

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAROLINE SILVA VIEIRA

SELEÇÃO ESPERMÁTICA EM TRÊS ESPÉCIES DE CERVOS: *MAZAMA AMERICANA* (ERXLEBEN, 1777), *MAZAMA GOUAZOUBIRA* (FISCHER, 1814) E *MAZAMA NEMORIVAGA* (CUVIER, 1817)

UBERLÂNDIA

2021

CAROLINE SILVA VIEIRA

SELEÇÃO ESPERMÁTICA EM TRÊS ESPÉCIES DE CERVOS: *MAZAMA AMERICANA* (ERXLEBEN, 1777), *MAZAMA GOUAZOUBIRA* (FISCHER, 1814) E *MAZAMA NEMORIVAGA* (CUVIER, 1817)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Inês de Assumpção.

UBERLÂNDIA

2021

RESUMO

Este estudo teve por objetivo selecionar espermatozoides de alta qualidade, através da separação espermática por centrifugação em gradientes de densidade (DGC) e por separação celular por ativação magnética (MACS), em sêmen fresco de cervos do gênero *Mazama*. O sêmen de seis cervos foi coletado pela técnica de eletroejaculação após a contenção química. Foram realizadas as seguintes análises: motilidade e vigor, morfologia (esfregaço corado com vermelho congo) e teste supravital (eosina-nigrosina), além do DGC e MACS. Para DGC utilizou-se Percoll® com 20×10^6 de células em gradiente de 400 μ l de Percoll® a 90% e 45%. Na MACS utilizou-se 10×10^6 de células com o pellet ressuspensão em 150 μ l de HEPES com 20 μ l de nanopartículas ligadas a anexina V, incubação por 15 minutos e filtração na coluna de separação magnética MiniMACS, e a porção não apoptótica filtrada foi coletada para análise. Os resultados obtidos para motilidade foram $75 \pm 7,1\%$, $71,7 \pm 10,8\%$ e $8,3 \pm 4,1\%$ em sêmen fresco, pós DGC e pós MACS, respectivamente. Para vigor os valores obtidos foram $2,8 \pm 0,4\%$ para sêmen fresco, $2,5 \pm 0,4\%$ pós DGC e $0,7 \pm 0\%$ pós MACS. Os defeitos totais reduziram após as técnicas de seleção empregadas ($44,5 \pm 19,6\%$ em sêmen fresco, $27,3 \pm 18,0$ pós DGC e $24,8 \pm 16,4$ pós MACS). Os defeitos individuais que tiveram maior redução após as técnicas de seleção foram cauda dobrada ($15,5\%$ em sêmen fresco, $6,2\%$ pós DGC e $4,8$ pós MACS) e cauda enrolada ($7,3\%$ em sêmen fresco, $1,4$ pós DGC e $2,0$ pós MACS). Houve também uma redução do número de células com membrana plasmática lesada em ambas as técnicas, sendo que, em relação ao fresco, a MACS reduziu em 25% e a DGC em 9%. Os achados sugerem que essas técnicas de separação espermáticas são eficientes na produção de amostras de sêmen de qualidade elevada em cervos.

Palavras-chave: cervídeos; sêmen; reprodução; espermatozoides; nanotecnologia.

ABSTRACT

This study aimed to select high quality sperm, through sperm separation by density gradient centrifugation (DGC) and by magnetic activation cell separation (MACS), in fresh semen from deer of the genus *Mazama*. Semen from six deer was collected using the electroejaculation technique after chemical restraint. The following analyzes were performed: motility and vigor, morphology (smear stained with Congo red) and supravital test (eosin-nigrosin), in addition to DGC and MACS. For DGC, Percoll® was used with 20×10^6 cells in a 400 μl gradient of Percoll® at 90% and 45%. In MACS, 10×10^6 cells were used with the pellet resuspended in 150 μl of HEPES with 20 μl of nanoparticles linked to annexin V, incubation for 15 minutes and filtration in the MiniMACS magnetic separation column, and the filtered non-apoptotic portion was collected for analysis. The results obtained for motility were $75 \pm 7.1\%$, $71.7 \pm 10.8\%$ and $8.3 \pm 4.1\%$ in fresh semen, post DGC and post MACS, respectively. For vigor, the values obtained were $2.8 \pm 0.4\%$ for fresh semen, $2.5 \pm 0.4\%$ after DGC and $0.7 \pm 0\%$ after MACS. Total defects reduced after the selection techniques used ($44.5 \pm 19.6\%$ in fresh semen, 27.3 ± 18.0 after DGC and 24.8 ± 16.4 after MACS). The individual defects that had the greatest reduction after the selection techniques were curled tail (15.5% in fresh semen, 6.2% post DGC and 4.8 post MACS) and curled tail (7.3% in fresh semen, 1.4 post DGC and 2.0 post MACS). There was also a reduction in the number of cells with damaged plasma membrane in both techniques, and, in relation to fresh, MACS reduced by 25% and DGC by 9%. The findings suggest that these sperm separation techniques are efficient in producing high quality semen samples in deer.

Keywords: deer; semen; reproduction; sperm; nanotechnology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1	Cervídeos do gênero <i>Mazama</i>	7
2.1.1	<i>Mazama americana</i>	7
2.1.2	<i>Mazama gouazoubira</i>	7
2.1.3	<i>Mazama nemorivaga</i>	8
2.2	Aspectos reprodutivos nos cervídeos machos	8
2.3	Coleta seminal.....	9
2.4	Qualidade do ejaculado	10
2.5	Avaliação do sêmen	10
2.5.1	Avaliação macroscópica do ejaculado.....	10
2.5.2	Movimento de Massa ou Turbilhonamento.....	11
2.5.3	Motilidade Espermática	11
2.5.4	Vigor.....	11
2.5.5	Concentração Espermática	12
2.5.6	Teste Supravital	12
2.5.7	Morfologia Espermática	12
2.6	Seleção Espermática.....	13
2.6.1	Separação espermática por centrifugação em gradientes de densidade (DGC) 13	
2.6.2	Separação celular por ativação magnética (MACS).....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1	Animais.....	14
3.2	Coleta e análise do sêmen	15
3.3	Separação espermática	16
3.4	Análise estatística	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do mundo, e apesar de ter sido bastante explorado, ainda detém inúmeras riquezas, tanto de fauna quanto flora. Nos últimos anos a importância da preservação ambiental vem ganhando reconhecimento e diversas ações são realizadas em todo o país, buscando disseminar conhecimento à população, conscientização e apoio para a conservação de espécies e habitats ameaçados, em sua maioria, devido às ações antrópicas (MITTERMEIER, 2005).

Representantes dessa biodiversidade brasileira, os cervídeos são mamíferos pertencentes à ordem *Artiodactyla* e família *Cervidae*, e hoje são contabilizadas mundialmente mais de 60 espécies de cervídeos, sendo somente 8 encontradas no Brasil. Dentre as espécies brasileiras, destacam-se com maior população as espécies *Mazama americana*, *Mazama nemorivaga* e *Mazama gouazoubira* (DUARTE, 2006). Contudo, além da escassez de dados sobre a biologia desses animais, uma redução nessas populações tem se tornado notável, sendo menos preocupante a população de veados-catingueiros (*M. gouazoubira*), cervídeos que aparentam ter desenvolvido maior adaptação às interferências antrópicas (DUARTE e REIS, 2012).

Para animais em risco ou ameaçados de extinção, como algumas espécies de cervídeos, uma forma de garantir a existência dos mesmos é aumentando suas taxas reprodutivas via técnicas da reprodução. Entretanto, a aplicação dessas técnicas às espécies selvagens ainda é muito limitada, principalmente devido à falta de conhecimento básico em biologia reprodutiva da maioria das espécies, como os cervos (HOLT et al., 2014). Nestes animais, até mesmo em vida livre, há um alto grau de anormalidades estruturais dos espermatozoides provocada pelo aumento da endogamia (perda da variabilidade genética) devido ao declínio populacional, que é ocasionado pelas mudanças ambientais e intervenções humanas (WILDT et al., 2010; HOLT et al., 2014). Este quadro também é observado em animais de cativeiro, provocado pelo estresse do espaço reduzido, mudança de ambiente e convivência constante com outros indivíduos (ABREU et al. 2009).

Técnicas como a separação espermática por centrifugação em gradiente de densidade (DGC) usando Percoll[®] e a separação espermática por ativação magnética (MACS) são opções para reduzir a quantidade de anormalidades espermáticas nas amostras seminais, principalmente espermatozoides com anormalidade em cauda e cabeça, melhorando assim a qualidade do ejaculado para que o mesmo possa ser utilizado em técnicas como inseminação

artificial (IA) e a fertilização in vitro (FIV) (FAEZAH et al.; 2014; BUCAR et al., 2015; BERTELI et al., 2017).

Diante do exposto, este estudo tem por objetivo selecionar espermatozoides de alta qualidade, através das técnicas de separação espermática por centrifugação em gradiente de densidade e separação espermática por ativação magnética, utilizando sêmen fresco de cervos do gênero *Mazama*, avaliando a qualidade das células após o processo de seleção espermática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cervídeos do gênero *Mazama*

O gênero *Mazama* compreende espécies de pequenos cervídeos neotropicais e atualmente, das oito espécies de cervos conhecidas no Brasil, cinco delas são pertencentes a esse gênero, sendo elas *Mazama americana*, *Mazama gouazoubira*, *Mazama nemorivaga*, *Mazama nana* e *Mazama bororo*. Esta última foi descrita no Brasil somente nos últimos anos, confirmando que os estudos a respeito da taxonomia dos cervídeos neotropicais ainda são escassos (DUARTE e JORGE, 2003; MERINO e ROSSI, 2010).

2.1.1 *Mazama americana*

O veado-mateiro (*Mazama americana*) é o maior representante desse gênero podendo chegar até 45 quilos e altura variando de 58 a 80 centímetros. São encontrados em áreas com florestas densas e geralmente possuem pelagem marrom-avermelhada com áreas brancas dispersas em vários pontos do corpo (VARELA et al., 2010). É a espécie que tem maior distribuição no território brasileiro, sendo a região sul detentora da menor população devido à maior ação antrópica (DUARTE e REIS, 2012). O período reprodutivo dos machos de *M. americana* parece seguir a sazonalidade observada em outras espécies de cervídeos, mas ainda são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese (VERSIANI et al., 2009).

2.1.2 *Mazama gouazoubira*

Conhecida popularmente como veado-catingueiro, trata-se de uma pequena espécie de cervídeo, com animais tendo peso médio de 18 quilos, altura na cernelha chegando até 50 centímetros e com coloração extremamente variável de cinza escuro até marrom avermelhado (DUARTE, 1996). A espécie ocupa basicamente quase todo o território nacional e prefere áreas de vegetação baixa, como capoeiras, bordas de mata e matas em regeneração inicial (BLACK-DÉCIMA et al., 2010) e, apesar de ser o cervídeo brasileiro mais comum e numeroso, as

informações sobre sua reprodução e ecologia são muito escassas, o que dificulta o planejamento e emprego das ações de conservação. Outra ameaça à conservação dessa espécie é a destruição dos habitats e a caça, colocando os veados-catingueiros na Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção em algumas partes do país como vulneráveis ou em perigo (DUARTE e REIS, 2012; ICMBio, 2018).

2.1.3 *Mazama nemorivaga*

Também conhecida como veado-roxo, essa é considerada uma espécie de porte pequeno, pesando até 15 quilos e medindo cerca de 48 centímetros. A pelagem nesses animais é caracterizada por uma colocação cinza mesclada com amarelo, principalmente nas laterais do corpo (DUARTE, 1996). Seu habitat ainda é pouco conhecido, mas animais dessa espécie parecem preferir locais com vegetação dispersa e seca (BODMER, 1997). Até recentemente *M. nemorivaga* era considerada subespécie de *M. gouazoubira*, e só após estudos citogenéticos, moleculares e morfológicos mais aprofundados foi reconhecida como uma espécie e não uma subespécie (ROSSI, 2000; DUARTE et al., 2008).

2.2 Aspectos reprodutivos nos cervídeos machos

O aparelho reprodutivo dos cervídeos é similar ao dos ruminantes domésticos, sendo constituído por pênis fibroelástico, testículos e todas as estruturas internas comuns, glândulas vesiculares, bulbouretrais, ampolas e próstata (ZANETTI e DUARTE, 2014).

Alguns gêneros de cervídeos como *Ozotoceros* e *Blastocerus* apresentam ciclo reprodutivo sazonal com oscilação de acordo com o fotoperíodo, onde a concentração dos hormônios liberadores de gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante e luteinizante dependem diretamente do número de horas-luz. A troca de chifres, o desenvolvimento da circunferência escrotal e da musculatura do pescoço, bem como outras características sexuais secundárias, acompanham as mudanças endócrinas sazonais (ZÚCCARI e SERENO, 2006). No gênero *Mazama* essa sazonalidade ainda é questionável (ZÚCCARI e SERENO, 2006), mas segundo estudos de Garcia e Duarte (1994) sobre a relação do efeito sazonal e a qualidade seminal em *Mazama gouazoubira* macho sugerem uma pequena queda na qualidade seminal no período de setembro a novembro, compreendido entre o inverno e o verão, por isso estudos sobre os aspectos reprodutivos desses animais são extremamente importantes, para que biotécnicas possam ser aplicadas de forma eficaz.

Uma coloração avermelhada no ejaculado foi relatada em *Mazama nemorivaga*, porém não foi encontrada relação com hemoglobina ou hemácias nas amostras analisadas, sendo necessárias maiores investigações do plasma seminal para se conhecer a origem deste pigmento (PERONI et al., 2010; CURSINO, 2014).

2.3 Coleta seminal

Os dois métodos mais utilizados nos animais são a coleta através de vagina artificial e a coleta através de eletroejaculador. A coleta por vagina artificial consiste na utilização de um equipamento tubular com interior emborrachado, aquecido, onde é introduzido o pênis do animal no momento da coleta. O conteúdo ejaculado é depositado no recipiente coletor que fica acoplado a uma das extremidades da vagina artificial (HENRY e ECHEVERRI, 2013). A desvantagem deste método é a necessidade de treinamento dos animais, que pode ser de difícil adaptação, principalmente no caso de animais que têm pouco contato com o ser humano (ORTIZ DE MONTELLANO et al., 2007).

A coleta através de estimulação elétrica (eletroejaculação) consiste no uso de um sistema controlado de liberação de pulsos elétricos com intensidade e duração definidas de acordo com o protocolo para cada animal a ser coletado. Esses pulsos são liberados através de um eletrodo inserido via retal que estimulará o músculo uretral e estruturas próximas, como ampolas dos ductos deferentes e glândulas anexas adjacentes. A intensidade dos estímulos elétricos deve ser baixa e com pulsos intermitentes e, caso necessário, essa intensidade pode ser aumentada gradativamente. A principal desvantagem desse método é que os animais devem estar devidamente contidos para manter seu bem estar e normalmente a concentração do ejaculado obtido é mais diluído que amostras obtidas em situação fisiológica (HENRY e ECHEVERRI, 2013).

Para animais selvagens, o método mais empregado é a eletroejaculação, pois além da segurança para quem faz a coleta, permite coletar de animais não domesticados pois ela é associada a contenção química do animal. Porém, além da obtenção de um ejaculado mais diluído, a contenção química do animal, necessária para a coleta, pode trazer riscos de vida para o mesmo (WILDT, 1996). No caso dos cervídeos, além de todos os problemas citados acima, outro agravante é o estresse gerado na captura do animal, que pode desencadear a miopatia de captura, doença muscular degenerativa que pode levar o animal a óbito (BEDOTTI et al., 2004).

Uma alternativa que pode reduzir o estresse da captura e manejo de cervos de vida livre é o uso de manequins com vaginas artificiais para a coleta a campo (DUARTE e GARCIA, 1997). Para cervídeos de cativeiro, o treinamento para uso da técnica de desvio lateral do pênis para uma vagina artificial pode ser empregado com sucesso, como demonstrado por Giraldi e Duarte (2004), que obtiveram boas amostras de ejaculado de 75% dos animais utilizados no teste. Com esse método de coleta é possível obter amostras seminais com boa concentração e com menor risco de contaminação.

2.4 Qualidade do ejaculado

Para ser considerado de qualidade, o sêmen precisa ter um percentual mínimo de espermatozoides com motilidade, vigor e células normais. As membranas dos espermatozoides devem estar íntegras para que a cascata que leva até a fertilização possa ocorrer sem prejuízos (YANAGIMACHI, 1994; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).

Durante o processo de maturação que ocorre ao longo do epidídimo, os espermatozoides passam por modificações estruturais que os tornam susceptíveis às espécies reativas de oxigênio (EROS) presentes no lúmen desse túbulo que podem causar danos que afetam negativamente a motilidade e morfologia dos espermatozoides. (FOUCHÉCOURT et al., 2000; IRVINE et al., 2000; AITKEN e IULIIS, 2009; AITKEN et al., 2012). Espermatozoides com anomalias também produzem alta quantidade de EROS que podem degradar o DNA da célula, interferir no metabolismo energético e na função proteica, causando apoptose e morte celular, deixando o animal sub fértil ou infértil (ANGRIMANI et al., 2014; HOSEN et al., 2015; SABETI et al., 2016).

2.5 Avaliação do sêmen

2.5.1 Avaliação macroscópica do ejaculado

Na avaliação macroscópica, a primeira característica analisada é o volume do ejaculado, que pode sofrer alteração de acordo com o método de coleta e o intervalo de tempo entre as mesmas. A densidade celular e a cor também são avaliadas analisando o aspecto da amostra, que pode variar entre leitoso (alta quantidade de células), seroso ou aquoso, e a cor que pode ser classificada como branca, marfim, acinzentada ou amarela, podendo sofrer alterações em casos de enfermidades. Além dessas características, o odor ainda pode ser avaliado, sendo classificado como “sui generis” em situações fisiológicas (HENRY e ECHEVERRI, 2013).

2.5.2 Movimento de Massa ou Turbilhonamento

O turbilhonamento é definido como a formação de ondas causadas pelo intenso deslocamento de vários espermatozoides juntos. É uma análise subjetiva onde uma gota de sêmen fresco é colocado sobre uma lâmina em temperatura a 37° C e observada posteriormente em microscopia óptica de campo claro. A lamínula não é utilizada para não interferir no movimento. O turbilhonamento está diretamente ligado à concentração espermática, ou seja, quanto maior ela for, maior será o turbilhonamento (HENRY e ECHEVERRI, 2013).

2.5.3 Motilidade Espermática

A motilidade ou movimento progressivo, é adquirido pelos espermatozoides no processo de maturação espermática, e é necessária para que essas células consigam ascender pelo trato reprodutor feminino e realizar a fecundação do oócito (ROBAIRE e HINTON, 2015). É avaliada colocando uma gota de sêmen entre uma lâmina e lamínula, devidamente aquecidas e posteriormente observadas em microscopia óptica (HENRY e ECHEVERRI, 2013). Esta é uma análise subjetiva e quanto maior a experiência do avaliador e a quantidade de avaliações maior será a precisão do resultado, e apesar de ser habitualmente utilizada, pode ser substituída por avaliação automatizada, que assegura os valores corretos para a cinética espermática (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN et al., 2002, MATOS et al., 2008). Para ruminantes domésticos como os bovinos, a motilidade desejada em uma amostra seminal é maior ou igual a 70% (CBRA, 2013).

O sistema automatizado CASA (Computer Assisted Sperm Analyses) tem sido bastante empregado nas análises de motilidade. Através deste sistema é possível visualizar e digitalizar imagens de espermatozoides e obter informações confiáveis a respeito da cinética individual e global dessas células (AMANN e KATZ 2004).

2.5.4 Vigor

O vigor é avaliado juntamente com a motilidade espermática e consiste em analisar a força do movimento feito pela cauda do espermatozoide (HENRY e ECHEVERRI, 2013). De acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen Animal (CBRA, 2013), o vigor pode ser classificado de 1 a 5, sendo 1 “Exclusivamente oscilatório” e 5 “Progressivo retilíneo muito rápido”, sendo desejável para bovinos, sêmen com vigor acima de 3.

2.5.5 Concentração Espermática

A concentração espermática consiste em avaliar o número de espermatozoides por milímetro cúbico de sêmen, onde um volume de sêmen é diluído a fim de facilitar a contagem dos espermatozoides utilizando a câmara de Neubauer. É importante considerar o método de coleta do ejaculado, uma vez que em coleta por estimulação elétrica o ejaculado é mais diluído comparado ao coletado por vagina artificial ou aquele ejaculado em situação fisiológica (HENRY e ECHEVERRI, 2013).

2.5.6 Teste Supravital

O teste supravital é uma técnica simples que quantifica espermatozoides vivos e mortos na amostra através da utilização de corantes, como eosina-nigrosina. O corante consegue adentrar nos espermatozoides com membrana plasmática lesada, ou seja, aqueles mortos, ligando-se aos ácidos nucleicos e separando-os dos espermatozoides vivos. Para essa técnica, uma gota do corante previamente aquecido é misturada a uma gota de sêmen e o esfregaço é realizando, e após seca, a lâmina pode ser analisada utilizando microscopia (CBRA, 2013).

2.5.7 Morfologia Espermática

Amostras de sêmen com taxa elevada de espermatozoides anormais ou altas taxas de uma única anormalidade, podem reduzir significativamente a fertilidade da amostra, sendo essa correlação entre morfologia e fertilidade uma das mais importantes na avaliação seminal (HENRY e ECHEVERRI, 2013). A ocorrência de defeitos espermáticos pode estar ligada a alterações bruscas de temperatura do ambiente, umidade, idade do animal, manejo ou ainda devido à origem genética (PACHECO et al., 2007).

A avaliação da morfologia espermática pode ser feita através da microscopia óptica analisando lâminas coradas com esfregaços de sêmen ou através de preparação úmida, onde uma gotícula de sêmen é colocada entre lâmina e lamínula e posteriormente analisada em microscopia de contraste de fase ou de interferência. Para coloração das lâminas, diversos corantes podem ser utilizados, sendo comum o vermelho-congo (método Cerovsky), onde é feito um esfregaço de sêmen em lâmina de vidro que após secagem é submersa em solução saturada de vermelho congo por 1 minuto, faz-se o enxague da lâmina, e, após secagem, a mesma é submersa em violeta genciana a 0,5% por 30 segundos. Após novo enxague e secagem, a análise é feita com microscopia óptica. Para garantir resultados confiáveis, avalia-se pelo

menos 200 células por amostra e o valor obtido é dado em porcentagem das anormalidades das células (CBRA, 2013; HENRY e ECHEVERRI, 2013).

Os defeitos encontrados nas amostras seminais são listados individualmente, classificando-os de acordo com a região acometida, como defeitos de cabeça, de peça intermediária ou cauda, e classificando-os como defeitos maiores, que inclui a maioria dos defeitos de cabeça e peça intermediária e defeitos menores, que inclui cabeça delgada, cabeça isolada, inserção de cauda, cauda dobrada e gota citoplasmática distal (CBRA, 2013).

Animais silvestres, como os cervídeos, apresentam altas taxas de anormalidades espermáticas, sendo estas encontradas em animais de vida livre e de cativeiro. Assumpção et al. (2016) descreveram taxas de 70% e 74% de anormalidades em ducto deferente e cauda do epidídimo em *Mazama gouazoubira* de vida livre, enquanto Abreu et al. (2009) encontraram apenas 40,9% de espermatozoides anormais em exemplar de *Mazama nana* de cativeiro. Em *Mazama americana* de cativeiro, foram descritas as menores taxas de anormalidades espermáticas, 24,5% (ROLA et al., 2013).

2.6 Seleção Espermática

Algumas anormalidades não são facilmente identificadas com os métodos convencionais de análise citados anteriormente e podem causar impacto negativo na fecundação. Alterações nos espermatozoides como a externalização da fosfatidilserina, a ativação de caspases e a fragmentação de DNA são características marcadoras de apoptose celular que interferem na qualidade da amostra seminal (AZIZ et al., 2007; SAID et al., 2008; ARRIGHI et al., 2009; TAVALAEE et al., 2014).

Na tentativa de obter amostras seminais com maior número de espermatozoides viáveis, as técnicas de seleção espermática são cada vez mais empregadas, resultando em amostras com maior motilidade, menor quantidade de anormalidades e maior viabilidade (HENKEL e SHILL, 2003).

2.6.1 Separação espermática por centrifugação em gradientes de densidade (DGC)

Uma das técnicas utilizadas para separação e seleção de espermatozoides com morfologia e motilidade normais é a separação espermática em gradientes de densidade utilizando Percoll[®]. Essa técnica emprega gradientes de densidade de 90 e 45% em volumes reduzidos e após centrifugação, é possível a obtenção de uma fração de sêmen contendo

espermatozoides de alta qualidade (MACHADO, 2009).

2.6.2 Separação celular por ativação magnética (MACS)

A apoptose é a morte celular programada sem que exista ativação de cascata inflamatória (SHEN et al., 2002). Em células normais, o fosfolípido fosfatidilserina (FS) geralmente é encontrado no lado citosólico da membrana plasmática, e quando é externalizado de forma generalizada indica apoptose celular. Essa exposição pode ser útil no reconhecimento e remoção de células apoptóticas para melhorar a qualidade do ejaculado (VAN HEERDE, et al., 1995).

Algumas proteínas de ligação podem ser utilizadas para identificar células apoptóticas como a anexina V, proteína de ligação com alta afinidade para ligação com a fosfatidilserina. Essa proteína não atravessa membranas íntegras, portanto pode ser utilizada com grande eficácia para isolar espermatozoides que tiveram alguma alteração na membrana (VAN HEERDE, et al., 1995; GLANDER e SCHALLER, 1999; SAID et al., 2005).

É possível utilizar a separação celular por ativação magnética (MACS) para remover esses espermatozoides danificados. A anexina V, quando acoplada a microesferas marcadas magneticamente, se liga em espermatozoides que possuem a fosfatidilserina exposta devido a membrana plasmática lesada. Ao submeter estes conjugados a um campo magnético de alta potência em uma coluna de separação, eles irão aderir à coluna, enquanto que as células não apoptóticas e com membranas intactas não se ligam a anexina V e passarão livremente por ela. Esse filtrado possui espermatozoides não apoptóticos, que podem ser utilizados em programas de reprodução assistida com maior sucesso (SAID et al., 2006; TEIJEIRO et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados seis cervos machos, sendo dois veados-roxos (*Mazama nemorivaga*), dois veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) e dois veados-mateiros (*Mazama americana*), ilustrados na Figura 1 e pertencentes ao NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos) do departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp/Jaboticabal/SP (Autorização de manejo IBAMA nº 1/35/92/0882-5, SISBIO nº 482.508). Os cervos são mantidos em baias de alvenaria individuais de 8 a 12m², são expostos às variações de fotoperíodo, umidade e temperatura e são alimentados com até 500g/animal/dia de concentrado equino (Purina®; Omolene Tradicional) e até 1kg/animal/dia de volumosos

variando de folhas de soja (*Glycine max*), soja-perene (*Neonotonia wightii*), rami (*Boehmeria nivea*) ou amora (*Morus Alba*). A água é oferecida a todos os animais sem restrição.



Figura 1 – Fotografias de três espécies de cervídeos brasileiros do gênero *Mazama*. A) Veado-catingueiro (*M. gouazoubira*). B) Veado-roxo (*M. nemorivaga*). C) Veado-mateiro (*M. americana*).

Fonte: Duarte (1996).

3.2 Coleta e análise do sêmen

As coletas foram realizadas por eletroejaculação com os animais contidos quimicamente com Xilazina (1 mg/kg) e Cetamina (5 mg/kg) por via intramuscular, protocolo adaptado de Pinho et al. (2010). Foi realizada a limpeza do prepúcio (Figura 2A), retirada de fezes do reto e a estimulação dos animais foi feita com eletroejaculador (PT Electronics®, USA) seguindo protocolo de Duarte e Garcia (1995). O sêmen foi coletado em tubos Eppendorf estéreis de 2 mL (Figura 2B) e mantidos em banho-maria a 37° C.



Figura 2 – Fotografias da coleta de sêmen em um dos cervos. A) Limpeza do prepúcio. B) Obtenção do sêmen.

As análises físicas e morfológicas do sêmen foram realizadas seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Para avaliar motilidade e vigor, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas, e posteriormente avaliada sob microscopia óptica, classificando a motilidade de 0 a 100% e o vigor em escala de 0 a 5. Já a concentração foi mensurada com o auxílio da câmara de Neubauer.

A avaliação da morfologia espermática, foi feita pela técnica de lâmina corada pelo vermelho-congo (Cerovsky) (CBRA, 2013), onde foi feito um esfregaço delgado com uma gota de sêmen em lâmina de vidro, em seguida feita coloração e analisada no aumento de 1000x em microscópio óptico. Já a quantificação de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra (vivos) e membrana plasmática lesada (mortos), foi feita utilizando o teste supravital, onde uma lâmina foi preparada com uma gota de sêmen e uma de corante eosina-nigrosina (corante Botuvital[®], Botupharma, Botucatu, SP), foi feito o esfregaço e após a secagem, a avaliação foi feita utilizando microscopia óptica com contagem de 200 células espermáticas e registrando o número de vivos e mortos (CBRA, 2013; FAEZAH et al., 2014).

3.3 Separação espermática

As amostras seminais foram divididas em duas frações. A primeira fração foi submetida à separação espermática utilizando centrifugação por gradiente de densidade (Percoll[®]) (DGC). Foi preparada uma solução estoque de Percoll[®] (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), composta por Percoll[®] a 90% (pH 7,4; 280-290 mOsm/kg H₂O), em meio Eagle`s modificado por Dubelcco concentrado 10X (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) contendo 0,3% de albumina sérica bovina (BSA; Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) 10mg/L de antibiótico, 6mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) com pH ajustado a 7,4. Para formar o gradiente de densidade foram preparadas 2 camadas, sendo a inferior com 400 µL de Percoll[®] a 45% e a superior com 400 µL de Percoll[®] 90%, depositando acima desta 20 milhões de espermatozoides (Figura 3). Após essa preparação, os gradientes foram centrifugados a 900 g por 5 minutos. O sedimento contendo os espermatozoides foi diluído em 150 µl de HEPES para a análise celular (Missio et al., 2018, com modificações).

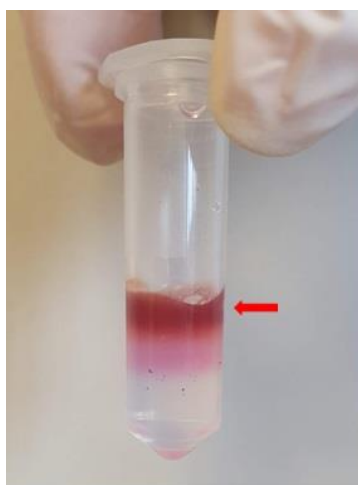


Figura 3 – Fotografia da amostra preparada para a separação espermática em gradiente de densidade Percoll[®]. Camada superior com pigmentação avermelhada (seta vermelha) do sêmen de *M. nemorivaga*.

A segunda fração das amostras do sêmen foi submetida a MACS, seguindo o protocolo modificado de Rawe et al. (2009). Uma amostra com 10 milhões de espermatozoides foi adicionada a 1,5 mL de tampão HEPES, com posterior centrifugação a 300 g por 10 minutos. O pellet formado foi colocado em 150 µL de HEPES e 20 µL de nanopartículas conjugadas com anexina V (Miltenyi Biotec, Alemanha). Essa mistura foi incubada por um período de 30 minutos em temperatura ambiente, e após esse período foi feita a filtração em coluna de separação magnética MiniMACS (Miltenyi Biotec, Alemanha) em temperatura de 37°C. O filtrado, ou fração não apoptótica, foi coletado diretamente da coluna em tubo de 2 mL.

Foram realizadas as análises de motilidade, vigor, morfologia dos espermatozoides e teste supravital das amostras obtidas após as técnicas de DGC e MACS.

3.4 Análise estatística

A análise descritiva dos resultados foi realizada utilizando a ferramenta Excel® (Microsoft Office®), onde foram obtidas as médias e desvio padrão das amostras estudadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de motilidade progressiva e vigor no sêmen fresco e após separação celular estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Motilidade progressiva (%) e vigor observados em sêmen fresco, pós DGC e pós MACS, em cervos do gênero *Mazama* (média ± DP).

	Amostra		
	Fresco	Pós DGC	Pós MACS
Motilidade Progressiva	75 ± 7,1	71,7 ± 10,8	8,3 ± 4,1
Vigor	2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,4	0,7 ± 0

A motilidade progressiva média obtida nas amostras de sêmen das três espécies após a DGC (71,7 ± 10,8%) foi discretamente menor em relação ao valor médio obtido nas amostras de sêmen fresco (75 ± 7,1%), porém o valor de motilidade pós MACS reduziu visivelmente (8,3 ± 4,1%). Os valores obtidos para sêmen fresco foram semelhantes aos valores encontrados para *Mazama nana* (70 ± 8,16%) (ABREU et al., 2009), *Mazama americana* (69.6 ± 8.92%) (ROLA et al., 2013), *Mazama gouazoubira* (80%) (PERONI, 2013), para *M. americana*, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* (75 ± 4.28%) (ASSUMPÇÃO et al., 2021a). Em contrapartida,

os valores obtidos ficaram relativamente abaixo dos resultados expostos por Chacur et al. (2014) e Cunha et al. (2021) em sêmen fresco de *Cervus unicolor* ($87,75 \pm 4,78\%$ a $90,00 \pm 7,07\%$) e de *M. gouazoubira* ($86,9 \pm 5,9\%$), respectivamente.

Estudos utilizando MACS para selecionar espermatozoides de boa qualidade em humanos (PAASCH et al., 2003; LEE et al., 2010; BERTELI et al., 2017), bovinos (ASSUMPÇÃO et al., 2021b) e em cervídeos (ASSUMPÇÃO et al., 2021a) também encontraram queda na motilidade progressiva pós processamento do sêmen na coluna de separação magnética. Grunewald et al. (2009) relacionaram essa queda de motilidade às diversas etapas de manipulação durante a preparação do sêmen em amostras com alto número de anormalidades espermáticas, bem como Agarwal et al. (1994) que expuseram que procedimentos como centrifugação e ressuspensão, bem como tempo prolongado em condições não fisiológicas podem causar geração de espécies reativas de oxigênio pelos espermatozoides, influenciando assim na qualidade dos mesmos.

Quanto ao vigor, os valores médios obtidos nas amostras de sêmen fresco e pós DGC foram semelhantes, enquanto que, após a técnica de MACS, todas as amostras tiveram queda importante no vigor das células espermáticas (Tabela 1). Cunha et al. (2021) e Peroni (2013) encontraram valores significativamente maiores para o vigor em sêmen fresco de *M. gouazoubira* ($4,4 \pm 0,5$ e 4 , respectivamente) e Alvarez et al., (2020) em sêmen de *M. americana* ($3,8 \pm 0,37$). Já Assumpção et al. (2021a) encontraram valores semelhantes para vigor de sêmen fresco ($2,83 \pm 0,16$), pós DGC ($2,5 \pm 0,22$) e pós MACS ($1,66 \pm 0,21$) em cervos do gênero *Mazama*.

Os resultados dos defeitos morfológicos individuais e totais nos espermatozoides estão expressos na Tabela 2, Figura 4 e Figura 5.

Tabela 2 – Média dos defeitos morfológicos individuais em espermatozoides de cervos do gênero *Mazama* observados em sêmen fresco, pós DGC e pós MACS (média ± DP).

Defeitos morfológicos (%)	Fresco	Pós DGC	Pós MACS
Subdesenvolvido	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,4
Cabeça isolada patológica	1,7 ± 2,8	0,6 ± 1,4	0,4 ± 0,8
Estreito na base	1,9 ± 4,0	0,9 ± 1,6	1,0 ± 2,4
Piriforme	0,1 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0
Contorno anormal	3,5 ± 6,0	3,5 ± 5,7	1,3 ± 1,5
Formas teratológicas	0 ± 0	0,1 ± 0,2	0 ± 0
Acrossoma	1,7 ± 2,1	1,1 ± 1,5	0,7 ± 0,6
Gota citoplas. proximal	2,3 ± 2,3	2,7 ± 3,9	5,6 ± 8,1
Pouch formation	0,3 ± 0,5	0 ± 0	0 ± 0
Corckscrew	0,1 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0
Pseudogota	0,1 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0
Outros defeitos de PI	0,2 ± 0,3	0,8 ± 1,1	0,4 ± 0,4
Cauda fortemente dobrada	4,4 ± 2,5	2,6 ± 1,4	1,2 ± 1,4
Total de defeitos maiores	16,3 ± 16,4	12,3 ± 11,1	10,7 ± 11,1
Cabeça delgada	0,9 ± 2,2	1,1 ± 2,4	0,3 ± 0,4
Pequeno normal	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0 ± 0
Curtos/Largos	0 ± 0	0,1 ± 0,2	0 ± 0
Abaxial	1,3 ± 0,9	1,2 ± 1,6	0,5 ± 0,8
Retroaxial	0,3 ± 0,6	0,2 ± 0,4	0,3 ± 0,4
Acrossoma desprendido	0 ± 0	0,1 ± 0,2	0 ± 0
Gota citoplas. distal	0 ± 0	1,6 ± 3,2	1,5 ± 3,0
Cauda dobrada	15,5 ± 10,9	6,2 ± 5,3	4,8 ± 4,1
Cauda enrolada	7,3 ± 5,7	1,4 ± 1,8	2,0 ± 1,4
Cabeça isolada normal	2,8 ± 3,3	3,1 ± 4,3	4,9 ± 6,1
Total de defeitos menores	28,2 ± 10,8	14,9 ± 7,5	14,2 ± 6,1
Defeitos totais (%)	44,5 ± 19,6	27,3 ± 18,0	24,8 ± 16,4

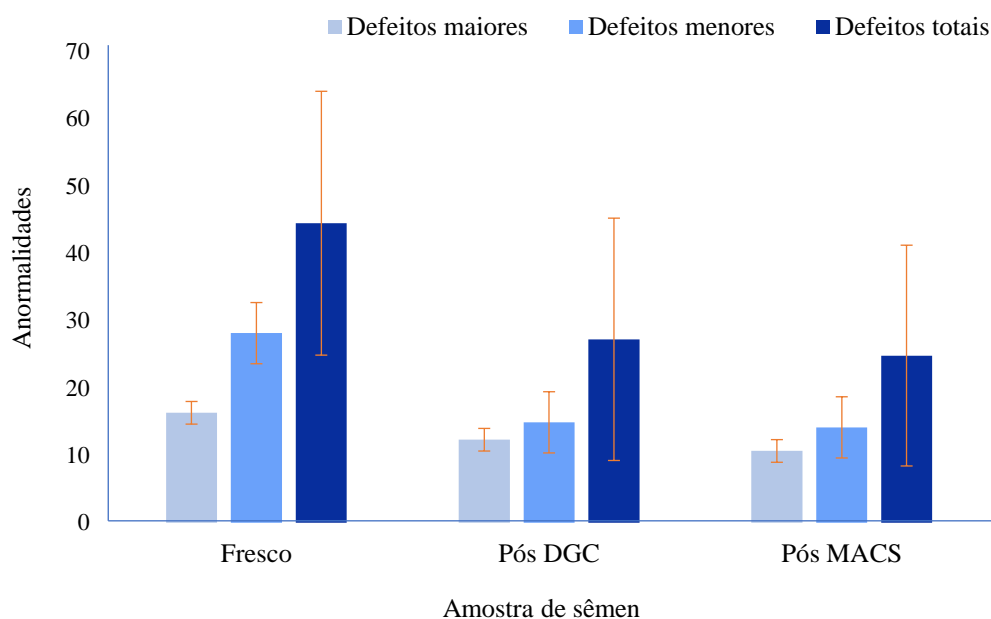


Figura 4 – Percentual médio de defeitos maiores e menores em sêmen fresco, sêmen pós separação espermática por técnica de DGC e pós MACS em cervos do gênero *Mazama*.

A média de defeitos maiores encontrados nas amostras de sêmen fresco, pós DGC e pós MACS foram, respectivamente, $16,3 \pm 16,4\%$, $12,3 \pm 11,1\%$ e $10,7 \pm 11,1\%$. Para defeitos menores, os valores médios obtidos foram $28,2 \pm 10,8\%$ para sêmen fresco, $14,9 \pm 7,5\%$ para as amostras pós DGC e $14,2 \pm 6,1\%$ para aquelas submetidas à MACS (Tabela 2 e Figura 4). Os valores de defeitos totais obtidos por Assumpção et al. (2021a) para as amostras frescas ($41,83 \pm 10,25\%$) foram semelhantes aos do presente estudo ($44,5 \pm 19,6\%$), porém obtiveram valores menores para as amostras pós DGC ($14,83 \pm 3,17\%$) e pós MACS ($12 \pm 3,01\%$) comparados aos demonstrados nesse trabalho ($27,3 \pm 18,0$ pós DGC e $24,8 \pm 16,4$ pós MACS) (Tabela 2).

As anormalidades como contorno anormal ($3,5 \pm 6,0\%$) (Figura 5E), gota citoplasmática proximal ($2,3 \pm 2,3\%$) (Figura 5F) e cauda fortemente dobrada ($4,4 \pm 2,5\%$) (Figura 5B) foram os defeitos maiores que tiveram maior percentual médio nas amostras de sêmen fresco e nas amostras pós seleção, e para defeitos menores, cauda dobrada ($15,5 \pm 10,9\%$), cauda enrolada ($7,3 \pm 5,7\%$), cabeça isolada normal ($2,8 \pm 3,3\%$) (Figura 5E) e gota citoplasmática distal ($1,6 \pm 3,2\%$) (Figura 5D) foram os defeitos individuais com maior percentual (Tabela 2).

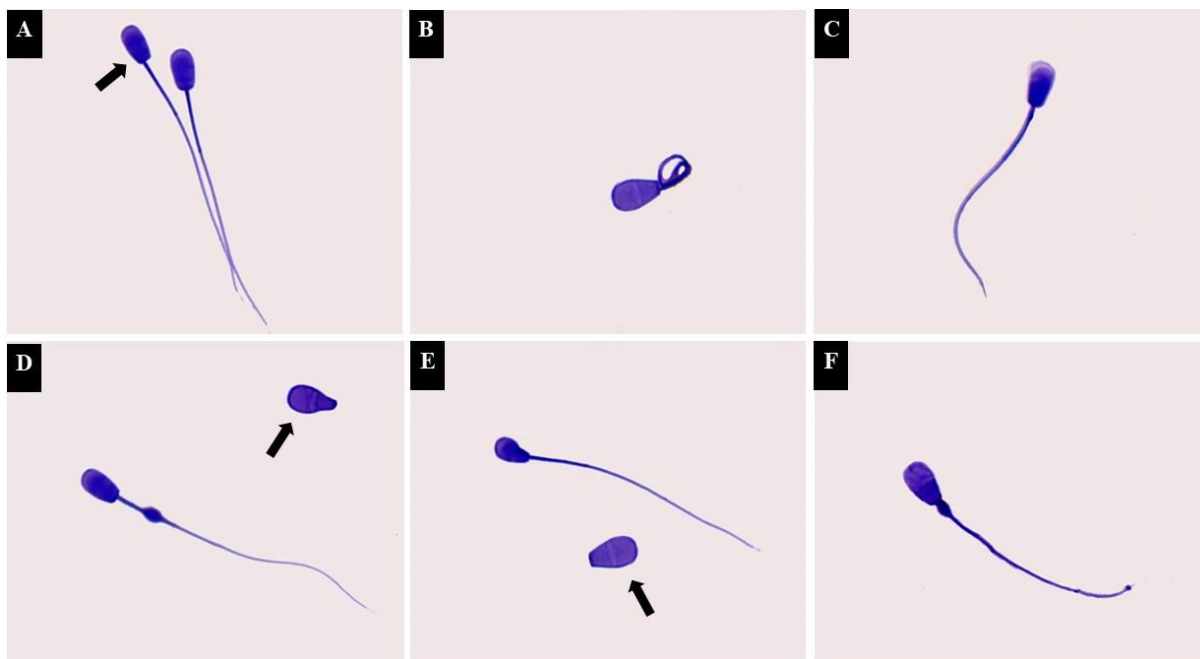


Figura 5 – Fotomicrografias de espermatozoides de cervos do gênero *Mazama* com alterações morfológicas. A) Espermatozoides normal e inserção abaxial (seta). B) Cauda fortemente dobrada. C) Acrossoma desprendido. D) Gota citoplasmática distal e cabeça isolada patológica (seta). E) Contorno anormal e cabeça isolada normal (seta). F) Gota citoplasmática proximal. Coloração vermelho-congo, aumento de 1000x.

O percentual de defeitos de cauda (cauda dobrada, enrolada e fortemente dobrada ou enrolada) reduziu pós DGC e pós MACS (Tabela 2), bem como defeitos de acrossoma e cabeça, corroborando com os resultados encontrados por Assumpção et al. (2021a) em sêmen de cervos do gênero *Mazama*. Aziz et al. (2007) também encontraram redução de defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda em sêmen humano após utilizar as técnicas de DGC e MACS combinadas, e em bovinos, Odhiambo et al. (2014) e Assumpção et al. (2021b) também obtiveram boa remoção de espermatozoides defeituosos das amostras selecionadas, demonstrando a eficácia das técnicas para seleção de boas amostras de sêmen.

A Figura 6 mostra os resultados do teste supravital observados no sêmen fresco, pós DGC e pós MACS.

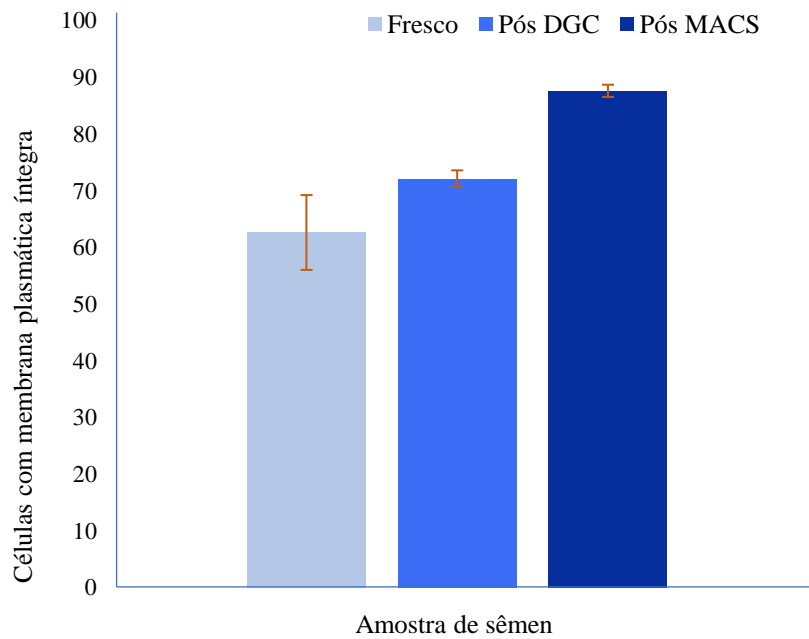


Figura 6 – Células espermáticas vivas observados no sêmen fresco, pós DGC e pós MACS em cervos do gênero *Mazama*.

O teste supravital mostrou que a quantidade de células com a membrana plasmática íntegra aumentou de forma gradual após o emprego de cada técnica de seleção avaliada (Figura 6). A técnica MACS foi eficaz na seleção de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra (Figura 7A), reduzindo em 25% os espermatozoides com membrana plasmática lesada (Figura 7B) na amostra selecionada ($37,3 \pm 6,6\%$ para $12,3 \pm 1,1\%$). Já a técnica de DGC, conseguiu reduzir em 9% ($37,3 \pm 6,6\%$ para $27,8 \pm 1,5\%$). Assumpção et al. (2021b) encontraram percentual menor de células vivas, pós DGC e pós MACS, porém Faezah et al. (2014) e Assumpção et al. (2021a) encontraram valor superior de espermatozoides com membrana plasmática intacta no teste supravital pós MACS, corroborando com os resultados do presente trabalho.

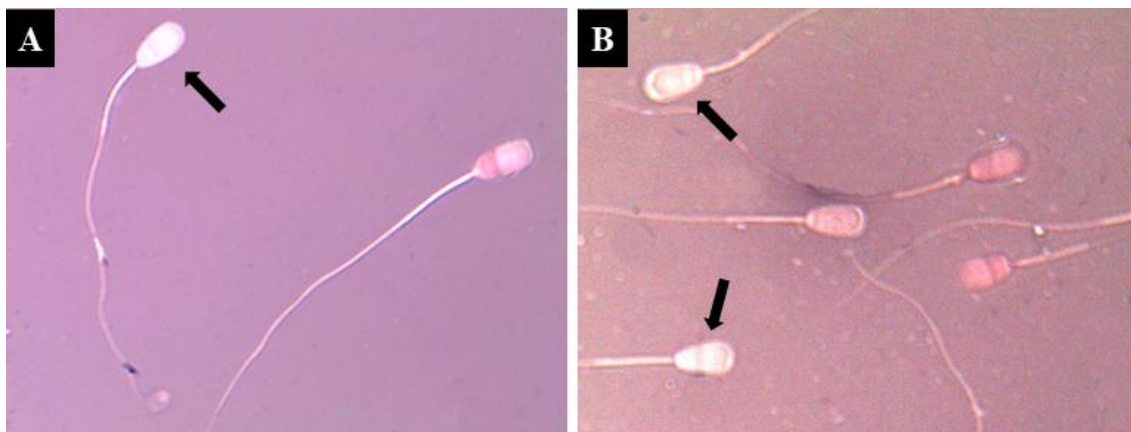


Figura 7 – Fotomicrografias espermatozoides de cervos do gênero *Mazama* com membrana plasmática lesada (corados) e espermatozoides com a membrana plasmática íntegra (setas). Coloração eosina-nigrosina. Aumento de 1000x.

Tavalaee et al. (2012) e Berteli et al. (2017) analisaram quatro métodos de seleção, DGC, MACS, DGC seguido de MACS e MACS seguido de DGC, e obtiveram melhores resultados quando combinaram dois métodos, sendo que, utilizando MACS seguido de DGC, Berteli et al. (2017) obtiveram amostras com maior percentual de espermatozoides com motilidade progressiva e morfologia normais. Neste estudo as técnicas foram empregadas de forma isolada, porém utilizar as duas em sinergia pode selecionar amostras com qualidade superior, como encontrado por Assumpção et al. (2021b), ao utilizar MAC e depois DGC na mesma amostra.

5 CONCLUSÃO

As técnicas de centrifugação em gradientes de densidade e separação celular por ativação magnética conseguiram selecionar espermatozoides de boa qualidade em cervídeos, sendo que a técnica de MACS teve uma maior eficácia nessa seleção, porém são necessários mais estudos para melhorar a eficiência das mesmas. Os achados sugerem que estes métodos nanotecnológicos são eficientes na produção de amostras de sêmen de qualidade elevada para uso em procedimentos de reprodução assistida em cervos do gênero *Mazama*.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. O.; MARTINEZ, A. C., DE MORAES, W., JUVENAL, J. C., MOREIRA, N. Características reprodutivas de veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 993-998, 2009.

AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K. R. Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. **Archives of Andrology**, v. 33, p. 157-162, 1994.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **MHR: Basic Science of Reproductive Medicine**, v. 16, n. 1, p. 3-13, 2009.

AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive oxygen species and sperm function - in sickness and in health. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, p. 1096-1106, 2012.

ALVAREZ, M. C., ROLA, L. D. E DUARTE, J. M. Comparison Between Three Cryoprotectants in the freezing of *Mazama americana* semen collected by artificial vagina. **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, n. 5, pág. 351-357, 2020.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Andrology lab corner*: Reflections on casa after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

ANGRIMANI, D. S. R., LUCIO, C. F., VEIGA, G. A. L., SILVA, L. C. G., REGAZZI, F. M., NICHI, M., VANNUCCHI, C. I. Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. **Andrologia**, v. 46, n. 7, p. 814-819, 2014.

ARRIGHI, V. C., LUCAS, H., CHARDONNENS, D., DE AGOSTINI, A. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2009.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.

ASSUMPÇÃO, T. I., SANTOS, A. L. Q., MACEDO, G. G., PEIXOTO, L. R., ZAMPINI, A. C. A. Coleta e avaliação morfológica dos espermatozoides epididimários de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814. **Investigação**, v. 15, n. 5, 2016.

ASSUMPÇÃO, T. I., SANTOS, A. L. Q., DUARTE, J. M. B., FOSCHINI, M., VIEIRA, C. S. Selection of high-quality sperms by the nanotechnological method of magnetic activation in brazilian cervids. **Journal of Zoological Research**, v. 3, n. 2, 2021a.

ASSUMPÇÃO, T. I., SEVERO, N. C., ZANDONAIDE, J. P. B., MACEDO, G. G. Magnetic-activated cell sorting improves high-quality spermatozoa in bovine semen. **Journal of Animal Reproduction and Biotechnology**, v. 36, n. 2, pág. 91-98, 2021b.

AZIZ, N., SAID, T., PAASCH, U., AGARWAL, A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1413-1419, 2007.

BEDOTTI, D. O., MEREB, G.; FORT, M. C.; MIRANDA, A.; ESAIN, F. Miopatia post captura em ciervo colorado. **Boletim de Divulgación**, Montevideo, n. 79, p. 130-134, 2004.

BERTELI, T. S., DA BROI, M. G., MARTINS, W. P., FERRIANI, R. A., NAVARRO, P. A. Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa. **Andrology**, v. 5, n. 4, p. 776-782, 2017.

BLACK-DÉCIMA, P., ROSSI, R. V., VOGLIOTTI, A., CARTES, J. L., MAFFEI, L., DUARTE, J. M. B., GONZÁLEZ, S., JULIÁ, J. P. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In: DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S. **Neotropical cervidology: biology and medicine of latin american deer**. Jaboticabal: Funep and Gland, Switzerland, cap. 22, p. 190-201, 2010.

BODMER, R. Ecologia e conservação dos veados-mateiro e catingueiro na Amazônia. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e conservação de cervídeos sulamericanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, p. 1-21, 1997.

BUCAR, S., GONÇALVES, A., ROCHA, E., BARROS, A., SOUSA, M., SÁ, R. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 1, p. 147-154, 2015.

CHACUR, M. G. M., MARTINS, E. A. F., SILVA, A. A. D., GUABERTO, L. M., GABRIEL FILHO, L. R. A., SANCHES, O. D. C., OBA, E. Morfometria corpórea, características do sêmen, proteínas seminais e testosterona em cervos *Cervus unicolor*, em cativeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1392-1400, 2014.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA, 104 p., 2013.

CUNHA, D. M. D. S. et al. Characterization of seminal parameters, sperm morphometry, micromorphology, and ultrastructure in gray brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814). **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 2, p. 313-325, 2021.

CURSINO, M. S. **Análise comparativa de características seminais de Mazama cinzas brasileiros: morfometria espermática e proteômica do plasma seminal**. xi, 82 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014.

DUARTE, J. M. B. *Artiodactyla: Cervidae* (Veado-catingueiro, Veado-campeiro, Cervo-do-pantanal). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. 1 ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, cap. 51, p. 641- 664, 2006.

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

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

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Tecnologia da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-americano: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Funep, Jaboticabal, p. 228-238, 1997.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 1, p. 17-22, 2008.

DUARTE, J. M. B; JORGE, W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. *Mammalia*, v. 67, n. 3, p. 403-410, 2003.

DUARTE, J. M. B; REIS, M. L. **Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de Extinção**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 128 p., 2012.

FAEZAH, S. S., ZURAINA, F. M., FARAH, J. H., KHAIRUL, O., HILWANI, N. I., ISWADI, M. I., FANG, C. N., ZAWAWI, I., ABAS, O. M., FATIMAH, S. I. The effects of magnetic separation on cryopreserved bovine spermatozoa motility, viability and cryo-capacitation status. *Zygote*, v. 22, n. 3, p. 378-386, 2014.

FOUCHÉCOURT, S., MÉTAYER, S., LOCATELLI, A., DACHEUX, F., DACHEUX, J. L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 6, p. 1790-1803, 2000.

GARCIA, J. E.; DUARTE, J. M. B. Variação anual do espermograma do veado-catingueiro, sob condições de cativeiro. *In: Anais 18 Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil*. Rio de Janeiro, SZB. p. 41, 1994.

GIRALDI, T.; DUARTE, J. M. B. Implantação e avaliação de métodos não invasivos para colheita de sêmen de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). *In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2004, Jaboticabal. Anais [...]*. Jaboticabal, São Paulo, p. 83, 2004.

GLANDER, H. J.; J. SCHALLER. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, v. 5, n. 2, p. 109-115, 1999.

GRUNEWALD, S. et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertility and sterility*, v. 92, n. 2, p. 572-577, 2009.

HENKEL, R.; SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, 2003.

HENRY, M.; ECHEVERRI, A. M. L. Coleta e avaliação seminal em animais domésticos. *In:* HENRY, M.; ECHEVERRI, A. M. L. **Andrologia Veterinária Básica**. Belo Horizonte: CAED-UFMG, cap. 10, p. 136-151, 2013.

HOLT, W. V.; BROWN, J. L.; COMIZZOLI, P. Reproductive science as an essential component of conservation biology. *In:* **Reproductive Sciences in Animal Conservation**. Springer, New York, NY, p. 3-14, 2014.

HOSEN, M. D. B., ISLAM, M. R., BEGUM, F., KABIR, Y., & HOWLADER, M. Z. H. Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 13, n. 9, p. 525, 2015.

ICMBio. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Lista de espécies ameaçadas**, 2018. Disponível em: www.icmbio.gov.br. Acesso em: 25 de out. 2020.

IRVINE, D., TWIGG, J. P., GORDON, E. L., FULTON, N., MILNE, P. A., AMANN, R. J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 33-44, 2000.

LEE, T. H., LIU, C. H., SHIH, Y. T., TSAO, H. M., HUANG, C. C., CHEN, H. H., LEE, M. S. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. **Human Reproduction**, v. 25, n. 4, p. 839-846, 2010.

MATOS, D. L., ARAÚJO, A. A., ROBERTO, I. G., TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MERINO, M. L.; ROSSI, R. V. Origin, systematics, and morphological radiation. *In:* DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S. **Neotropical cervidology: biology and medicine of latin american deer**. Jaboticabal: Funep and Gland, Switzerland, cap. 1, p. 2-11, 2010.

MITTERMEIER, R. A., FONSECA, G. D., RYLANDS, A. B., BRANDON, K. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 14-21, 2005.

ODHIAMBO, J. F., DEJARNETTE, J. M., GEARY, T. W., KENNEDY, C. E., SUAREZ, S. S., SUTOVSKY, M., SUTOVSKY, P. Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 4, p. 97, 1-10, 2014.

ORTIZ-DE-MONTELLANO, M., GALINDO-MALDONADO, F., CAVAZOS-ARIZPE, E. O., AGUAYO-ARCEO, A. M., TORRES-ACOSTA, J. F. J., ORIHUELA, A. Effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response of Criollo goats (*Capra hircus*). **Small Ruminant Research**, v. 69, n. 1-3, p. 228-231, 2007.

PACHECO, A., QUIRINO, C. R., SILVA, J. F. S., DA CUNHA, I. C. N., BUCHER, C. H. Efeito da idade e de fazenda sobre as características seminais e perímetro escrotal em touros da raça Guzerá criados no norte e noroeste do Rio de Janeiro/Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 15, n. 4, 2007.

PAASCH, U., GRUNEWALD, S., FITZL, G., GLANDER, H. J. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 24, n. 2, p. 246-252, 2003.

PERONI, E. D. F. C. **Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia em veado catiingueiro (*Mazama gouazoubira*), com sêmen congelado** [M]. 56p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2013.

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

PINHO, M. P.; MUNERATO, M. S.; NUNES, A. L. V. Anesthesia and chemical immobilization. In: DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S. (Eds.). **Neotropical cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: Funep/IUCN. p. 228-339, 2010.

RAWE, V., ÁLVAREZ, G., URIONDO, H., PAPIER, S., MIASNIK, S., NODAR, F. Separación magnética por columnas de anexinas V: “filtrado molecular” para la selección de espermatozoides no apoptóticos. **Reproducción**, v. 24, p. 104-14, 2009.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. The Epididymis. *In*: PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)**. San Diego: Academic Press, p.691-771, 2015.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos in vivo and in vitro. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 25, n. 1, p. 108-126, 1997.

ROLA, L. D.; DOS SANTOS ZANETTI, E.; DUARTE, J. M. B. Evaluation of semen characteristics of the species *Mazama americana* in captivity. **Animal Production Science**, v. 53, n. 5, p. 472-477, 2013.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de *Mazama Rafinesque, 1817* do Brasil (*Artiodactyla, Cervidae*)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SABETI, P., POURMASUMI, S., RAHIMINIA, T., AKYASH, F., TALEBI, A. R. Etiologies of sperm oxidative stress. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 14, n. 4, p. 231, 2016.

SAID, T. M., AGARWAL, A., ZBOROWSKI, M., GRUNEWALD, S., GLANDER, H. J., PAASCH, U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. **Journal of Andrology**, v. 29, p. 134–142, 2008.

SAID, T. M., PAASCH, U., GRUNEWALD, S., RASCH, M., GLANDER, H., AGARWAL, A. Sperm recovery evaluation following magnetic cell sorting. **Fertility and Sterility**, v. 84, p. S207, 2005.

SAID, T. M., POURMASUMI, S., RAHIMINIA, T., AKYASH, F., TALEBI, A. R. P-985: Association of early apoptosis with the nuclear integrity and maturity in different seminal fractions. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 3, p. S499, 2006.

SHEN, H. M., DAI, J., CHIA, S. E., LIM, A., ONG, C. N. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. **Human Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 1266-1273, 2002.

TAVALAEE, M., DEEMEH, M. R., ARBABIAN, M., NASR-ESFAHANI, M. H. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more

useful for clinical sperm selection? **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 29, n. 1, p. 31-38, 2012.

TAVALAEE, M., DEEMEH, M. R., ARBABIAN, M., KIYANI, A., NASR-ESFAHANI, M. H. Relationship between fertilization rate and early apoptosis in sperm population of infertile individuals. **Andrologia**, v. 46, n. 1, p. 36-41, 2014.

TEIJEIRO, J. M., MUNUCE, M. J., CAILLE, A. M., ZUMOFFEN, C., MARINI, P. E. Use of annexin V based sperm selection in assisted reproduction. **Andrology**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2017.

VAN HEERDE, W. L., DE GROOT, P. G., REUTELINGSPERGER, C. P. M. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 74, n. 2, p. 172-179, 1995.

VARELA, D. M., TROVATI, R. G., GUZMÁN, K. R., ROSSI, R. V., DUARTE, J. M. B., GONZÁLEZ, S. Red brocket deer *Mazama americana* (Erxleben, 1777). In: DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S. **Neotropical cervidology: biology and medicine of latin american deer**. Jaboticabal: Funep and Gland, Switzerland, cap. 15, p. 151-159, 2010.

VERSIANI, N. F.; PEREIRA, R. J. G.; DUARTE, J. M. B. Annual variations in fecal androgen metabolites and antler cycle of captive red brocket bucks (*Mazama americana*) in southeast Brazil. **European Journal of Wildlife Research**, v. 55, n. 5, p. 535-538, 2009.

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

WILDT, D. E. Male reproduction: assessment, management, and control of fertility. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S. **Wild Mammals in Captivity**. University of Chicago Press, Chicago, p. 129-150, 1996.

WILDT, D. E., COMIZZOLI, P., PUKAZHENTHI, B., SONGSASEN, N. Lessons from biodiversity - the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 77, n. 5, p. 397-409, 2010.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, p.189-317, 1994.

ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Reprodução e Obstetrícia em Cervídeos Neotropicais. *In:* CUBAS, Z. S; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. 2 ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, cap. 124, p. 2301-2320, 2014.

ZÚCCARI, C. E. S. N.; SERENO, J. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas à conservação de cervídeos. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.