

**CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN, DO PLASMA SEMINAL E CONCENTRAÇÃO
SÉRICA DE TESTOSTERONA EM CERVO SAMBAR (*Cervus unicolor*) EM
CATIVEIRO NA PRIMAVERA**

ELLYN AMANDA FONSECA MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN, DO PLASMA SEMINAL E CONCENTRAÇÃO
SÉRICA DE TESTOSTERONA EM CERVO SAMBAR (*Cervus unicolor*) EM
CATIVEIRO NA PRIMAVERA**

ELLYN AMANDA FONSECA MARTINS

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal. - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador:
Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

636.294 M386a	<p>Martins, Ellyn Amanda Fonseca Caracterização do sêmen, do plasma seminal e concentração sérica de testosterona em cervo sambar (<i>Cervus unicolor</i>) em cativeiro na primavera / Ellyn Amanda Fonseca Martins. – Presidente Prudente, 2012. 42 f.: il.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2012. Bibliografia.</p> <p>1. Cervos. 2. Sêmen. 3. Testosterona. I. Título.</p>
------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ELLYN AMANDA FONSECA MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN, DO PLASMA SEMINAL E CONCENTRAÇÃO
SÉRICA DE TESTOSTERONA EM CERVO SAMBAR (*Cervus unicolor*) EM
CATIVEIRO NA PRIMAVERA**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 20 de setembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,
Presidente Prudente - SP

Banca: Prof^a. Dr^a. Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,
Presidente Prudente - SP

Banca: Prof^a. Dr^a. Sandra H. Gabaldi Wolf
Faculdades Adamantineses Integradas - FAI
Adamantina - SP

DEDICATÓRIA

A DEUS, por guiar meu caminho e estar sempre presente em minha vida me fortalecendo nas minhas horas de fraqueza.

Aos Meus Pais Antônia e Faustino, que me proporcionaram uma vida digna onde eu pudesse crescer e acreditar que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação continua em nossas vidas; que sonhar e caracterizar os sonhos só dependerá de nossa vontade.

Ao meu irmão Rômulo, pela amizade que nos mantém unidos hoje e sempre.

Ao meu amado filho Miguel por ser a minha maior inspiração para lutar cada vez mais pelos meus objetivos.

Ao meu Professor e Orientador Dr. Marcelo George Mungai Chacur pela compreensão constante, pela confiança, pelo incentivo e generosidade de partilhar sua sabedoria e conhecimento. Obrigado pela oportunidade e honra de ser sua orientada.

AGRADECIMENTOS

A Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Programa de mestrado em Ciência Animal e ao Curso de Medicina Veterinária.

Ao Zoológico de Presidente Prudente pelo apoio nesse trabalho.

Aos Professores Dra. Eunice Oba, Dr. Luciana Machado Guaberto, Dr. Rogério Giuffrida e Dr. Osimar Sanches.

A colega de mestrado e amiga Aline Aparecida da Silva, obrigado pela colaboração, incentivo e apoio para com o meu trabalho.

Ao funcionário do zoológico Jair Florentino pela colaboração através de sua destreza dentro de sua prática em realizar as capturas dos cervos e a dedicação para com os mesmos.

“[...]Ninguém se desanime, nem pela falta de prêmio, nem pela baixeza do nascimento, cada um é capaz de fazer-se nobre, este é o segundo nascimento que depende do próprio valor, e em que se nasce, não para uma vida breve, mas sim para a eternidade de um grande nome.[...]”.

Domingo Loreto Couto, 1981, p. 140.

RESUMO

Caracterização do sêmen, do plasma seminal e concentração sérica de testosterona em cervo sambar (*Cervus unicolor*) em cativeiro na primavera

O objetivo do trabalho foi avaliar o quadro espermático e protéico do plasma seminal e o perfil endócrino, em cervos criados em cativeiro. Quatro machos com idades entre 12 e 36 meses foram avaliados. Em quatro momentos com intervalos de sete dias, obteve-se o peso (60,5 a 89,0 kg) e o índice de massa corporal ($93,07 \text{ kg/m}^2$ a $126,56 \text{ kg/m}^2$). Foram realizadas quatro colheitas de sêmen por animal, com intervalo de sete dias, por meio de eletroejaculador. Obteve-se os seguintes valores: volume do ejaculado ($0,50 \pm 0,35 \text{ mL}$ a $0,75 \pm 0,28 \text{ mL}$), motilidade espermática ($87,75 \pm 4,78\%$ a $90,00 \pm 7,07\%$), defeitos totais ($17,25 \pm 5,81\%$ a $47,72 \pm 17,55\%$) e testosterona plasmática ($6,43 \pm 4,33 \text{ ng/dL}$ a $166,00 \pm 64,48 \text{ ng/dL}$). A eletroforese em SDS-PAGE revelou bandas proteicas entre 7,6 kDa e 142 kDa. O plasma seminal apresentou uma grande gama de proteínas entre 7,6 kDa e 142 kDa. A idade influi na concentração de testosterona, sendo essa maior na faixa dos 36 meses.

Palavras-chave: Cervo. Morfometria corpórea. Sêmen. Proteínas do plasma seminal. Testosterona.

ABSTRACT

Characterization semen, of seminal plasma and concentration serum testosterone in sambar deer (*Cervus unicolor*) in captivity in the spring

The objective of this study was to evaluate the framework sperm and protein seminal plasma and endocrine profile in deer bred in captivity. Four males aged between 12 and 36 months were evaluated. In four times at intervals of seven days, gave the weight (60.5 to 89.0 kg) and body mass index (93.07 kg/m² to 126.56 kg/m²). There were four semen samples per animal, with an interval of seven days, by electroejaculation. Gave the following values: ejaculate volume (0.50 ± 0.35 ml to 0.75 ± 0.28 ml), motility (87.75 ± 4.78% to 90.00 ± 7.07%) total defects (17.25 ± 5.81% and 47.72 ± 17.55%) and plasma testosterone (6.43 ± 4.33 ng/dL at 166.00 ± 64.48 ng/dL). Electrophoresis on SDS-PAGE revealed protein bands between 7.6 kDa and 142 kDa. Seminal plasma showed a wide range of proteins between 7.6 kDa and 142 kDa. Age influences the testosterone concentration, being higher in the range of 36 months.

Keywords: Deer. Body morphometry. Semen. Seminal plasma proteins. Testosterone.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP – Proteína Carreadora de Andrógeno
DHT – Diidrotestosterona
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GAGs – Glicosaminoglicanas
HE – Hematoxilina-eosina
IEF – Focalização Isoelétrica
IMC – Índice de Massa Corpóreo
kDa – Kilodalton
Kg – quilograma
LH – Hormônio Luteinizante
NaCl – Cloreto de Sódio
RIA – Radioimunoensaio
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
TeBG – Globulina Ligada à Testosterona
TRIS HCl – Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Fisiologia Reprodutiva dos Cervídeos	12
2.1.1 Idade à puberdade	12
2.1.2 Características gerais dos testículos	13
2.1.3 Células de Sertoli	13
2.1.4 Células de Leydig	15
2.1.5 Testosterona	16
2.2 Proteínas do Plasma Seminal	17
REFERÊNCIAS	20
3 ARTIGO CIENTÍFICO	24
ANEXO	38

1 INTRODUÇÃO

A família *Cervidae*, da qual fazem parte os veados, pertencem à ordem *Artiodactyla* (MAIA, 1993) e se caracterizam por possuir quatro dedos, sendo o terceiro e o quarto são funcionais, estando atrofiados o segundo e o quinto dedos e recobertos por tecido queratinoso, dão origem ao casco (WALKER, 1991). São os ruminantes selvagens mais disseminados no mundo, sendo encontrados em quase todo o continente, exceto na Antártida (VAN SOEST, 1994). Existem 19 gêneros, 52 espécies distribuídas nas Américas, Europa, Ásia e África. Porém, o cervo sambar vive nas encostas das florestas do Sri Lanka, Índia, Sul da China, Taiwan, Malásia, Indonésia e Filipinas. Foi introduzido na Nova Zelândia, na Austrália e na Flórida (WILSON; REEDER, 2005).

Os cervídeos possuem várias glândulas odoríferas que desempenham importante papel na comunicação entre exemplares da mesma espécie. Estão localizadas na região nasal, pré-orbitais, metatarsais, tarsais e interdigitais. Todos os cervídeos apresentam olfato, audição e visão muito desenvolvidos (DUARTE; MERINO, 1997).

O período de gestação é de aproximadamente oito meses, as fêmeas são uníparas e suas crias nascem com a mesma pelagem dos exemplares adultos que chegam a pesar entre 100 e 130 kg (GARDNER, 1971). Durante o Inverno, machos e fêmeas vivem completamente separados. As manadas de machos não têm, nesta altura, quaisquer laços com o seu território, sendo este mais um local de refúgio contra o mau tempo. A partir do princípio de Setembro, com o início da época do estro (conhecida como Brama), as manadas de machos iniciam o deslocamento para os territórios de Inverno das fêmeas ou para um local vizinho, escolhido pelas suas comodidades e que o veado julga necessárias para proteger o seu harém, atacando as fêmeas com o seu chamamento característico, um bramido estridente, que varia com a idade do animal e o seu estado de excitação e que significa que o macho está na fase de delimitação do território. As fêmeas não só se deixam atrair, como procuram elas mesmas os locais de estro. Mesmo neste período, as fêmeas mantêm a sua organização social, não estabelecendo qualquer ligação especial com o macho. Assim em caso de necessidade de fuga, as fêmeas fogem ordenadamente, enquanto os machos tentam escapar individualmente. Constituem-se, então, manadas mistas, de composição variável e à volta das quais qualquer

veado que se aproxima é imediatamente afastado pelo macho dominante. Os combates são raros, mas por vezes muito violentos, podendo provocar a morte dos intervenientes por não conseguirem 'desenganchar' as hastes (COUCELO, 1986)

Características secundárias como a troca de chifres e o desenvolvimento da musculatura do pescoço acompanham as variações endócrinas sazonais, ocorrendo o mesmo com a circunferência escrotal (CABRERA; YEPES, 1960). Segundo Sttalings (1986), parece haver um padrão individual de troca de galhadas, sem contudo estar associado às variações do fotoperíodo e é provável que a ausência de um padrão reprodutivo sazonal esteja relacionada às particularidades ambientais da região.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia Reprodutiva dos Cervídeos

2.1.1 Idade à puberdade

Pocay et al. (2001) relataram que as características fisiológicas (crescimento testicular, secreção de hormônio luteinizante e testosterona) sofrem efeitos, que a idade a puberdade é influenciada pelo ambiente físico, fotoperiodismo, idade a partir dos doze meses e que os fatores ambientais são estressantes para o animal, alterando as características fisiológicas. Essa fase na reprodução caracteriza-se como a idade em que ocorre rápido crescimento testicular, mudanças no modelo de secreção do hormônio luteinizante, que acarreta gradual incremento da testosterona sanguínea e, como conseqüência, a iniciação da espermatogênese. A puberdade é um processo lábil, que se sujeita a numerosos fatores ambientes, externos e internos, que interagem e influenciam o sistema nervoso central a modular o sistema endócrino e, por conseguinte, alterar a idade cronológica na qual o animal a manifesta (AMANN; SCHAMBACHER, 1983).

2.1.2 Características gerais dos testículos

Muito embora no embrião os testículos se desenvolvam a partir das gônadas indiferenciadas, situadas no abdômen, eles migram a fim de se localizar durante a vida extra-uterina, no escroto. Da mesma forma que os ovários, os testículos têm dupla função: produzem células germinativas e secretam hormônio sexual. As células germinativas ou gametas masculinos são chamados *espermatozoides* (*sperma* = semente; *zoon* = animal). Denominam-se genericamente *androgênios* (*aner* = homen; *gennaio* = produto) essas substâncias possuem atividade de hormônios sexuais masculinos (DUKES, 1993).

O tamanho relativo dos testículos pode oferecer informações importantes quanto ao sistema de acasalamento e até mesmo quanto à fisiologia reprodutiva (KENAGY; TROMBULAK, 1986; PAULA, 1999). Parâmetros quantitativos diretamente relacionados com o túbulo seminífero, com o diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos, apresentam uma relação positiva com a atividade espermatogênica, fornecendo informações para o estabelecimento da mesma em uma dada espécie (FRANÇA; RUSSELL, 1998; PAULA, 1999). As mensurações tubulares são abordagens utilizadas como indicadores da atividade da espermatogênica em investigação envolvendo a função testicular (FRANÇA; RUSSELL, 1998).

2.1.3 Células de Sertoli

O epitélio seminífero compõe-se de várias camadas de gerações distintas de células germinativas, sustentadas morfológicamente por um tipo de célula somática denominada de célula de Sertoli. Na camada basal do epitélio seminífero observam-se as espermatogônias e espermatócitos primários iniciais. Na camada adluminal observam-se as gerações de espermatócitos mais desenvolvidos, espermatócitos secundários e as espermátides (RUSSEL et al., 1990). As espermatogônias podem ser classificadas em duas categorias básicas, espermatogônias diferenciadas e indiferenciadas. As espermatogônias isoladas (A_{is}), pareadas (A_{pr}), alinhadas (A_{al}) pertencem à primeira categoria. As espermatogônias do tipo A, espermatogônias internemediárias (In) e espermatogônias do tipo B pertencem à segunda categoria e estão relacionadas com a formação de

espermatozóides (DE ROOIJ, 1998). As espermatogônias podem ser identificadas com base na morfologia, dinâmica e volume do núcleo, número de nucléolos, posição topográfica em relação a outras células e à lâmina basal, e a disposição do cromossomo durante a divisão (CLERMONT; ANTAR, 1973).

Esta série de divisões celulares, incluindo a proliferação das espermatogônias e das divisões meióticas, é conhecida por espermatocitogênese, na qual, durante o desenvolvimento embrionário, células germinativas primordiais especiais migram da região do saco vitelínico do embrião para as gônadas indiferenciadas (HAFEZ; GARNER, 2004). A meiose compreende em duas divisões: células de primeira divisão que são os espermatócitos primários (I) e os de segunda divisão, que são os espermatócitos secundários (II). Os espermatócitos (I) são as maiores células da linhagem espermatogênica e caracterizam-se pela presença de cromossomos em diferentes fases de condensação. Os espermatócitos (II) ficam mais próximos da luz dos túbulos seminíferos, sendo difícil observá-los em corte histológico, pois entram logo na segunda divisão meiótica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; KIERSZENBAUM, 2008). As células haplóides resultantes deste processo são chamadas de espermátides. As espermátides, então, sofrem uma série progressiva de modificações estruturais e de desenvolvimento, dando origem aos espermatozóides. Estas modificações metamórficas são conhecidas por espermiogênese, as modificações incluem condensação da cromatina nuclear, formação da cauda do espermatozóide ou aparelho flagelar e desenvolvimento do capuchão acrossomático (HAFEZ; GARNER, 2004). No entanto, fica bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos dos testículos, principalmente as células de Sertoli, as células de Leydig e as células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (SKINNER, 1991; DADOUNE; DEMOULIN, 1993; JÉGOU, 1993; SPITERI-GRECH; NIESCHLAG, 1993; PESCOVITIZ et al., 1994; FRANÇA; RUSSELL, 1998).

Os espermatozóides deixam o testículo pelos ductos eferentes e vão em direção ao ducto espiralado do epidídimo, que continua com o ducto deferente. As glândulas acessórias eliminam seus conteúdos no ducto deferente ou na porção pélvica da uretra (HAFEZ; GARNER, 2004).

A espermatogênese é um processo cíclico no qual os gonócitos, primeiras células germinativas a habitarem os túbulos seminíferos, multiplicam-se e

diferenciam-se em espermatogônias. A última geração destas células, formada pelas espermatogônias B, sofre meiose, formando os espermatócitos primários e as espermátides arredondadas, que se diferenciam em espermatozóides (GRIFFIN, 1988; CURTIS; AMANN, 1981; COUROT; HOCHEREAU RIVIERS; ORTAVANT, 1970; RUSSELL et al., 1994).

O desenvolvimento da espermatogênese depende do suporte funcional das células de Sertoli, dos níveis adequados de esteróides, gonadotrofinas e de fatores de crescimento (SHARPE, 1994).

A organização geral da espermatogênese é basicamente a mesma para todos os mamíferos. A espermatogênese é um processo sincrônico, no qual a espermatogônia (célula diplóide) se diferencia gradativamente em uma célula haplóide altamente especializada, o espermatozóide. Esse processo pode ser dividido em três fases, de acordo com as diferentes características funcionais: (1) fase proliferativa, na qual as espermagônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é recombinado e segregado; (3) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por mudanças estruturais e bioquímicas e diferenciam-se em espermatozóide, um tipo celular estruturalmente especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (RUSSELL et al., 1990; SHARPE., 1994).

2.1.4 Células de Leydig

Encontram-se em íntimo contato com sistema de capilares (DADOUNE; DEMOULIN, 1993) e sua principal função é a produção de testosterona, que é importante para o desenvolvimento e a manutenção da espermatogênese e das características masculinas (O'DONNELL et al., 2001). A produção de testosterona pelas células de Leydig é controlada pelo LH. Aumentos na secreção de LH são seguidos, dentro de 30 (trinta) e 60 (sessenta) minutos, por níveis aumentados de testosterona que duram de uma a várias horas (STANBENFELDT; EDQVIST, 1996). O LH liga-se especialmente a membrana das células de Leydig e ativa a adenosina-monofosfato cíclica (HUHTANIEMI; TOPPARI, 1995). Este processo dá início à ativação das proteínas cinases que catalizam a fosforilação das proteínas intracelulares e mobilização de precursores dos esteróides, principalmente através da conversão do colesterol até pregnenolona

(STANBENFELD; EDQVIST, 1996). O LH também tem efeito trófico sobre as células de Leydig, visto que a remoção do mesmo cessa a produção de testosterona e leva a grande redução no tamanho nas células de Leydig (STANBENFELD; EDQVIST, 1996; GOODMAN, 2000). Altas concentrações são necessárias para a espermatogênese e especialmente para o processo de meiose. A ação dos andrógenos na espermatogênese acontece via células de Sertoli, já que as células germinativas não possuem receptores para andrógenos (LYU; HANDELSMAN, 2003).

Inúmeros fatores podem influenciar na quantidade de células de Leydig por animal, dentre os quais podem ser destacados a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH por célula, a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar por unidade de tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos sanguíneos e fluidos seminais, o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (RUSSELL et al., 1994; RUSSELL, 1996).

2.1.5 Testosterona

A secreção de testosterona pelas células de Leydig está sob o controle do LH. A secreção do LH, por sua vez, é controlada pela liberação episódica do hormônio liberador de gonadotrofina GnRH (DUKES, 1993).

Embora grande parte da testosterona secretada para dentro dos túbulos seminíferos seja convertida em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α -esteróide redutase, uma certa quantidade é convertida em estrógeno pela enzima aromatase. Um nível relativamente alto de testosterona é necessário para a maturação das espermátides e manutenção da espermatogênese (HAFEZ; JAINUDEEN; ROSNINA, 2004).

A proteína ligadora de andrógeno (ABP) tem uma grande afinidade pela testosterona e diidrotestosterona (DADOUNE; DEMOULIN, 1993) e promove uma concentração de andrógenos intratesticular impedindo além do limite de sua solubilidade (DADOUNE; DEMOULIN, 1993; STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

A testosterona faz com que os testículos cresçam, devendo estar presente, também, junto com o FSH, antes que a espermatogênese se complete.

Depois que um feto começa a se desenvolver no útero materno, seus testículos começam a secretar testosterona, quando tem poucas semanas de vida apenas. Essa testosterona, então, auxilia o feto a desenvolver órgãos sexuais masculinos e características secundárias masculinas. Isto é, acelera a formação do pênis, da bolsa escrotal, da próstata, das vesículas seminais, dos ductos deferentes e dos outros órgãos sexuais masculinos. Além disso, a testosterona faz com que os testículos desçam da cavidade abdominal para a bolsa escrotal; se a produção de testosterona pelo feto é insuficiente, os testículos não conseguem descer; permanecem na cavidade abdominal. A secreção da testosterona pelos testículos fetais é estimulada por um hormônio chamado gonadotrofina coriônica, formado na placenta durante a gestação. Em consequência, as características sexuais interrompem seu desenvolvimento, desde o nascimento até a puberdade. Na puberdade, o reaparecimento da secreção de testosterona induz os órgãos sexuais masculinos a retomar o crescimento. Os testículos, a bolsa escrotal e o pênis crescem, então, aproximadamente mais de 10 vezes (VILELA, 2009).

A testosterona é essencial à função reprodutiva nos machos, atua estimulando os estádios finais da espermatogênese; prolonga a vida útil dos espermatozoides no epidídimo e estimula o crescimento, o desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais do macho, exteriorizando as características sexuais secundárias, sendo necessária para a manutenção da capacidade de serviço (HAFEZ; JAINUDEEN; ROSNINA, 2004). Correlações significativas têm sido demonstradas entre a concentração sanguínea de testosterona, a fertilidade e a motilidade espermática (BLOCKY; GALLOWAY, 1978).

2.2 Proteínas do Plasma Seminal

O plasma seminal proporciona boas condições para a manutenção da motilidade, sobrevivência, além de servir como veículo para os espermatozoides ejaculados, consistindo em uma mistura de secreções dos testículos e glândulas sexuais acessórias, com função carreadora dos gametas masculinos até o trato genital feminino, viabilizando a fecundação (CHACUR et al., 2006). Entretanto, estudos sobre as proteínas do plasma seminal e da membrana espermática ainda

precisam definir os tipos de proteínas e os mecanismos de ação que afetam a viabilidade desses gametas (ASADPOUR et al., 2007).

A composição molecular do plasma seminal possui características inerentes a cada espécie, podendo diferir entre os tipos e a atuação das proteínas espermáticas (TÖPFER-PETERSEN et al., 2004).

Estudos recentes mostram a importância da presença das proteínas do plasma seminal, como marcadores biológicos de fertilidade. A estação do ano influencia na presença das proteínas do plasma seminal em bovinos criados extensivamente (CHACUR et al, 2004).

As diferenças na fertilidade observadas entre os animais, muitas vezes não são detectadas pelos testes rotineiros empregados na avaliação da qualidade do sêmen. Neste sentido, estudos desenvolvidos mostram que há evidência de associações significativas entre a expressão de proteínas seminais e a fertilidade dos machos (KILLIAN; CHAMPAN; ROGOWSKI, 1993; MOURA; CHAMPAN; KILLIAN, 2006a, 2006b).

A eletroforese é uma técnica que vem sendo utilizada desde a década de 50 para mapear e identificar componentes protéicos solúveis de ejaculados, na busca de marcadores bioquímicos para diagnóstico de algumas patologias ou diferenciação de animais quanto ao grau de sua fertilidade. Frente a alterações de clima e manejo, associadas a patologias do trato reprodutivo masculino ou do espermatozóide. Já foi constatado que o conteúdo do plasma seminal pode influenciar na fertilidade dos machos (KILLIAN; CHAMPAN; ROGOWSKI, 1993). Estudos indicam que a habilidade do espermatozóide para se ligar à heparina e a outros glicosaminoglicanos está correlacionada com a qualidade do sêmen e fertilidade. As proteínas com sítio de ligação para heparina no plasma seminal influenciam na fertilidade. Estes sítios de ligação têm estrutura semelhante a proteínas (GAGS) do líquido folicular ovariano, que são responsáveis pela estimulação das reações acrossômicas no espermatozóide bovino, de coelho e porco, agindo provavelmente durante a capacitação do espermatozóide (MILLER; WINER; AX, 1990).

O plasma seminal de mamíferos contém um grupo de proteínas que se ligam aos espermatozoides. Estas proteínas no plasma seminal de bovino foram purificados e estão bem caracterizados bioquimicamente. Há quatro proteínas, que são chamado BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, e BSP-30-kDa. Os três primeiros são de

aproximadamente a mesma massa molecular (entre 13 e 16 kDa), enquanto que a massa molecular da a proteína BSP-30-kDa, como o nome indica, é 30000 Da (MANJUNATH, 1987). BSP-A1 e BSP-A2 têm a mesma estrutura primária e diferem apenas na extensão de glicosilação, e a sua mistura é também referida como PDC-109 (ESCH et al., 1983). A banda protéica específica de 13 kDa foi identificada nos animais B,C,D. A proteína de 13 kDa, conhecida como PDC-109 confere alta fertilidade em touros, agindo de forma direta no metabolismo dos espermatozoides (DESNOYERS, 1994; RONCOLETTA et al., 1999).

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P.; SCHAMBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57, suppl., p. 380-403, 1983.
- ASADPOUR, S. M. et al. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 308-313, 2007.
- BLOCKEY, M. A .B.; GALLOWAY, D. B. Hormonal control of serving capacity in bulls. **Theriogenology**, New York, v. 9, n. 2, p. 143-151, 1978.
- CABRERA, A.; YEPES, J. **Mamíferos sudamericanos**. Buenos Aires: Ediar, 1960. v. 2, p. 160.
- CHACUR, M. G. M.; MACHADO NETO, N. B.; RABESQUINE, M. M. Season influence upon seminal plasma proteins in bulls. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro. **Abstracts...** Porto Seguro: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004. v.1, p. 236.
- CHACUR, M. G. M.; MARTINEZ, A. I. S.; MACHADO NETO, N. B. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 1, p. 87-93, 2006.
- CLERMONT, Y.; ANTAR, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey (*Macaca artoides*). **Am. J. Anat.**, v. 136, p. 153-166, 1973.
- COUCELO, M. **Bases biológicas essenciais para o ordenamento do veado**. Lisboa, 1986. 64 p. Final report - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- COUROT, M.; HOCHEREAU RIVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES W. R.; VANDEMARK, N. L. **The testis**. New York: Academic Press, 1970. v. 1, p. 339-432.
- CURTIS, S. K.; AMANN, R. P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 6, p. 1645-1657, 1981.
- DADOUNE, J. P.; DEMOULIN, A. Structure and functions of the testis. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.; HUNTER, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, 1993. cap 13, p. 227-250.
- DE ROOIJ, D. G. Stem cells in the testis. **Inst. J. Exp. Path.**, v. 79, p. 67-80, 1998.

DESNOYERS, L. Characterization of the mayor proteins of bovine seminal fluid by two dimensional polyacrylamide gel eletroforesis. **Molec. Reprod. Develop.**, v. 37, p. 425-443, 1994.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L. Taxonomia da evolução. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997. cap. 1, p. 2-21.

DUKES, H. H. Pcessos reprodutivos do macho. In: DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 603-614.

ESCH, F. S et al. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 113, p. 861–867, 1983.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA. **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, 1998. p. 197-219.

GARDNER, A. L. Postpartum estrus in a Red Brocket Deer, *Mazama Americana*, from Peru. **Journal of Mammalogy**, v. 52, n. 3, p. 623-624, 1971.

GOODMAN, H. M. Controle hormonal da reprodução masculina. In: JOHNSON, L. R. **Fundamentos de fisiologia médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2000. cap. 45.

GRIFFIN, J. E. Male reproductive funtion. In: GRIFFIN, J. E.; OJEDA, S. R. **Textbook of endocrine physiology**. New York: Oxford University Press, 1988. p. 165-185.

HAFEZ, E. S. E.; GARNER, D. L. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 97-101; 105-106.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 45-46.

HUHTANIEME, I.; TOPPARI, J. Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 377, p. 33-54, 1995.

JÉGOU, B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. **Int. Rev. Cytol.**, v. 147, p. 25-95, 1993.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto e atlas**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 21: Aparelho reprodutor masculino, p. 323-334.

KENAGY, G. J.; TROMBULAK, S. C. Size and function of mammalian testis in relation to body size. **Journal Mammalogy**, v. 77, p. 1-22, 1986.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular**: uma introdução à patologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 677.

KILLIAN, G. J.; CHAMPAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plas. **Biology of Reproduction**, Pennsylvania, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

LYU, P. Y.; HANDELSMAN, D. J. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. **Hum. Reprod. Updat**, v. 9, p. 9-23, 2003.

MAIA, M. J. F. A. **Contribuição para o estudo de algumas espécies de cervídeos (Cervus elaphus, Cervus canadensis e Dama dama) no Jardim Zoológico de Lisboa e Tapada Nacional de Mafra**. Santarém, 1993. 119 p. Relatório de Estágio de Produção Animal - Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária de Santarém, Santarém.

MANJUNATH, P. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasm. **European Journal of Biochemistry**, Berlin., v. 241, p. 685-692, 1987.

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

MOURA, A. A.; CHAMPAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexers of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 201-211, 2006a.

MOURA, A. A.; CHAMPAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Androl**, v. 27, p. 534-541, 2006b.

O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrinol. Rev**, v. 22, p. 289-318, 2001.

PAULA, T. A. R. **Análise histométrica e funcional dos testículos de capivara (Hydrochoerus hydrochaeris) adultas**. Belo Horizonte, 1999. 84 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PESCHOVITZ, O. H. et al. Paracrine control of spermatogenesis. **Trends Endocrinol. Metabol**, v. 5, p. 126-131, 1994.

POCAY, P. L. B. et al. Respostas fisiológicas de vacas holandesas predominantemente brancas e predominantemente negras sob radiação solar direta. **ARS Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 155-161, 2001.

RONCOLETTA, M. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 143-148, 1999.

RUSSELL, L. D. et al. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1: Mammalian spermatogenesis, p. 40.

RUSSELL, J. D. et al. The hamsters Setrtoli cell in early testicular regression an early recrudescence: a stereological and endocrine study. **Internationa Journal of Andrology**, v. 17, p. 93-106, 1994.

RUSSELL, L. D. Mammalian leydig cell structure. In: PAYNE, A. H., HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. **The Leydig cell**. Vienna: Cache River Press, 1996. cap 10, p. 218-222.

SHARPE, R. M. Regulation of espermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. v.1, p. 1364-1434.

SKINNER, M. Cell-cell interaction in the testis. **Endoc. Rev**, v. 12, p. 45-77, 1991.

SPITERI-GRESH, J.; NIESCHLAG, E. Paracrine factors relevants to the regulation of spermatogenesis: a review. **J. Reprod. Fertil**, v. 98, p. 1-14, 1993.

STALLINGS, J. R. Notes on the reproductive biology of the Grey Brocket Deer (*Mazama Gouazoubira*) in Paraguay. **Journal Mammalian**, v. 67, n. 1, p. 172-175, 1986.

STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processo reprodutivo do macho. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Duckes: fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 35, p. 603-614.

TÖPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 159-170, 2004.

VAN SOEST, P. J. **Nutricional ecology of the ruminant**. 2.ed. New York: Cornell University, 1994. p. 476.

VILELA, A. L. M. **Sistema reprodutor masculino**, 2009. Disponível em: <<http://www.afh.bio.br/varios/analuisa.asp>>. Acesso em: 09 agosto. 2012.

WALKER, E. **Mammals af the world**. Baltimore: John Hopkins University, 1991. p. 1398.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal species of the world**. 3.ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 2005. v. 2, p. 142.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN, DO PLASMA SEMINAL E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE TESTOSTERONA EM CERVOS SAMBAR (*Cervus unicolor*) EM CATIVEIRO

(Characterization semen, of seminal plasma and concentration serum testosterone in sambar deer (*Cervus unicolor*) in captivity in the spring)

E.A.F. MARTINS^{1*}; A.A. SILVA¹; L.M. GUABERTO²; L.R.A.GABRIEL
FILHO³; E. OBA⁴; O.C. SANCHES¹; M.G.M. CHACUR¹

¹Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

²Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

³Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – TUPÃ

⁴Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Botucatu

[*ea.vet@iq.com.br](mailto:ea.vet@iq.com.br)

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o quadro espermático, as proteínas do plasma seminal em SDS-PAGE e a testosterona sérica em cervos criados em cativeiro. Quatro machos com idades entre 12 e 36 meses foram avaliados. Em quatro momentos com intervalos de sete dias, obteve-se o peso (60,5 a 89,0 kg) e o índice de massa corporal ($93,07 \text{ kg/m}^2$ a $126,56 \text{ kg/m}^2$). Foram realizadas quatro colheitas de sêmen por animal, com intervalo de sete dias, por meio de eletroejaculador, sob efeito de anestesia geral. Obteve-se os valores de: volume do ejaculado ($0,50 \pm 0,35 \text{ mL}$ a $0,75 \pm 0,28 \text{ mL}$), motilidade espermática ($87,75 \pm 4,78\%$ a $90,00 \pm 7,07\%$), defeitos totais ($17,25 \pm 5,81\%$ a $47,72 \pm 17,55\%$) e testosterona plasmática ($6,43 \pm 4,33 \text{ ng/dL}$ a $166,00 \pm 64,48 \text{ ng/dL}$). A eletroforese em SDS-PAGE revelou bandas proteicas entre 7,6 kDa e 142 kDa. Concluiu-se que devido às contenções sucessivas, os defeitos espermáticos se elevaram. O plasma seminal apresentou uma grande gama de proteínas entre 7,6 kDa e 142 kDa. A idade influi na concentração de testosterona, sendo essa maior na faixa dos 36 meses.

Palavras-chave: cervo, morfometria corpórea, sêmen, eletroforese, testosterona.

32 ABSTRACT

33 The objective of this study was to evaluate the framework sperm, seminal
34 plasma proteins on SDS-PAGE and serum testosterone in deer bred in captivity. Four
35 males aged between 12 and 36 months were evaluated. In four times at intervals of
36 seven days, gave the weight (60.5 to 89.0 kg) and the body mass index (kg/m² 93.07 to
37 126.56 kg/m²). There were four semen samples per animal, with an interval of seven
38 days, by electroejaculation under general anesthesia. Obtained values: ejaculate volume
39 (0.50 ± 0.35 ml to 0.75 ± 0.28 ml), motility (87.75 ± 4.78% to 90.00 ± 7.07%) total
40 defects (17.25 ± 5.81% and 47.72 ± 17.55%) and plasmatic testosterone (6.43 ± 4.33 ng/
41 dL at 166.00 ± 64.48 ng/dL). Electrophoresis on SDS-PAGE revealed protein bands
42 between 7.6 kDa and 142 kDa. It is concluded that due to successive containments,
43 sperm defects increased. Seminal plasma showed a wide range of proteins between 7.6
44 kDa and 142 kDa. Age influences the testosterone concentration, being higher in the
45 range of 36 months.

46 **Keywords:** deer, body morphometry, semen, electrophoresis, testosterone.

47

48

INTRODUÇÃO

49 A família *Cervidae*, da qual fazem parte os veados, pertence à ordem
50 *Artiodactyla* (Maia, 1993). Os *Cervus unicolor*, conhecido como cervo sambar, são os
51 ruminantes selvagens mais disseminados no mundo (Van Soest, 1994). Porém, pouco se
52 sabe a respeito do comportamento reprodutivo dos cervos nas condições de vida livre, e
53 em cativeiro.

54 O exame andrológico é uma das técnicas mais utilizadas pelos médicos
55 veterinários para avaliar a fertilidade, caracteriza-se por exame clínico, medida de
56 circunferência escrotal e avaliação do espermatozoide para motilidade, vigor,
57 turbilhonamento, concentração e morfologia (Salvador *et al.*, 2002). As avaliações
58 clínicas e seminais são fundamentais para classificação e prognóstico da função
59 reprodutiva (Vale Filho *et al.*, 1986).

60 A biologia molecular na área da reprodução animal traz ferramentas para
61 o melhoramento genético, por meio da utilização de marcadores bioquímicos em
62 líquidos orgânicos que demonstram o potencial genético de um animal, cuja seleção de

63 genótipos superiores, para determinadas características reprodutivas possa ser
64 incrementada (Roncoletta *et al.*, 1999).

65 O plasma seminal serve como veículo para os espermatozoides
66 ejaculados, consistindo em uma mistura de secreções dos testículos e glândulas sexuais
67 acessórias, com função carreadora dos gametas masculinos até o trato genital feminino
68 viabilizando a fertilização (Manjunath, 1987; Einspanier, 1991). Os perfis
69 eletroforéticos das proteínas do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica, em casos
70 de infertilidade (Gasset *et al.*, 1997).

71 Relações têm sido demonstradas entre a concentração sanguínea de
72 testosterona, fertilidade e motilidade espermática (Blockey; Galloway, 1978). As
73 características fisiológicas reprodutivas podem sofrer alterações devido ao estresse em
74 cativeiro (Pocay *et al.*, 2001).

75 Devido à escassez de dados na literatura nacional, pouco se sabe com
76 relação à esfera reprodutiva em cervos exóticos mantidos em cativeiro (*Cervus*
77 *unicolor*), dessa forma o presente estudo justifica-se, pois informações obtidas de
78 animais mantidos em cativeiro podem ser úteis para se traçar estratégias de manejo
79 reprodutivo. O objetivo do trabalho foi avaliar o quadro espermático, as proteínas do
80 plasma seminal em SDS-PAGE e a testosterona sérica em cervos criados em cativeiro.

81

82

MATERIAL E MÉTODOS

83

Animais e local do experimento

84

Foram utilizados quatro (n=4) cervos sambar (*Cervus unicolor*) machos,
85 identificados com as letras A e B com idade de 36 meses e pesos de 89 e 95 Kg,
86 respectivamente, C com idade de 18 meses e peso de 81 kg e D com 12 meses pesando
87 60,5 Kg, criados em cativeiro (Zoológico de Presidente Prudente - SP, com latitude de
88 21°29'50"S; longitude de 49°14'2"W e altitude de 475m. Os animais recebiam
89 alimentação balanceada com frutas e legumes: laranja, maçã, banana, mamão,
90 beterraba, cenoura e abóbora em proporções iguais (8Kg); sal mineral, ração para
91 bovinos (18% proteínas), capim colônia *Panicum maximum* e água *ad libitum*. O
92 experimento foi realizado no mês de novembro de 2010 (primavera) e os fatores
93 climáticos aferidos na primavera (P) foram: temperatura ambiente média (24,5°C),
94 insolação (239,74h), índice pluviométrico cumulativo (126 mm) e umidade relativa do

95 ar (80,6%). O clima é caracterizado pela presença de massas de ar Tropicais e Polares,
96 com estação de inverno fria e seca, e verão quente e chuvoso.

97 *Colheita e processamento das amostras*

98 Antecedendo as colheitas, foram realizadas prévias contenções químicas,
99 administrando por via intramuscular zoletil associado à xilazina, obedecendo sempre a
100 sequência do animal A, B, C e D, e utilizando um intervalo em média de 20 minutos
101 entre colheitas.

102 Os animais foram pesados e a altura da cernelha mensurada para a
103 obtenção do índice de massa corpórea (IMC), sendo $IMC = \text{peso corpóreo (Kg)} / (\text{altura}$
104 $\text{da cernelha em metros})^2$. Foram realizadas quatro colheitas de sêmen por animal, com
105 intervalo de sete dias, por meio de eletroejaculador (Autoejac®, Neovet, Brasil) com
106 probe retal para ovinos, a qual foi introduzido no reto do animal, após prévia
107 lubrificação, sob efeito de anestesia geral, com estímulos elétricos de 2 a 3 segundos,
108 seguidos por igual tempo de repouso. As amostras de sêmen foram analisadas com
109 relação às características quantitativas e qualitativas: volume (mL), cor, aspecto,
110 motilidade espermática (%), vigor espermático (1 a 5), turbilhonamento (1 a 5),
111 concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$), defeitos espermáticos maiores, menores e totais
112 (%). Posteriormente, os ejaculados foram centrifugados a 1500g / 15 min, separando e
113 estocando 1 mL de plasma seminal a -20°C para posterior realização da técnica de
114 eletroforese em SDS-PAGE.

115 A eletroforese em SDS-PAGE, foi processada com extrações das
116 proteínas segundo Laemilli (1970) e quantificações conforme Bradford (1976) com
117 espectrofotômetro (PF-901 Chemistry Analyser Labsystems). A extração das proteínas
118 foi realizada utilizando tampão composto por: *buffer* A – TRIS HCl (6,0 mL) pH 6,8
119 (4,0 mL), glicerol (6,4 mL), SDS 10% (6,4 mL), mercaptoetanol (1,6 mL) e água
120 destilada (13,6 mL). Empregou-se uma relação de 2:1, colocando em tubo de ensaio
121 200µL de amostra e 1000µL do tampão de extração para cada amostra, mantidos por 3
122 minutos em ebulição. Logo após, as proteínas foram quantificadas em
123 espectrofotômetro com solução contendo: Bradford (4,5 mL), NaCl 0,15 M (0,45 mL) e
124 amostra de proteína (0,05 mL). As amostras foram aplicadas em cuba eletroforética
125 vertical 20x20cm (Omniphor®) ligada a (50V x 50Ma / 30min; e 300V x 16mA / 4 a
126 6h) uma fonte elétrica de 0 a 1000W (PWSYS EI®). A revelação das bandas protéicas

127 foi feita em solução a 2% de *Comassie Brilliant Blue G-250*, com captura, visualização
128 e processamento das imagens em transminador (Doc-IT-LS® 6.0 software).

129 Concomitante às colheitas de sêmen, foram realizadas as colheitas de
130 sangue por venopunção jugular, quatro colheitas por cervo, realizadas no período da
131 manhã, entre 8:00h e 10:00h, totalizando 16 amostras, seguida por centrifugação a
132 1500g/15min, para separação do plasma, o qual foi estocando à -20°C para posterior
133 dosagem de testosterona (ng/dL) pelo método de radioimunoensaio (RIA), utilizando
134 quite comercial para testosterona total (DPC – Coat a Count® – Med Lab).

135 Após a quarta e última colheita de sêmen e sangue, foram feitas biópsias
136 dos testículos com auxílio de agulha modelo Tru-Cut 16 gauge (16G) para biópsia. Os
137 fragmentos foram fixados em solução fixadora de Davidson por 24 horas, depois
138 lavados em água corrente por 20 minutos e transferidas para solução alcoólica à 70%.
139 Em seguida, foram processadas conforme a técnica para microscopia óptica e inclusão
140 em parafina. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE). Para o
141 processamento estatístico dos dados do sêmen, foi empregada a análise de variância e
142 para a comparação das médias aplicou-se o teste de Tukey a 5%.

143

144

RESULTADOS E DISCUSSÃO

145

146

147

148

149

150

151

152

Tabela 1. Média da idade e das características morfológicas: peso corpóreo, comprimento crânio-caudal, altura de cernelha, índice de massa corpórea (IMC) e diâmetro torácico em cervos, *Cervus unicolor*.

Parâmetros	Animais			
	A	B	C	D
Idade (meses)	36	36	18	12
Peso (Kg)	89,0	95,0	81,0	60,5
Comprimento (m)	1,39	1,43	1,26	1,24
Altura da cernelha (m)	0,92	0,89	0,80	0,81
IMC (Kg/m ²)	105,95	120,25	126,56	93,07
Diâmetro torácico (m)	1,01	1,09	0,88	0,87

153

154

155

156

Com relação às características quantitativas e qualitativas do sêmen, não
houve diferenças ($P > 0,05$) entre os quatro momentos de colheita, exceto na morfologia
espermiática da quarta colheita, para os defeitos maiores, menores e totais com elevação

157 das porcentagens de defeitos morfológicos em relação às três primeiras colheitas,
 158 conforme a Tabela 2. Vale destacar que o método de colheita de sêmen por
 159 eletroejaculação, mostrou-se de fácil execução para a obtenção dos ejaculados. A
 160 necessidade da contenção química por sedação anestésica propiciou uma colheita de
 161 sêmen rápida, pois reduziu o estresse do procedimento. A literatura destaca que o
 162 estresse das condições do cativeiro é causado pelo aprisionamento, redução da liberdade
 163 e pela imposição da convivência constante com vários indivíduos, e que na natureza,
 164 estes animais vivem a maior parte do tempo isolados (Duarte e Merino, 1997). Dentro
 165 desse raciocínio do estresse do cativeiro e dos fatores estressantes associados, uma alta
 166 porcentagem de defeitos totais ($40,9\pm 10,42\%$) foi relatada em cervos no Brasil (Abreu
 167 *et al.*, 2009).

168

169

Tabela 2. Características quantitativas e qualitativas do sêmen de cervos em distintos momentos de colheita, mantidos em cativeiro.

Variável	Colheitas			
	1	2	3	4
Volume (mL)	0,75±0,28 A	0,75±0,28 A	0,50±0,35 A	0,62±0,25 A
Cor	1,75±0,95 A	1,50±1,00 A	1,25±0,50 A	1,25±0,50 A
Aspecto	1,75±0,95 A	1,75±0,50 A	1,25±0,50 A	1,25±0,50 A
Motilidade (%)	87,50±5,00 A	83,75±4,78 A	90,00±7,07 A	83,75±4,78 A
Vigor (1-5)	5,00±0,00 A	5,00±0,00 A	4,75±0,50 A	4,75±0,50 A
Turbilhão (1-5)	4,00±2,00 A	4,00±2,00 A	4,00±2,00 A	4,00±2,00 A
Concentração (x10 ⁶ / mL)	1137,5±892,5 A	1144,1±557,6 A	1140,6±699,6 A	1027±763,6 A
Defeitos maiores (%)	7,36±4,25 A	5,79±2,19 A	9,62±3,93 A	17,00±1,87 B
Defeitos menores (%)	10,51±3,82 A	11,45±6,50 A	10,78±2,79 A	25,85±15,05 B
Defeitos totais (%)	18,35±13,93 A	17,25±5,81 A	20,41±2,74 A	47,72±17,55 B

170 Letras diferentes (A, B) na linha (P<0,05); Cor: (1) amarelo, (2) branco, (3) branco marmóreo; Aspecto: (1) cremoso, (2) leitoso,
 171 (3) aquoso.

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

Com relação à morfologia espermática, os valores médios obtidos para os
 defeitos maiores (cabeça isolada patológica, pequena anormal, gota proximal, defeito de
 peça intermediária, cauda fortemente dobrada ou enrolada e enrolada na cabeça);
 menores (cabeça isolada normal, retroaxial, abaxial, dobrada ou enrolada e gota
 citoplasmática distal) estão descritos na Tabela 3.

Dessa forma, a alta porcentagem de defeitos espermáticos obtida na
 quarta colheita, pode estar associada ao estresse cumulativo e às contenções semanais
 para a obtenção dos ejaculados, semelhantes aos descritos por Cheng *et al.* (2009).

184

185

Tabela 3. Porcentagens de defeitos maiores, menores e totais nas quatro colheitas de sêmen em cervos sambar..

Animal	Colheita	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	Defeitos Totais
A	1	5,46	6,72	12,18
A	2	5,5	6,5	12
A	3	6,22	3,82	10,04
A	4	14,21	25	39,21
B	1	3,27	19,62	22,89
B	2	4,67	5,6	10,27
B	3	7,88	6,89	14,77
B	4	7,35	13,72	21,07
C	1	4,48	12,55	17,03
C	2	14,07	7,28	21,35
C	3	9,86	9,86	19,72
C	4	10,09	13,46	23,55
D	1	16,25	14,77	31,02
D	2	16,98	14,62	31,06
D	3	15,19	27,45	42,64
D	4	19,6	46,56	66,16

186

187

188

189

190

191

192

193

No presente estudo, o volume dos ejaculados foi semelhante ao observado em machos sexualmente maduros “Formosan Sika deer” e “Formosan Sambar deer” com $0,5\pm 0,4$ mL (Cheng *et al.*, 2004) e diferiu do relatado por Abreu *et al.* (2009) com $0,91\pm 0,68$ mL em *Mazama nana* e Ascher *et al.* (2000) com volume de $1,5\pm 0,6$ mL em cervos *Dama dama*. O volume dos ejaculados pode variar conforme a espécie, idade, peso, frequência de ejaculação e tamanho do aparelho reprodutor dos cervos (Ascher *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2009).

194

195

196

197

198

199

200

201

202

As motilidades médias obtidas no presente estudo foram superiores às descritas por Cheng *et al.* (2004) com $77\pm 6\%$, Abreu *et al.* (2009) com $70\pm 8\%$ e Ascher *et al.* (2000) com $65,50\pm 19,3\%$. Por outro lado, as concentrações espermáticas médias foram inferiores à média de $1.471,3\pm 940,0 \times 10^6$ /mL, Abreu *et al.* (2009) com $1.536\pm 351 \times 10^6$ /mL e Ascher *et al.* (2000) com $2.100\pm 1.400 \times 10^6$ /mL. O vigor espermático foi superior ao valor médio de $3,00\pm 0,67$ em cervos *Mazama nana* relatado por Abreu *et al.* (2009). A concentração espermática pode oscilar devido ao método de colheita por eletroejaculação (Chacur, 2012; Chacur *et al.*, 2012) e ao estresse do cativo (Ascher *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2009).

203

204

205

206

207

208

A análise microscópica dos testículos dos cervos foi realizada e o material processado pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) mostrando integridade do arcabouço dos túbulos seminíferos, observada por meio da presença das células da linhagem espermatogênica disposta em camadas homogêneas (Fig. 1).

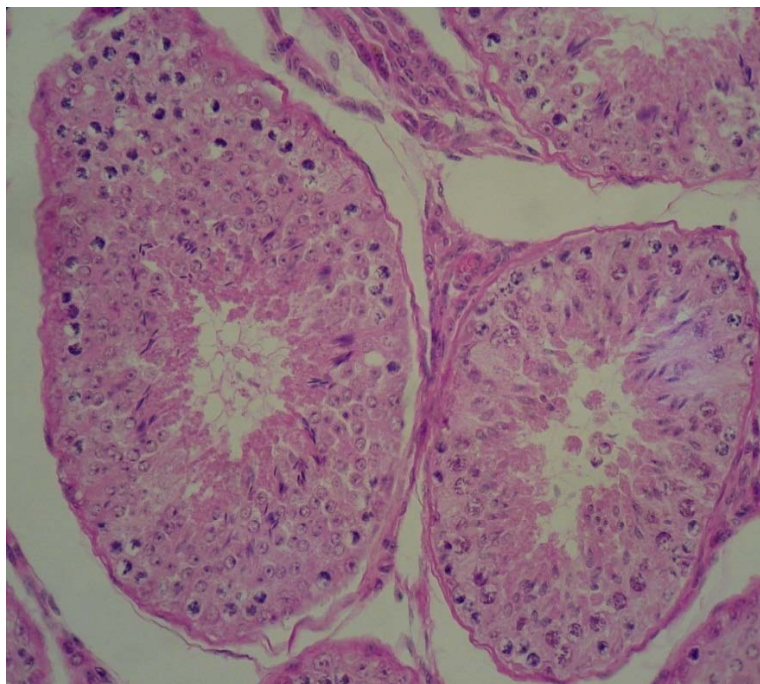


Figura 1. Corte de testículo, mostrando túbulos seminíferos, com o epitélio germinativo íntegro HE (400x) de cervos, *Cervus unicolor*.

209
210
211
212
213

214 O estudo do perfil proteico do plasma seminal nos animais por meio da
215 eletroforese vem sendo correlacionado com a fertilidade dos mesmos, podendo
216 colaborar para a compreensão dos efeitos dos fatores do clima e da contenção do
217 cativeiro sobre as características reprodutivas (Chacur, 2012).

218 Com relação ao perfil protéico do plasma seminal dos cervos, os géis revelaram
219 a presença de bandas com pesos moleculares variando entre 7,6 kDa e 142 kDa. Essas
220 bandas apresentaram diferentes porcentagens de ocorrência, entre 6,66% e 26,66% das
221 amostras de plasma seminal (Tabela 4). As bandas com ocorrência igual ou superior a
222 20% das amostras foram: 10, 13, 19, 20, 21, 29, 30, 51, 82, 88, 90, 96 e 122 kDa.
223 Dessas 13 bandas protéicas, sete possuem peso moleculares igual ou inferior a 30 kDa,
224 revelando uma distribuição homogênea entre a ocorrência de bandas leves (até 50 kDa)
225 e pesadas (igual ou superior a 51 kDa), conforme ilustradas nas figuras (Fig. 2 e Fig. 3).

226
227

Tabela 4. Ocorrência de bandas protéicas específicas no plasma seminal de cervos sambar na estação da primavera..

Cervos	Proteínas (kDa)
A	7,6 10 11 14 15 16 19 20 21 27 30 73 75 81 82 88 89 96 97 100 107 120 123 125 129 132 141
B	10 13 18 20 22 27 30 36 50 51 52 60 74 77 81 82 87 90 92 95 118 122 131 134
C	10 13 18 19 21 29 48 51 53 79 82 86 88 92 96 102 110 119 126 133 142
D	13 21 29 49 52 61 75 83 88 90 95 96 108 121 133

228

229 A banda protéica específica de 13 kDa foi identificada nos animais
 230 B,C,D. A proteína de 13 kDa, conhecida como PDC-109 confere alta fertilidade em
 231 touros, agindo de forma direta no metabolismo dos espermatozoides (Desnoyers, 1994;
 232 Roncoletta *et al.*, 1999).

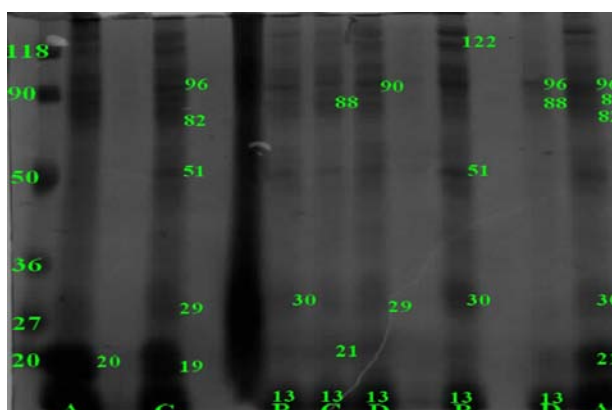
233 Nos cervos A e B foi observada a banda de 20 kDa a qual segundo
 234 Barrios *et al.* (2000) pode ser responsável pela recuperação da permeabilidade da
 235 membrana espermática após a mesma ser submetida ao choque térmico pelo frio.

236 A banda protéica de 75 kDa foi encontrada nos cervos A e D. Essa
 237 proteína é chamada de SP-2, sendo a sua presença relacionada de forma negativa com a
 238 fertilidade (Brandon *et al.*, 1999).

239 Bandas proteicas entre 21 e 22 kDa foram identificadas nos cervos B, C e
 240 D. Proteínas variantes da HPB com aproximadamente 21,5 kDa e 31 kDa são associadas
 241 ao incremento da fertilidade (Bellin *et al.*, 1998). Os animais B e D apresentam a banda
 242 de 30 kDa. Em bovinos, um grupo de proteínas conhecida como BSP-A1, BSP-A2,
 243 BSP-A3 e BSP-30 kDa possivelmente induzem alterações moleculares na membrana
 244 plasmática, essenciais no processo da capacitação espermática (Therien; Manjunath,
 245 1998; Bergeron, 2004).

246 As bandas de 79 kDa (cervo C); 81 kDa (cervos A e B) e 90 kDa (cervos
 247 B e D) foram identificadas. Conforme Chacur *et al.* (2006) esses peptídeos quando
 248 presentes no plasma seminal contribuíram de forma positiva com as características
 249 qualitativas do sêmen.

250



251

252

253

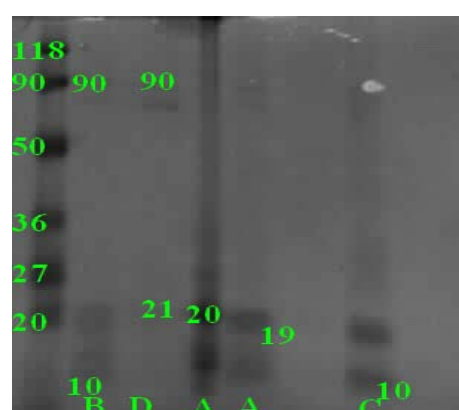


Figura 2. Proteínas leves e pesadas do plasma seminal em *Cervus unicolor*. Figura 3. Proteínas do plasma seminal de cervídeos.

254 Vale destacar que estudos comprovam a correlação da testosterona com a
 255 qualidade espermática de ruminantes criados extensivamente em clima tropical
 256 (Chacur2000; Chacur et al., 2012). Por outro lado, a literatura consultada traz poucas
 257 informações a esse respeito ao tratar dos cervos como objeto do estudo. No presente
 258 trabalho, as concentrações séricas de testosterona, obtidas no mês de novembro
 259 (primavera) estão descritas na tabela 5, onde observam valores maiores para os cervos A
 260 e B com idade de 36 meses. Possivelmente, a faixa etária superior dos cervos A e B com
 261 36 meses influenciou na maior concentração de andrógeno circulante. Pesquisadores
 262 publicaram resultados relativos à concentração de testosterona em cervos de distintas
 263 espécies, sendo Lopez *et al.* (2010) com valores entre 2 e 10 ng/dL, também na estação
 264 da primavera, em cervos (*Cervus elaphus hispanicus*). Valores similares ao do presente
 265 trabalho foram ainda relatados por Lopes et al. em 2010 para a estação do outono, mês
 266 de setembro, com concentração sérica média de $86,5 \pm 16,3$ ng/dL. Pereira *et al.* (2005)
 267 descrevem concentração de testosterona entre 50 e 100 ng/dL por meio da colheita de
 268 fezes em cervos (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*).

269 Nas espécies dos veados somente os dominantes produzem sêmen de boa
 270 qualidade (Comizzoli *et al.*, 2000). Este fato está relacionado com o comportamento
 271 sexual e social a partir do princípio de setembro, época do início da ciclicidade
 272 reprodutiva, onde se verifica a presença de fêmeas na fase de estro (Coucelo, 1986). No
 273 presente estudo, foi observado comportamento sexual ativo na presença de fêmeas em
 274 estro, com cortejo e coberturas, realizados pelos cervos A e B, os quais eram
 275 dominantes em relação aos animais C com idade de 18 meses e D com 12 meses.

276

277 Tabela 5. Concentração de testosterona sérica (ng/dL) em cervos, *Cervus unicolor*.

Cervo	Testosterona (ng/dL)
A	166,00±64,48
B	75,86±15,16
C	12,71±8,51
D	6,43±4,33

278

279 Correlações significativas têm sido demonstradas entre a concentração
 280 sanguínea de testosterona, a fertilidade e a motilidade espermática (Blockey; Galloway,
 281 1978). Uma sazonal elevação da concentração de testosterona foi observada na
 282 primavera em cervos “columbian black-tailed”, “red deer” e “follon deer” (West,
 283 Nordan, 1976; Rolf, Firder, 1990). Em cervos “white-tailed deer” a máxima
 284 concentração de testosterona não foi necessária para o processo da espermatogênese,

285 mas foi essencial para a manifestação do comportamento reprodutivo (Bubenik *et al.*,
286 1982).

287 Segundo Pereira *et al.* (2005) existe uma correlação significativa entre
288 níveis de testosterona e comportamento reprodutivo, razão pela qual o ciclo sazonal
289 deste hormônio modula o comportamento sexual dos machos durante o período de
290 acasalamento, os machos (apenas indivíduos com os chifres expostos) demarcando o
291 seu território. Vale destacar que se faz necessária a continuidade dos trabalhos
292 relacionados à reprodução dos cervos para uma melhor compreensão dos fatores que
293 afetam as características da fisiologia da reprodução desses animais.

294

295 CONCLUSÃO

296

297 Boa qualidade espermática foi observada na primavera, nas três primeiras
298 colheitas. As características dos ejaculados não diferiram entre as colheitas sucessivas,
299 exceto a morfologia espermática que se elevou na quarta colheita, possivelmente devido
300 ao estresse das contenções semanais sucessivas. Grande variedade na distribuição de
301 bandas proteicas no plasma seminal foi obtida, entre 7,6 e 142 kDa. A idade influi na
302 concentração de testosterona, sendo maior na faixa dos 36 meses.

303

304 REFERÊNCIAS

305 ABREU, O.C.; MARTINEZ, C.A.; MORAES, W et al. Características reprodutivas de
306 veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*). *Pesq. Vet. Brás.*, v.29, n.12,
307 p.993-998, 2009.

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

310 BARRIOS, B.R.; PÉREZ-PÉ, M.; GALEGO, A. et al. Seminal plasma protein reverse
311 the cold-shok damage of ram sperm membrane. *Bio. Reprod.*, v.63, p.1531-1537, 2000.

312 BELLIN, M.et al. Fertility of ranger beef bulls grouped according to presence or
313 absence of heparin binding protein in sperm membranes and seminal fluid. **Journal**
314 **Animal Science**. Kinsville, v. 72, p, 2441-2448, 1994.

315 BERGERON, A. Comparative study on the phospholipid-binding proteins in seminal
316 plasma of different species. In: XV INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL

- 317 REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. *Abstract...* Belo Horizonte: Brazilian
318 College of Animal reproduction, 2004. v.1, p.226.
- 319 BRANDON, C.I. The cause of pathologic change of testicular degeneration in large.
320 *Vet. Med.*, v.23, n.1, p.531-36, 1999.
- 321 BUBENIK, G.A.; MORRIS, J.M.; SCHAMS, D.; CLAUS, A. Photoperiodicity and
322 circannual levels of LH, FSH, and testosterone in normal and castrated male, white-
323 tailed deer. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.*, v.60, n.6, p.788-793,
324 1982.
- 325 BLOCKEY, M.A. de B.; GALLOWAY, D.B. Hormonal control of serving capacity in
326 bulls. *Theriogenology.*, v.9, n.2, p.143-151, 1978.
- 327 CHACUR, M.G.M. Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility
328 in Zebu Bulls (*Bos taurus indicus*), Rijeka: In Tech, 2012, *Electrophoresis* ISBN-
329 980653307 1171.
- 330 CHACUR, M. G. M. Estresse térmico em touros bufalinos *Bubalus bubalis*, avaliações
331 das características fisiológicas da reprodução. 2000. Tese (Doutorado em Medicina
332 Veterinária). Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária –
333 Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2000.
- 334 CHACUR, M.G.; ARAUJO, M.C.; KRONKA, S. Características seminais, corpóreas e
335 anatômicas do aparelho reprodutor de reprodutores da raça Canchim aos 14 e 48 meses
336 de idade. *Arquivo de Ciências Veterinária e Zootecnia da UNIPAR.*, v.9, p.21-27, 2006.
- 337 CHACUR, M.G.M.; AURÉLIO, P.T.F.; OBA, E. *et al.* Influência de um nutracêutico
338 no sêmen, testosterona, cortisol, eritrograma e peso corpóreo em touros jovens *Bos*
339 *taurus indicus*. *Semina Agrárias*, v.31, p.439-450, 2010.
- 340 CHACUR, M.G.M; MIZUSAKI, K.T.; SANTOS F.H. *et al.* Influência da estação do
341 ano nas características do sêmen e na concentração de hormônios em touros Nelore e
342 Simental. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.3, p.540-546, 2012.
- 343 CHACUR, M. G. M.; OBA, E. Heat stress in buffalo bulls *Bubalus bubalis*, evaluations
344 of reproduction physiological characteristics. *Veterinária Notícias*, Uberlândia, v. 11, n.
345 1 , p. 111-112, 2005.
- 346 CHENG, F.P.; WU, J.; CHAN, J et al. The effect of different extenders on post-taw
347 sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan
348 Silka deer and Formosan Samba deer. *Theriogenology.*, v.61, p.1605-1616, 2004.

- 349 COMIZZOLI, P.; MERMILLOD P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for
350 endangered mammalian species. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.40, p.493-504, 2000.
- 351 COUCELO, M. *Bases biológicas essenciais para o ordenamento do veado*. Lisboa,
352 1986. 64 p. Final report - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de
353 Lisboa.
- 354 DESNOYERS, L. Characterization of the mayor proteins of bovine seminal fluid by
355 two dimensional polyacrylamide gel eletroforesis. *Molec. Reprod. Develop.*, v.37,
356 p.425-443, 1994.
- 357 DUARTE, J. M.B.; MERINO, M.L. Tecnologia da reprodução para a propagação e
358 conservação de espécies ameaçadas de extinção. In: DUARTE J.M.B. *Biologia e*
359 *Conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*.
360 Jaboticabal, SP: FUNEP, p.228-238, 1997.
- 361 ESPANIER, R. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid.
362 *Biochemical and Biophysical Research Communications. Gattingen.*, v.179, n.2, p.1006-
363 1010, 1991.
- 364 GASSET, M. Conformation features and thermal stability of bovine seminal plasma
365 protein PDC-109 oligomers and phosphorycholine-bound complexes. *European Journal*
366 *is Biochemistry*. Berlin,, v.250, p.735-744, 1997.
- 367 LÓPEZ, G.E.; CASTILLEJOS, L.T.; CEACERO, F et al. Testosterone, Cortisol and
368 Antler Growth Cycle in Iberian Red Deer Stags (*Cervus elaphus hispanicus*).
369 *Reproduction in Domestic Animal.*, v.45, p.243-249, 2010.
- 370 MAIA, M. J. F. A. *Contribuição para o estudo de algumas espécies de cervídeos*
371 (*Cervus elaphus, Cervus canadensis e Dama dama*) no Jardim Zoológico de Lisboa e
372 Tapada Nacional de Mafra. Santarém, 1993. 119 p. Relatório de Estágio de Produção
373 Animal - Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária de Santarém,
374 Santarém.
- 375 MANJUNATH, P. Purification and biochemical characterization of three major acidic
376 proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasm. *European*
377 *Journal of Biochemistry*, Berlin., v.241, p.685-692, 1987.
- 378 PEREIRA, G.J.R.; DUARTE, B.M.J. Seasonal changes in fecal testosterone
379 concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and

- 380 grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*
381 *bezoarticus*). *Theriogenology.*, v.63, p.2113-2125, 2005.
- 382 POCAI, P.L.B. et al. Respostas fisiológicas de cavas holandesas predominantemente
383 brancas e predominantemente negras sob radiação solar direta. *ARS VETERINARIA.*, v.
384 17, n.2, p.155-161, 2001.
- 385 RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.M.H et al. Perfil em SDS-
386 PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen
387 de touros doadores da raça gir. *Brazilian Journal of Veterinary Reseach in Animal*
388 *Science.* São Paulo., v.36, n.2, p.143-148, 1999.
- 389 ROLF, H.J.; FISCHER, K. Serum testosterone (T) and 5-á-dihydrotestosterone (DHT)
390 in male fallow deer (*Dama dama L.*): Seasonality and age dependence. *Comparative*
391 *Biochemistry and Physiology Part A. Physiology.*, v.95A, p.445-452, 1990.
- 392 SALVADOR, D.F.; DIAS, J.C.; VALE FILHO, V.R. et al. Perfil andrológico de touros
393 da raça Nelore com três e quatro anos de idade, criados extensivamente em condições
394 do estado do Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.26, p.64-67, 2002.
- 395 THERIEN, I. R.; MANJUNATH, P. Major protein of bovine seminal plasma and high-
396 density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*,
397 v.59, p.768-776, 1998.
- 398 VALE FILHO, V.R.; PINHEIRO, L.E.L.; BASUR, P.K. Reproduction in zebu cattle.
399 In: MORROW, D.A (2Ed). *Current therapy in theriogenology.* Philadelphia: W.B.
400 Saunders Company, 1986. p. 437-442.
- 401 VAN SOEST, P.J. *Nutricional ecology of the ruminant* (2Ed). New York: Cornell
402 University, 1994. p.476.
- 403 WEST, N.O.; NORDAN, H.C. Hormonal regulation of reproduction and the antler
404 cycle in the male Columbian black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*).
405 Part I. Seasonal changes in the histology of the reproductive organs, serum testosterone,
406 sperm production and the antler cycle. *Can. J. Zool.*, v.54, p.1617-1636, 1976.

ANEXO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.

Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.

Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.

A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.

Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi),

zipado, inserido no campo próprio.

Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.

É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.

O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.

2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

Figura. Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)

mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail journal@vet.ufmg.br.