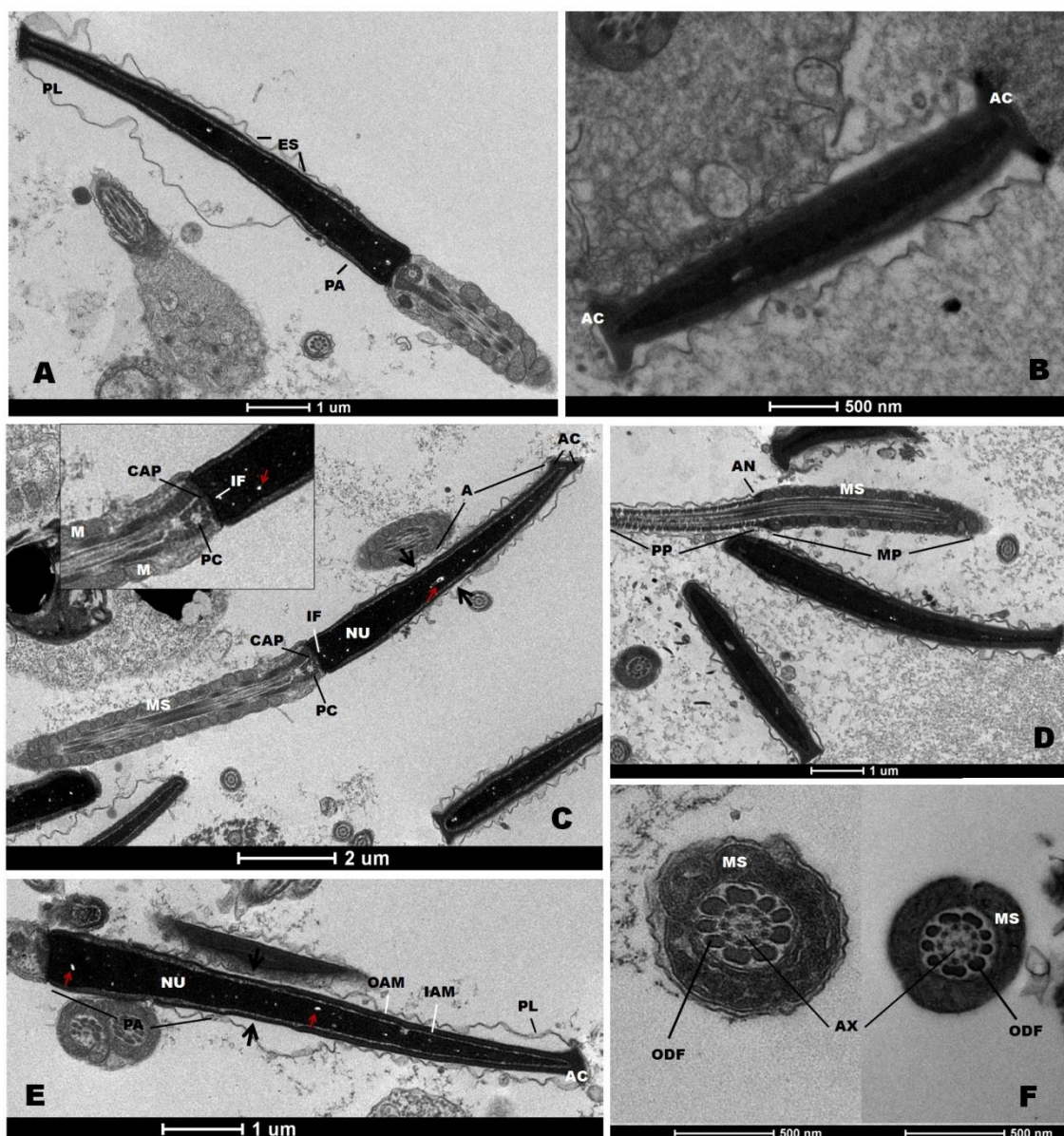


Figura 1: Morfologia ultraestrutural dos espermatozoides de tamanduá-bandeira. (A) Corte longitudinal da célula espermática - PL: Plasmalema; ES: segmento equatorial; PA: região pós-acrossomal. (B) Corte transversal da cabeça espermática – AC: crista apical. (C) A: acrosoma; AC: crista apical; NU: núcleo espermático; IF: fossa de implantação; CAP: *capitulum*; PC: centríolo proximal; M: mitocôndria; MS: bainha mitocondrial; setas pretas: segmento equatorial; setas vermelhas: pontos difusos elétron-lucentes presentes no núcleo. (D) MP: peça intermediária; PP: peça principal; AN: *annulus*; MS: bainha mitocondrial. (E) NU: núcleo; OAM: membrana acrossomal externa; IAM: membrana acrossomal interna; PL: plasmalema; AC: crista apical; PA: região pós-acrossomal; setas pretas: segmento equatorial; setas vermelhas: pontos difusos elétron-lucentes presentes no núcleo. (F) corte transversal da cauda – AX: axonema; MS: bainha mitocondrial; ODF: fibra densa externa.

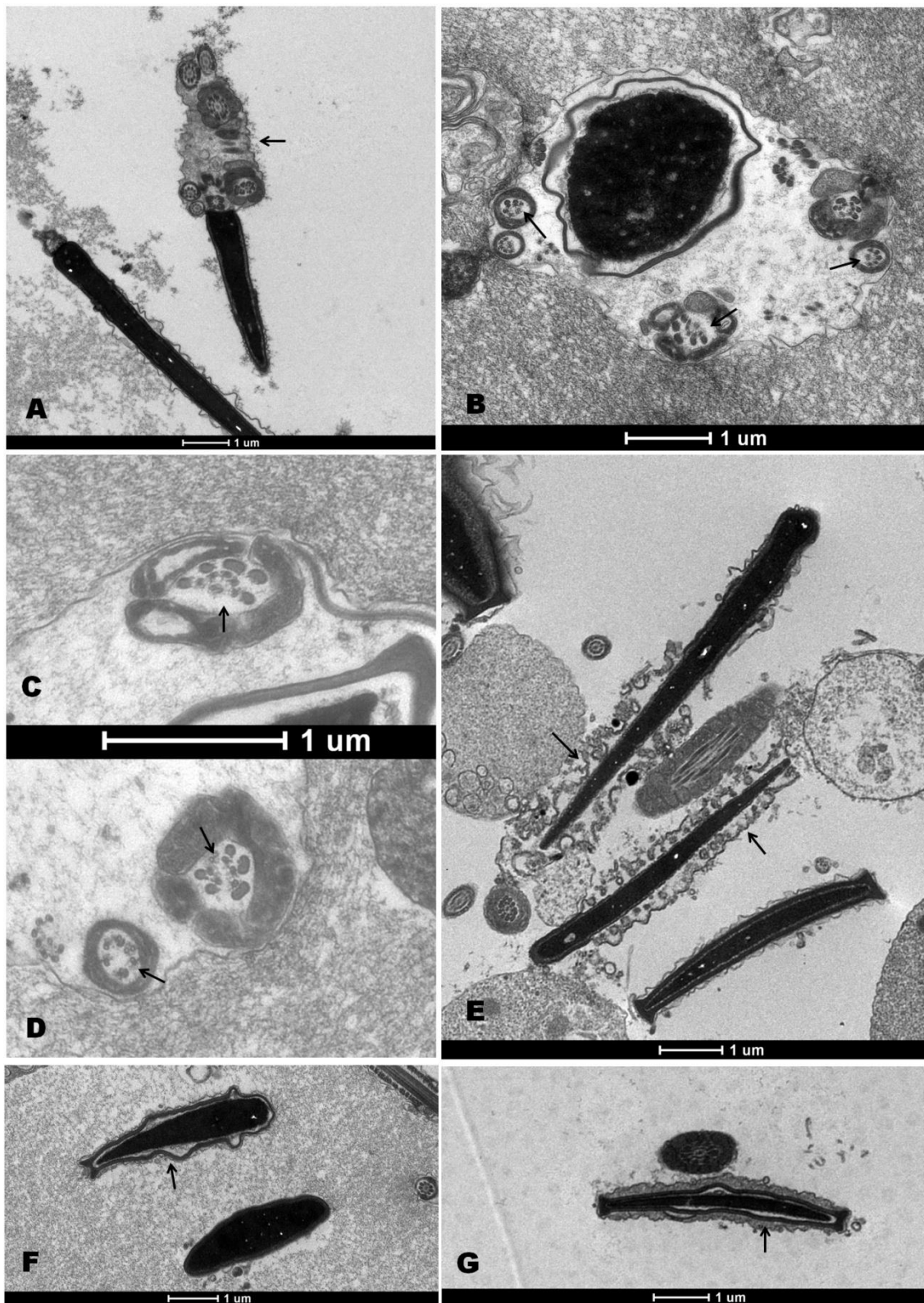


Figura 2: Anormalidades encontradas nas células espermáticas de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). (A) Seta preta: *Dag-defect* – é possível observar uma massa citoplasmática contendo diversos cortes do axonema; (B/C/D) seta preta:

perda de microtúbulos em um dos lados do axonema; (E) seta preta: reação acrossomal prematura; (F/G) seta preta: destacamento do acrossoma.

4. DISCUSSÃO

A morfologia dos espermatozoides de cada espécie animal está relacionada a características filogenéticas e com o sítio de fertilização da espécie [7]. A ultraestrutura do espermatozoide de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) se assemelha a de outros mamíferos, entretanto diferencia-se em formato e espessura do espermatozoide de tatus das espécies *Euphractus sexcinctus* [8] e *Cabassous unicinctus* [9], membros da mesma superordem xenarthra, os quais apresentam cabeça espermática arredondada, achatada e com um estreitamento gradual em direção ao ápice.

O acrossomo é uma estrutura altamente especializada que recobre anteriormente o núcleo espermático. Seu conteúdo é composto por enzimas hidrolíticas armazenadas durante a espermiogênese, as quais são liberadas no momento do contato entre espermatozoide e óvulo quando ocorre a reação acrossomal [10]. Em mamíferos, diversos estudos ultraestruturais têm demonstrado que o acrossomo é composto por um conteúdo amorfo de média elétron-densidade [7], assim como observado no espermatozoide de tamanduás-bandeira, o qual possui elétron-densidade homogênea em toda a sua extensão.

As cristas apicais presentes no acrossomo de espermatozoides de tamanduás-bandeira são semelhantes às aquelas encontradas também de forma bilateral em células espermáticas de tatus da espécie *Cabassous unicinctus* [9], porém em tamanduás encontram-se maiores e mais proeminentes do que nos tatus. Esta estrutura foi descrita anteriormente em bovinos como um

240 espessamento unilateral do acrossomo [11, 12]. Possivelmente, essas
241 peculiaridades do acrossoma estejam também relacionadas com o transporte
242 espermático no trato reprodutivo da fêmea e sua interação com o óvulo [13],
243 porém, não existem estudos científicos que comprovem sua função.

244 O segmento equatorial exibiu uma leve diminuição de espessura, porém
245 não foi observado um aumento de elétron-densidade conforme descrito para
246 outras espécies [7], incluindo membros da superordem xenarthra [8, 9].

247 Segundo Bloom e Fawcet [14], a presença de pontos elétron-lucentes no
248 núcleo espermático, conforme observado neste trabalho, pode estar
249 relacionada com defeitos no processo de condensação da cromatina durante a
250 espermatogênese. Porém, este achado foi encontrado também em outros
251 membros da superordem Xenarthra, como *Euphractus sexcinctus* [8] e
252 *Cabassous unicinctus* [9] e não há evidência clara de que isto interfira na
253 capacidade fertilizante dos espermatozoides. Esta característica dos
254 espermatozoides provavelmente condiz com o padrão filogenético de
255 condensação da cromatina nuclear de xenarthras, porém para elucidar este
256 parâmetro são necessários mais estudos.

257 A peça intermediária contém mitocôndrias helicoidais responsáveis por
258 gerar energia para movimentação dos flagelos [15]. A organização básica da
259 peça intermediária observado em espermatozoides de tamanduás-bandeira
260 não difere de outras espécies, porém não foi possível distinguir o comprimento
261 da peça intermediária e número de mitocôndrias neste estudo.

262 A maioria das anomalias encontradas na cauda dos espermatozoides
263 está associada com mudanças estruturais complexas na célula espermática, o
264 que muitas vezes pode ocultar o problema primário [12]. Barth e Oko

observaram que, em espermatozoides de ratos, a ausência de um segmento da bainha mitocondrial ocasiona dispersão da substância granular que une esta bainha às fibras densas externas, provocando uma fraqueza estrutural na célula. Com isso, durante a movimentação do espermatozoide, o axonema pode se romper e perder parte das fibras axiais na porção inferior à falha na bainha mitocondrial, o que torna a cauda propensa a se dobrar [12]. Esta ausência de microtúbulos observada em espermatozoides de tamanduás-bandeira estava associada com grandes massas citoplasmáticas contendo vários cortes do axonema, o que correlaciona tal defeito com o dobramento da cauda espermática.

O presente estudo descreveu a ultraestrutura de espermatozoides da espécie *Myrmecophaga tridactyla*, demonstrando as peculiaridades e características do gameta masculino, assim como as alterações morfológicas encontradas, o que inicia um importante banco de dados sobre aspectos reprodutivos do macho da espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio processo nº 2012/24538-7 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e ao setor de morfologia celular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

REFERÊNCIAS

- 289 [1] Medri I, Miranda F. 2010. *Myrmecophaga tridactyla*. In: IUCN 2012. IUCN
290 Red List of Threatened Species. 2012. www.iucnredlist.org - Accessed on
291 30/07/2014.
- 292 [2] Fallabrino A, Castiñeira E. Situacion de los Edentados en Uruguay. *Edentata*
293 2006; 7:1-3.
- 294 [3] Wildt DE, Ellis S, Janssen D, Buff J. Toward more effective reproductive
295 science for conservation. In: Holt WV, Pickard AR, Rodger J, Wildt DE,
296 editors. *Reproductive Science and Integrated Conservation*, New York:
297 Cambridge University Press 2003; p.2-20.
- 298 [4] Joshi N. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by
299 atomic force microscopy. *Fertil Steril* 2001, 75 (5):961-966.
- 300 [5] Bartmann CP, Beyer C, Wissdorf, H. Topographie der Beckenhöhlenorgane
301 sowie Befunde zur Makroskopie und Histologie der Geschlechtsorgane
302 eines männlichen Großen Ameisenbären (*Myrmecophaga tridactyla*) im
303 Hinblick auf seine Fertilität. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr* 1991; 104:41-46.
- 304 [6] Platz CC, Seager SWJ. Semen collection by electroejaculation in the
305 domestic cat. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173:1353-1355.
- 306 [7] Fawcett DW. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol reprod* 1970;
307 2:90-127.
- 308 [8] Sousa SPC, Santos EAA, Bezerra JAB, Lima GL, Castelo TS, Fontenele-
309 Neto JD, Silva AR. Morphology, morphometry and ultrastructure of
310 captive six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) sperm. *Anim reprod*
311 *sci* 2013; 140:279-285.

- 312 [9] Heath E, Schaeffer N, Meritt DA, Jeyendran RS. Rouleaux formation by
313 spermatozoa in the naked-tail armadillo, *Cabassous unicinctus*. J Reprod
314 Fert 1987; 79:153-158.
- 315 [10] Diaz-Peres E, Thomas P, Meitzel S. Evidence suggesting a role for sperm
316 methaloendoprotease activity in penetration of zone-free hamster eggs by
317 human sperm. J Exp Zool 1988; 248: 213-221.
- 318 [11] Blom, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a
319 proposal for a new classification of the bull spermogram. Nord Vet Med
320 1973; 25:383-391.
- 321 [12] Barth AD, Oko RJ. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa,
322 1989, cap.5, p.130-192.
- 323 [13] Bedford JM, Hoskins DD. The mammalian spermatozoon: morphology,
324 biochemistry and physiology. In: Lamming GE, Editors. Marshall's
325 physiology of reproduction. II Reproduction in the male. Longman1990, UK,
326 p.379–568.
- 327 [14] Bloom W, Fawcett DW. A Textbook of Histology, 1994, 12^a ed. Chapman &
328 Hall, New York.
- 329 [15] Câmara DR, Guerra MMP. Sperm mitochondria: beyond the triphosphate
330 adenosine (ATP) synthesis. Rev Bras Reprod Anim 2008, 32(2):93–99.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

As amostras seminais de tamanduás-bandeira de vida livre apresentaram diferenças notáveis em relação às características seminais de tamanduás em cativeiro.

Uma das características marcantes do sêmen é a presença da segunda fração da amostra seminal, caracterizada por um gel com alta viscosidade. Este gel parece ser predominante em outras espécies de Xenarthras, como preguiças do gênero *Bradypus* (PERES et al., 2008) e tatus da espécie *Euphractus sexcinctus* (SERAFIM et al., 2010; SANTOS et al., 2011; SOUZA et al., 2013). Entretanto, Mendonça (2010) relatou que o processo de ejaculação dos animais em cativeiro iniciou-se com a fração gel, opostamente ao encontrado em tamanduás de vida livre. Em estudos preliminares do presente trabalho foram colhidas amostras seminais de animais *ex-situ*, nas quais se observou dificuldade de fracionar o ejaculado, notando-se a ejeção das duas frações de maneira mesclada, havendo assim indícios de alterações seminais de animais submetidos ao cativeiro.

Entre as principais distinções observadas no sêmen de tamanduás de vida livre são os valores de motilidade e vigor espermáticos consideravelmente maiores do que aqueles descritos para animais de cativeiro. Associado a isso, os exemplares *in situ* apresentaram valores inferiores de alterações nos espermatozoides, quando comparados com animais *ex situ*. Porém, a diferença mais surpreendente constatada na amostra seminal de tamanduás livres foi o pH alcalino, contrastantemente diferente daquele relatado em torno de 7 em animais da espécie cativos (MENDONÇA, 2010). Este pH seminal alcalino,

entretanto, condiz com outros xenarthros, como tatus (SERAFIM et al., 2010). Os tamanduás são animais estritamente insetívoros, o que dificulta e altera de maneira acentuada sua alimentação em cativeiro. Além disso, possuem hábito solitário e são muitas vezes mantidos em grupos quando cativos. Essas condições inadequadas de nutrição, sanidade e ambiente, associadas ao estresse, podem justificar a alteração de parâmetros reprodutivos dos animais *ex situ* (LASLEY et al., 1994).

A presença de grânulos de lipídio no ejaculado de tamanduás-bandeira, tanto em cativeiro como em vida livre, mostrou-se uma característica incomum em relação a amostras seminais de outras espécies de mamíferos. O lipídio é um dos componentes do plasma seminal de todas as espécies (JOHNSTON et al., 1988), porém neste caso encontra-se em grandes quantidades formando grânulos visíveis em microscopia de luz. A função deste componente no plasma seminal de tamanduás não foi elucidada e não está disponível em literatura até o presente momento. Contudo, sabe-se que o fluido seminal tem papel essencial nas funções espermáticas desde a ejaculação até a sobrevivência no trato reprodutivo das fêmeas (JOHNSTON et al., 1988), podendo assim estar relacionado com o pênis diminuto e a limitada penetração peniana durante a cópula em *Myrmecophaga tridactyla* (BARTMANN et al., 1991), considerando-se que o aparelho reprodutivo das fêmeas possui grande comprimento de vagina e vestibulo vaginal, medindo cerca de 10 cm cada (SCHAUERTE, 2005).

A morfologia ultraestrutural dos espermatozoides se relaciona com as características filogenéticas e com o sítio de fertilização de cada espécie (FAWCETT, 1970). Desta forma, entre os membros da superordem Xenarthra

há diferentes aspectos em relação ao formato e espessura da cabeça espermática. Entretanto os espermatozoides de tamanduás assemelham-se aos de tatus em relação a condensação da cromatina nuclear, uma vez que ambos possuem pontos difusos elétron-lucentes no núcleo espermático (HEATH et al., 1987; SOUZA et al., 2013). Outra particularidade encontrada na célula espermática de tamanduás-bandeira é a presença de cristas apicais bilaterais, semelhantes aquelas descritas em espermatozoides de tatus da espécie *Cabassous unicinctus* (HEATH et al., 1987). Apesar de já ter sido constatada a formação de uma crista apical unilateral em bovinos há certo tempo (BLOM, 1973; BARTH & OKO, 1989), até o presente momento não existem estudos científicos que comprovem sua função.

Quando se pretende armazenar uma amostra seminal para uso posterior daquele material genético, há a necessidade de criopreservar as células espermáticas. Segundo Darenius (1998), para uma boa refrigeração do sêmen a pressão osmótica e o pH do meio diluente devem ser semelhantes aqueles encontrados no ejaculado da espécie. O meio diluente Botucrio® foi elaborado para equinos, considerando-se as características seminais da espécie. Este diluente foi selecionado neste estudo devido a bons resultados de motilidade e vigor espermáticos em etapas preliminares realizadas com tamanduás de cativeiro. Sabendo-se, neste momento, que o pH de amostras seminais de tamanduás *in situ* diverge daquele encontrado para animais cativos, e que o meio diluente Botucrio é formulado em pH 7, conclui-se que os métodos utilizados para refrigeração do sêmen foram inadequados, sendo necessário assim desenvolver um diluente com as características físico-químicas encontradas no ejaculado de tamanduás de vida livre.

Quando pretende-se elucidar aspectos reprodutivos de uma espécie, é imprescindível o estudo com animais em seu habitat natural. A superordem Xenarthra possui características taxonômicas muito distintas de outras ordens de mamíferos e até o presente momento não existem dados reprodutivos consistentes destes animais. Desta forma, o presente estudo significa um importante avanço relacionado aos parâmetros reprodutivos do macho da espécie *Myrmecophaga tridactyla*, auxiliando posteriores programas de reprodução assistida e uso de biotecnologias da reprodução visando a conservação da espécie.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- Os métodos empregados para avaliar características seminais da espécie *Myrmecophaga tridactyla* em vida livre foram adequados e permitiram caracterizar o sêmen quanto ao volume, cor, odor, aspecto, pH, motilidade, vigor, concentração e integridade de membrana plasmática.
- As técnicas de avaliação morfológica das células espermáticas Karras-modificado e DIC permitiram determinar morfologia e morfometria espermáticas em microscópio óptico.
- A microscopia eletrônica de transmissão permitiu uma descrição da ultraestrutura do acrossoma, núcleo, peça intermediária e peça principal dos espermatozoides de tamanduás-bandeira.
- Após diluição em Botucrio® e refrigeração a 5°C foi possível observar motilidade e vigor das células espermáticas por um período máximo de 24 horas.

BIBLIOGRAFIA GERAL

REFERÊNCIAS

AVANZI, B.R.; PAPA, F.O.; FARRÁS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JR., J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ARAUJO, G.H.M. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.152-154, 2006.

BARTH, A.D., OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Iowa, cap.5, p.130-192, 1989.

BARTMANN, W. Haltung und Zucht von Großen Ameisenbären, *Myrmecophaga tridactyla* Linne', 1758, im Tierpark Dortmund. **Der Zoologische Garten**, v.53, p.1–31, 1983.

BARTMANN, C.P., BEYER, C.; WISSDORF, H. Topographie der Beckenhöhlenorgane sowie Befunde zur Makroskopie und Histologie der Geschlechtsorgane eines männlichen Großen Ameisenbären (*Myrmecophaga tridactyla*) im Hinblick auf seine Fertilität. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v.104, p.41 -46, 1991.

BARTMANN, W. Breeding anteaters in Captivity. **Dortmund Zoo**, Mergelteichstr Dortmund, p.1-6, 1993.

BEDFORD, J.M.; HOSKINS, D.D. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In: Lamming GE, Editors. **Marshall's physiology of reproduction. II Reproduction in the male**. Longman, UK, p.379–568, 1990.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord Veterinaermed**, v.25, p.383-391, 1973.

BLOOM, W.; FAWCETT, D.W. **A Textbook of Histology**, 12^a ed. Chapman & Hall, New York. 1994

BRINSKO, S.P.; ROWAN, K.R.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T.L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1641-1655, 2000.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESSELS, S.; PANICH, P.L; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.

CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Sperm mitochondria: beyond the triphosphate adenosine (ATP) synthesis. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.93–99, 2008.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.2, n.4, p.257-262, 2002.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2^a ed. **Colégio Brasileiro de Reprodução animal**, Belo Horizonte, p.49, 1998.

CELEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes. **Dissertação de**

Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v.64, p.457-468, 2005.

CHEREM, J.J.; SIMÕES-LOPES, S.A.; GRAIPEL, M. E. Lista dos mamíferos do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. **Mastozoologia Neotropical**, v.11, n.2, p.151-184, 2004.

CITES. **CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA**. 2014. Disponível em: <<http://www.cites.org>>.

CRESPILHO, A.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1507-1510, 2006.

DARENIUS, A. Experiences with chilled, transported equine semen. *In*: Stallion Reproduction Symposium, Proceedings...Society for Theriogenology, **American Association of Equine Practitioners**, p.60-70. 1998.

DIAZ-PERES, E.; THOMAS, P.; MEITZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm methaloendoprotease activity in penetration of zone-free hamster eggs by human sperm. **Journal of Experimental Zoological**, v.248, p.213-221, 1988.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v.22, p.51-57, 1989.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, n.3, p.291-304, 1984.

DURRANT, B.S. Semen collection, evaluation and cryopreservation in exotic animal species: maximizing reproductive potential. **Ilar News**, v.32, n.1, p.2-9, 1990.

FALLABRINO, A.; CASTIÑEIRA, E. Situacion de los Edentados en Uruguay. **Edentata** v.7, p.1-3, 2006.

FAWCETT, D.W. A comparative view of sperm ultrastructure. **Biology of Reproduction**, v.2, p.90-127. 1970.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. **Canine and feline endocrinology and reproduction**, p.734-739, 1996.

FONTANA, C.S., BENCKE, G.A. REIS, R. E. **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. EdIPUCRS, Porto Alegre, 2003.

FRENEAU, G.E.; CHENOWETH, P.J.; ELLIS, R.; RUPP, G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.176-181, 2010.

FRENEAU, G.E, PUOLI, J.R, BORJA, A.L.R. Índice de capacidade andrológica por pontos (ICAP) em touros Nelore: Estudo de estação de acasalamento em Mato Grosso do Sul. *In*: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG. Anais, p.177-181, 2000.

GARDNER, A.L. Magnorder Xenarthra Cope. In: GARDNER, A.L. **Mammals of South America, Volume 1 - Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats**. Chicago and London, p.127-172, 2007.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses**. Equiservices Publishing, Cross Plains, Wisconsin, USA, 1995.

GUIMARÃES, M.A.B.V. Reprodução de Animais Silvestres. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**, cap.9, p.161-168, 2008.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7^a ed., São Paulo: Manole, p.530, 2003.

HEATH, E.; SCHAEFFER N.; MERITT, D.A.; JEYENDRAN, R.S. Rouleaux formation by spermatozoa in the naked-tail armadillo, *Cabassous unicinctus*. **Journal of Reproduction Fertility**; v.79, p.153-158, 1987.

HELLGREN, E.C.; LOCHMILLER, M.S.; AMOSS, J.R.; GRANT, W.E. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurement and semen characteristics in the collared peccary (*Tayassu Tajacu*). **Journal of Reproduction Fertility**, v.85, p.677-686, 1989.

JOHNSON, W. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **Veterinary Clinics of North America**, v.13, p.255-270, 1997.

JOHNSTON, S.D.; OSBORNE, C.A.; LIPOWITZ AJ. Characterization of seminal plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. In: **Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, Dublin, v.4, p.560. 1988.

JOSHI, N. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. **Fertility and Sterility**, v.75, n.5, p.961-66, 2001.

KAHWAGE, P.R.; GARCIA, A.R.; GUIMARÃES, D.A.A.; OHASHI, O.M.; LUZ-RAMOS, R.S.; DIAS, H.L.T.; ALBUQUERQUE, N.I.; BARTHA, M.M.P. Biometria testicular, eletroejaculação e características seminais de caititus, *Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Artiodactyla, Tayassuidae) mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. **Acta Amazonica**, v.40(4). p.771–778, 2010.

KALLAJOKI, M.; VIRTANEN, I.; SUOMINEN, J. The fate of acrosomal staining during the acrosome reaction of human spermatozoa as revealed by a monoclonal antibody and PNA-lectin. **International Journal of Andrology**, v.9, p.181-194, 1986.

LASLEY, B.L., LOSKUTOFF, N.M., ANDERSON, G.B. The limitation of conventional breeding programs and the need promise of assisted reproduction in nondomestic species. **Theriogenology**, v.41, p.119-132, 1994.

MACKENNAL, M.C.; BELL, S.K. **Classification of mammals: above the species level**. New York, 1997.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. Berlin, 1981.

MEDRI, I.M.; MOURÃO, G.M.; RODRIGUES, F.H.G. Xenarthra. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil**, cap.4, p.71-99, 2006.

MEDRI, I.; MIRANDA, F. 2010. *Myrmecophaga tridactyla*. In: IUCN 2012. **IUCN Red List of Threatened Species**. 2014. <www.iucnredlist.org>.

MENDONÇA, M. A. C. Análise descritiva do perfil espermático do Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus 1758) de cativeiro. **Dissertação de Mestrado** - Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

MERITT, J.R., D.A. Xenarthrans of the Paraguayan Chaco. In: VIZCAÍNO, S.F. e LOUGHRY, W.J. **The Biology of the Xenarthra**, University Press of Florida, Gainesville, p.294-299, 2008.

MORATTO, R.G.; BARNABE, R.C. Biotécnicas de Reprodução Aplicadas à Preservação de Felídeos Selvagens. **Clínica Veterinária**, v.12, p.24-26, 1998.

MORATTO, R.G., CONFORTI, V.A., AZEVEDO, F.C., JACOMO, A.T.A., SILVEIRA, L., SANA, D., NUNES, A.L.V., GUIMARÃES, M.A.B.V., BARNABÉ, R.C. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). **Reproduction**, v.122, p.745–751, 2001.

MORTIMER, D.; CURTIS, E.F.; MILLER, R.G. Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.127-135, 1987.

MOTA-FILHO, A.C. Conservação do sêmen canino sob refrigeração em diferentes caixas isotérmicas. **Acta Veterinaria Brasileira**, v.1, n.3, p.78-83, 2007.

OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology**, v.17, n.3, p.183-186. 1996.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; CARVALHO, I.M.; BICUDO, S.D.; RAMIRES, P.R.N.; LOPES, M.D. Coloração espermática segundo Karras modificada pelo

emprego do Barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.40, p.115-123, 1988.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA, J.A., MONTEIRO, G.A. **Manual de Andrologia e Manipulação de sêmen equino**. 2011. Disponível em: <http://www.botupharma.com.br/>.

PATZL, M.; SCHWARZENBERGER, F.; OSMANN, C.; BAMBERG, E.; BARTMANN, W. Monitoring ovarian cycle and pregnancy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) by faecal progestagen and oestrogen analysis. **Animal Reproduction Science**, v.53, p.209–219, 1998.

PERES, M.A., BENETTI, E.J., MILAZZOTTO, M.P., VISITIN, J.A., MIGLINO, M.A., ASSUMPÇÃO, M.E. Collection and evaluation of semen from the three-toad sloth (*Bradypus tridactylus*). **Tissue Cell**, v.40, p.325–331, 2008.

PLATZ, C.C.; SEAGER, S.W.J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.173, p.1353-1355, 1978.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v. 34, p.278-283, 1972.

PURSEL, V.G. Effect of uterine ligation and cervical plugs on retention of frozen-thawed boar sperm. **Journal of Animal Science**, v.54, p.137-141, 1982.

QUEIROZ, V.S. Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides. **Dissertação de**

Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo. 2003.

RAO, A.R. Changes in the morphology os sperm during their passage throught the genital tracts in bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Tese de doutorado**, Royal Veterinary College of Stockolm, 1971.

ROLDAN, E.R.S.,GOMENDIO, M., VITULLO, A.D. The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: females selection and sperm competition. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v.67, p.551–593, 1992.

ROSSI, L.F., LUACES, J.P., ALDANA-MARCOS, H.J., CETICA, P.D., PEREZ-JIMENO, G., MERANI, M.S. Anatomy and Histology of the Male Reproductive Tract, and Spermatogenesis Fine Structure in the Lesser Anteater (*Tamandua tetradactyla*, Myrmecophagidae, Xenarthra): Morphological Evidences of Reproductive Functions. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.42, p.247-256, 2012.

SAACKE, R.G, DALTON, J.C, NADIR, S., NEBEL, R.L, BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.663-677, 2000.

SAACKE, R.G.; MARSHALL, C.E. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.16, p.511-514,1968.

SAACKE, R.G., NADIR, R.L., NEBEL, J.H. Relationship of sêmen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v.41, p.45-60, 1990.

SÁNCHEZ, R.S. Conceito e fundamentos utilizados na inseminação artificial de suínos, **Suínos & Cia.** Ano I, n.2, p.18-22, 2003.

SANTOS, E.A.A.; SOUSA, P.C.; DIAS, C.E.V.; CASTELO, T.S.; PEIXOTO, G.C.X.; LIMA, G.L.; RICARTE, A.R.F.; SIMÃO, B.R.; FREITAS, C.I.A.; SILVA, A.R. Assessment of sperm survival and functional membrane integrity of the six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*). **Theriogenology**, v.76, p.623-629, 2011.

SCHAUERTE, N. Untersuchungen zur Zyklus- und Graviditätsdiagnostik beim Großen Ameisenbären (*Myrmecophaga tridactyla*). **Tese de Doutorado** – Giessen, Alemanha. 2005.

SCHRATTER, D. Erfolgreiche Handaufzucht von Zwillingen bei Großen Ameisenbären (*Myrmecophaga tridactyla*) im Tiergarten Schönbrunn. **Der Zoologische Garten**, v.71, p.97-112, 2001.

SEAGER, S.W.J.; FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Laboratory of Animal Science**, v.22, p.177-182, 1972.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**, cap.12, p.266-283, Washington, 1997.

SERAFIM, M.K.B., LIRA, R.A., COSTA, L.L.M., GADELHA, I.C.N., FREITAS, C.I.A., SILVA, A.R. Description of semen characteristics from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) collected by electroejaculation. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.362–36, 2010.

SETCHELL, B.P., MADDOCKS, S., BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. *In*: KNOBIL, E., NEIL, J.D. (Eds.), **The Physiology of Reproduction**, p.1063–1175, 1994.

SHAW, J.H.; MACHADO-NETO, J.; CARTER, T.S. Behavior of free-ranging anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). **Biotropica**, v.19, p.255–59, 1987.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing and thawing process. **Theriogenology**, v.59, p.821-29, 2003.

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

SILVA, S.V.; BATISTA, A.M.; COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P. Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: Uma breve revisão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.12, n.1/2/3, p.1-15, 2009.

SOUSA, S.P.C.; SANTOS, E.A.A.; BEZERRA, J.A.B.; LIMA, G.L.; CASTELO, T.S.; FONTENELE-NETO, J.D.; SILVA, A.R. Morphology, morphometry and ultrastructure of captive six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v.140, p.279-285, 2013.

SUPERINA, M. Um passeio pela biologia dos Tamanduás. In: MIRANDA, F. **Manutenção de Tamanduás em cativeiro**, p.26-37, 2012.

TALBOT, P.; CHACON, R. Observations on the acrosome reaction of human sperm. **American Journal Primatology**, v.1, p.211-219, 1981.

TEBET, M.J. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato doméstico (*Felis catus*). **Tese de Doutorado**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP. 2004.

VALDES, E.V.; SOTO, A.B.; Feeding and Nutrition of Anteaters. *In*: FOWLER, M.; MILLER, R.E. **Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy**, cap.49, p.378-383, 2011.

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; MELO, M.A.; MAGNAGO, L.G.P. Utilização de um container modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.505-514, 1999.

VARNER, D.D.; SCANLAN, C.M.; THOMPSON, J.A.; BMMBAUGH, G.W.; BLANCHARD, T.L.; CARLTON, C.M. JOHNSON, L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**, v.50, p.559-573, 1998.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.871-892, 1995.

WILDT, D.E.; ELLIS, S.; JANSSEN, D.; BUFF, J. Toward more effective reproductive science for conservation. *In*: HOLT, W.V.; PICKARD, A.R.; RODGER, J.; WILDT, D. E. **Reproductive Science and Integrated Conservation**, v.1, p.2-20, 2003.

ANEXOS

ANEXOS

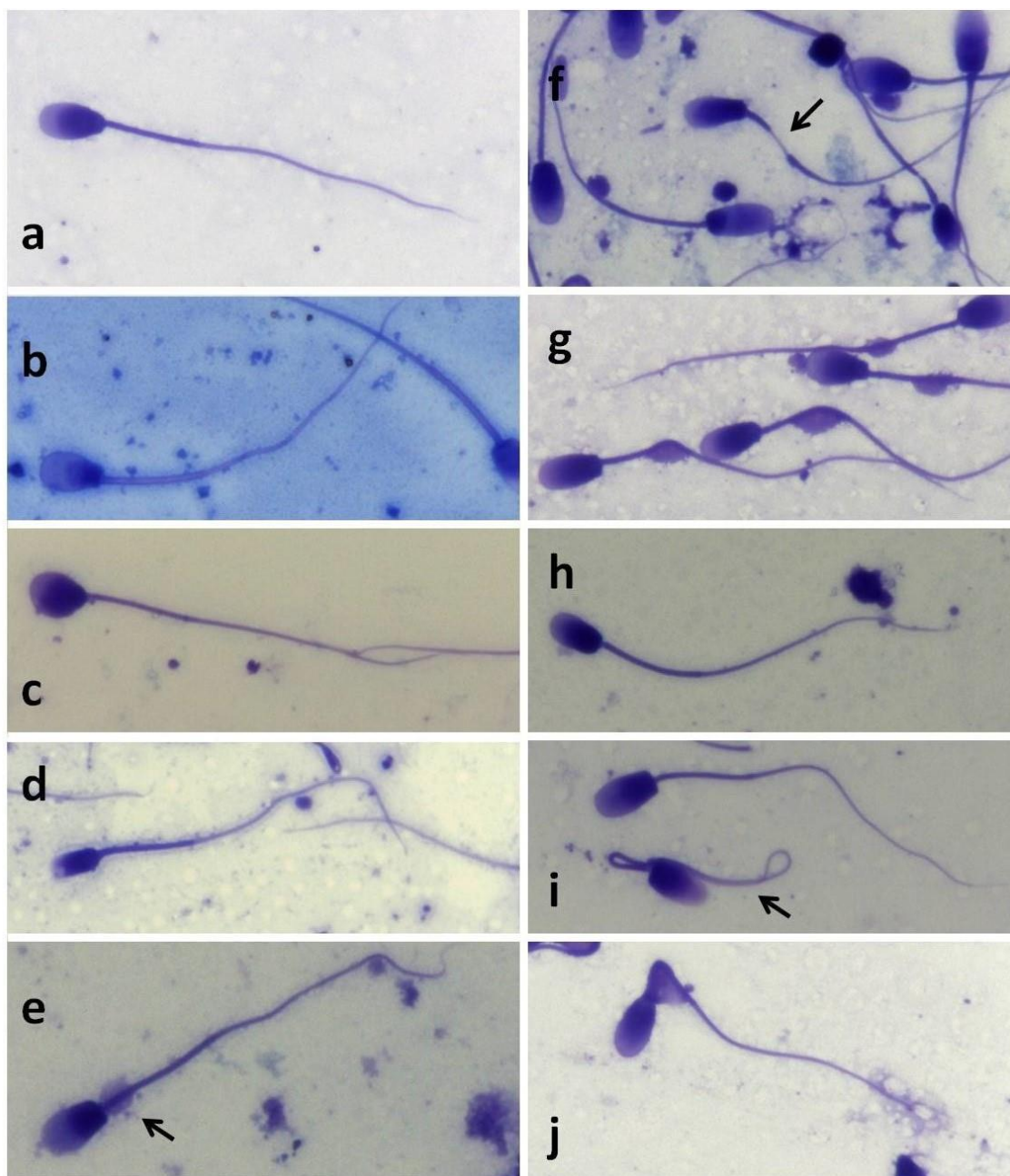


Figura 1: Morfologia espermática sob coloração com Karras-modificado. a) célula espermática normal; b) cabeça piriforme e cauda abaxial; c) cabeça com contorno anormal; d) cabeça subdesenvolvida; e) Acrossomo lesado e gota citoplasmática proximal; f) defeito em peça intermediária; g) gota citoplasmática distal; h) cauda abaxial; i) cauda fortemente dobrada; j) cauda dobrada com gota citoplasmática.

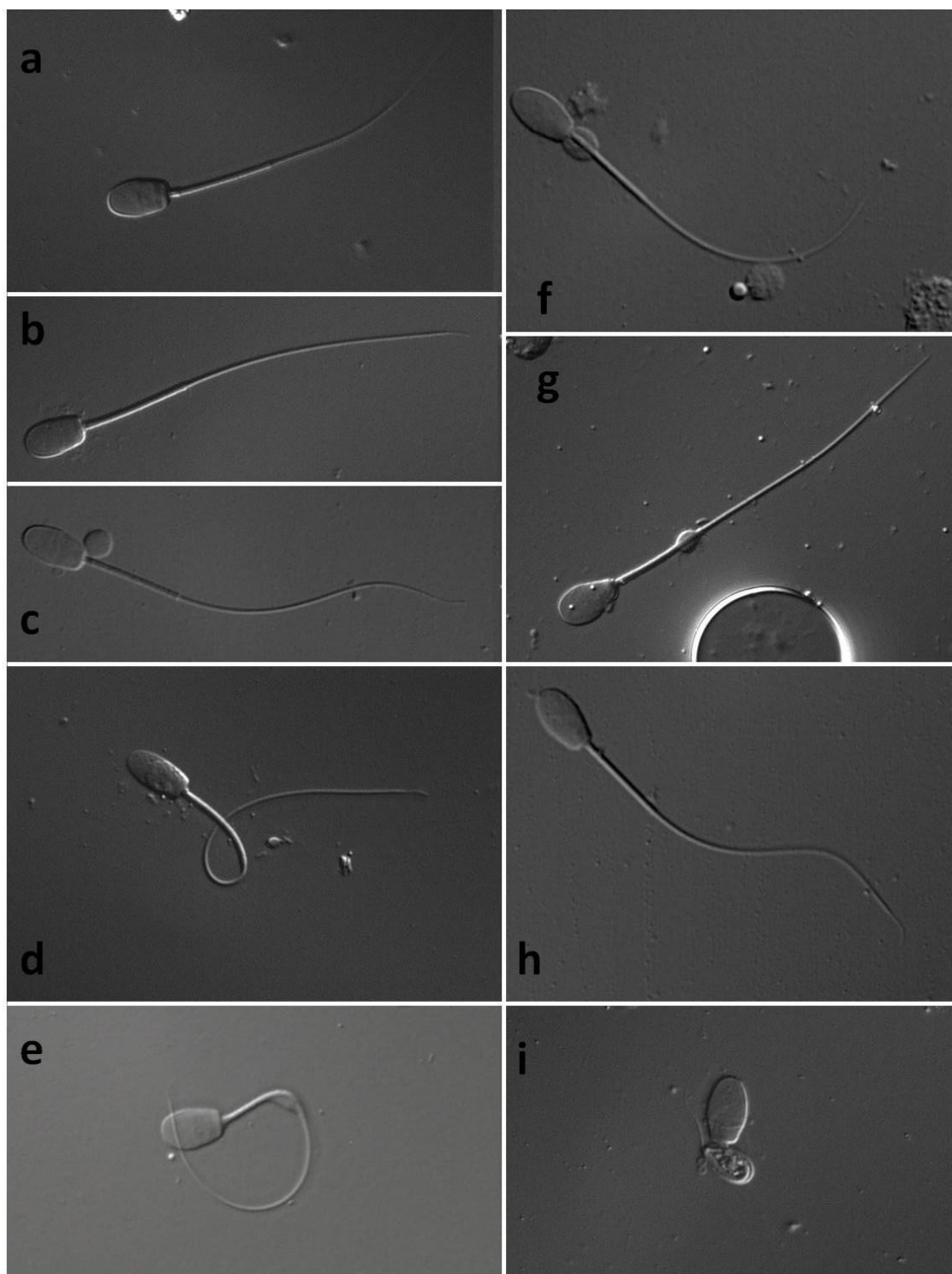


Figura 2: Morfologia espermática em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). a, b, c) células espermáticas normais; d) defeito de acrossomo e cauda dobrada; e) cauda dobrada com gota citoplasmática; f) gota citoplasmática proximal; g) gota citoplasmática distal; h) cauda abaxial; i) cauda enrolada.

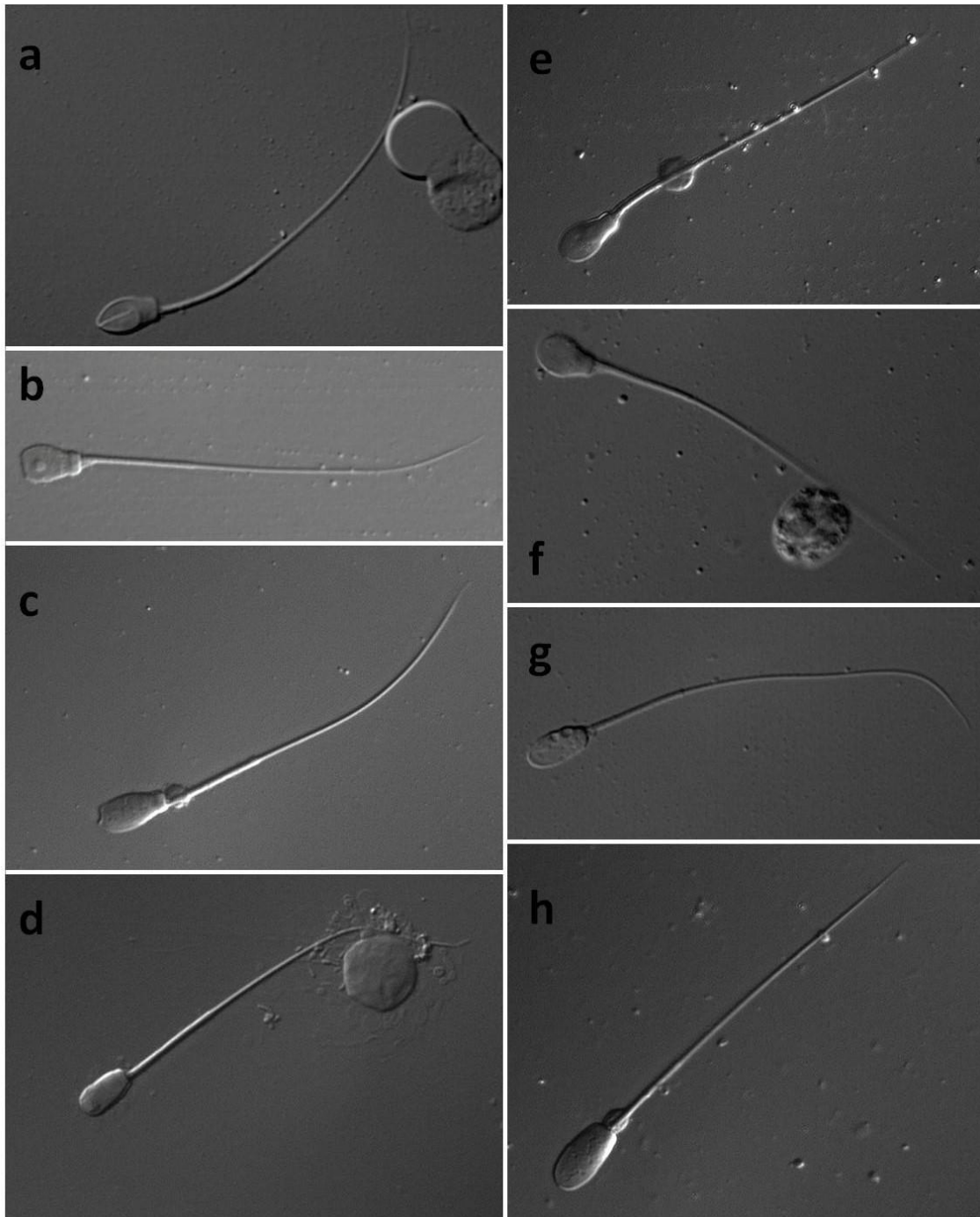


Figura 3: Morfologia espermática em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). a) Defeito de acrossoma; b) Knobbed sperm e vacúolo nuclear; c) Knobbed sperm; d) cabeça subdesenvolvida; e) cabeça estreita na base e cauda abaxial; f) cabeça piriforme; g) vacúolos nucleares; h) vacúolos nucleares e gota citoplasmática distal.

APÊNDICE

Normas dos trabalhos científicos

Os artigos serão submetidos à revista *Theriogenology*, mediante as normas a seguir, com exceção do idioma e localização das figuras no texto.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name.

The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a

footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then

Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.