

**MARCO ANTONIO CARSTENS MENDONÇA**

**Análise descritiva do perfil espermático do  
tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*  
Linnaeus, 1758) de cativeiro**

**São Paulo  
2010**

MARCO ANTONIO CARSTENS MENDONÇA

**Análise descritiva do perfil espermático do  
tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758)  
de cativeiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**  
Reprodução Animal

**Área de concentração:**  
Reprodução Animal

**Orientador:**  
Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo)

T.2286  
FMVZ

Mendonça, Marco Antonio Carstens

Análise descritiva do perfil espermático do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) de cativeiro / Marco Antonio Carstens Mendonça. -- 2010.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães.

1. *Myrmecophaga tridactyla*. 2. Tamanduá-bandeira. 3. Sêmen.  
4. Eletroejaculação. 5. Espermograma. I. Título.

---

## ERRATA

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1	86 f.	81 f.
Abstract	1	86 f.	81 f.

---

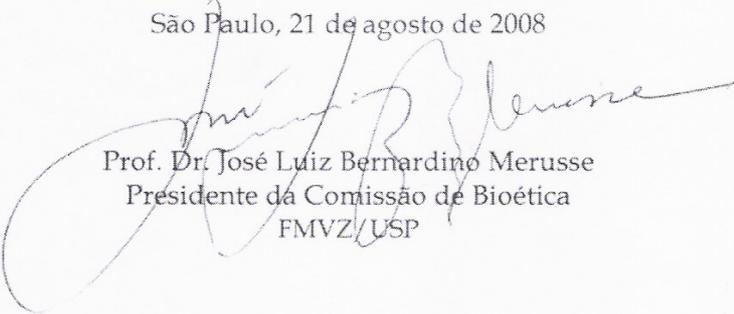


## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise descritiva e comparativa do perfil espermático do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) de vida livre e de cativeiro", protocolado sob o nº1417/2008, utilizando 12 (doze) tamanduás-bandeira, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Descriptive and comparative analysis of spermatic profile of free living and captive giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758)", utilizing 12 (twelve) anteater, protocol number 1417/2008, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 21 de agosto de 2008



Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16363-1	Data da Emissão: 09/10/2008 18:32	Data de Validade: 09/10/2009
-----------------	-----------------------------------	------------------------------

#### Dados do titular

Registro no Ibama: 2686292	Nome: Marco Antonio Carstens Mendonça	CPF: 237.631.831-91
Título do Projeto: Análise descritiva e comparativa do perfil espermático do tamanduá-bandeira ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> Linnaeus, 1758)		
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP		CNPJ: 63.025.530/0019-33

#### Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br/cites">www.ibama.gov.br/cites</a> . Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

#### Outras ressalvas

1	A metodologia de captura, contenção e coleta de material biológico de animais em cativeiro, devem ser organizadas e acordadas entre a equipe do projeto e os técnicos responsáveis da Instituição mantenedora.
---	--

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Marcelo Alcindo de Barros vaz Guimarães	Orientador	058.576.478-60	11123309 SSPSP-SP	Brasileira
2	Vinicius Andrade Lopes	Co autor	034.615.346-84	M6957405 SSP-MG	Brasileira
3	Marcilio Nichi	Co autor	276.646.898-64	22325294-3 SSP-SP	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPO GRANDE	MS	Centro de Recuperação de Animais Silvestres (CRAS-MS)	UC Estadual

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Sêmen
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Puçã, Outros métodos de captura/coleta(farmacológico)

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do [ibama/Sisbio](http://ibama/Sisbio) na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 74771527



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16363-1	Data da Emissão: 09/10/2008 18:32	Data de Validade: 09/10/2009
-----------------	-----------------------------------	------------------------------

#### Dados do titular

Registro no Ibama: 2686292	Nome: Marco Antonio Carstens Mendonça	CPF: 237.631.831-91
Título do Projeto: Análise descritiva e comparativa do perfil espermático do tamanduá-bandeira ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> Linnaeus, 1758)		
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina, Veterinária e Zootecnia USP		CNPJ: 63.025.530/0019-33

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	VRA - FMVZ - USP

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 74771527**



Página 2/3



### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 16363-1</b>	<b>Data da Emissão: 09/10/2008 18:32</b>	<b>Data de Validade: 09/10/2009</b>
<b>Dados do titular</b>		
Registro no Ibama: 2686292	Nome: Marco Antonio Carstens Mendonça	CPF: 237.631.831-9
Título do Projeto: Análise descritiva e comparativa do perfil espermático do tamanduá-bandeira ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> Linnaeus, 1758)		
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina, Veterinária e Zootecnia USP		CNPJ: 63.025.530/0001-9

### Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte de material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a respectiva anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, de preferência, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCNB).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. A partir do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página [www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio) na internet.

**Código de autenticação: 74771527**



## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MENDONÇA, Marco Antonio Carstens

Título: Análise descritiva do perfil espermático do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) de cativeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai,  
que sempre me incentivaram ao estudo,  
proporcionando o suporte necessário  
para que eu pudesse alcançar tudo que desejei.*

## **AGRADECIMENTO**

Ao meu caríssimo orientador Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, por ter me acolhido e orientado com tanta dedicação, incentivo e generosidade, cujos ensinamentos preciosos, jamais esquecerei.

Ao meu amigo Dr. Marcílio Nichi por ter emprestado seu conhecimento e dedicado com empenho e competência para a obtenção dos dados deste trabalho.

À minha amiga Renata Simões pela dedicação do seu precioso tempo para a realização do SCSA e por sua amizade.

Ao meu querido amigo Pietro Sampaio Baruselli e sua família, por sua amizade, incentivo, pela recepção calorosa a mim sempre dedicada e pelo muito que aprendi, mesmo sem a intenção dele ensinar.

Ao meu dedicado amigo e colega Rodrigo Hidalgo Friciello Teixeira, pelo imprescindível apoio a este trabalho.

Ao meu dedicado amigo e colega Fabrício Braga Rassy, por ter anestesiado com profissionalismo os animais submetidos ao trabalho.

Aos colegas Ramiro da Neves Dias Neto, Mariana Borges Fraga, Roberta Biasoto Bruna Miranda, estagiários do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, pelo importante auxílio.

Aos colegas Mateus Torres Marinheiro e Marisa dos Santos do Instituto Bosque Municipal Dr. Fábio de Sá Barreto, pelo auxílio e confiança em submeter os animais à esta pesquisa.

Aos colegas Maria Emília Podeini Santiago e Luiz Antônio da Silva Pires do Parque Zoológico Municipal de Bauru, pelo auxílio e confiança em submeter os animais a esta pesquisa.

À colega Érica Pacífico e Hans do Zooparque Itatiba, pelo auxílio e confiança em submeter os animais a esta pesquisa.

Às colegas Cláudia Almeida Igayara de Souza e Fernanda de Castro Magalhães do Jd. Zoológico Municipal de Guarulhos, pelo auxílio e confiança em submeter o seu animal Tomé a esta pesquisa.

Ao Criadouro Conservacionista Alphavillage, pela confiança em submeter o seu animal a esta pesquisa.

Ao meu querido amigo Duarte e sua empresa Duboi, que me apoiaram desde o início do trabalho, fornecendo o eletroejaculador, sem o qual não seria possível a execução deste trabalho.

Às Professoras Valquiria Hyppolito Barnabe e Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, por suas ricas aulas, por terem ajudado desde o início e pela abertura, à mim concedida no laboratório de andrologia.

Ao meu grande e inseparável amigo José Carlos Thimoteo Lobreiro, por ter sabiamente plantado sementes que germinaram.

À minha esposa Margarete por ter me apoiado para a realização do mestrado e pelo seu amor à mim dedicado ao longo desses anos.

Às minhas filhas Paula e Isabella, pelo amor que sempre recebi.

Aos Prof. Dr. Carlos Eurico Fernandes (UFMS) e Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini (USP) pela ajuda na identificação de algumas anormalidades espermáticas.

Ao meu querido amigo José Milton Longo, por ter me proporcionado a preciosa oportunidade de atuar com animais silvestres, o que me incentivou a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Michael D`Ochio, pelas suas aulas maravilhosas, pelo convite de estudo em seu país e principalmente pelo tamanduá-bandeira fêmea que me ofereceu como presente, servindo sempre de incentivo a continuar meu trabalho.

À colega Mariana por sua amizade e por sua ajuda, ensinando a interpretar as lâminas.

Aos funcionários Harumi, Thais, Alice, Miguel e D. Sílvia, que me deram suporte em vários momentos no VRA.

Aos meus queridos colegas Marina Berrettini, Lílian Kisch Dias, Zé Nélio e Gabriel por sua amizade e incentivo desde o período de seleção.

Aos Professores, José Antonio Visintin, Cláudio Alvarenga de Oliveira, Ed Hoffmann Madureira, Mario Binelli, Camila Infantsi Vannucchi, Rubens Paes de Arruda e tantos outros que não citei, pela gentileza e generosidade com que transferiram seus conhecimentos e que me serão úteis para sempre.

Ao Meu Velho Camarada Herbert Ghersel pela ajuda prestada na finalização deste trabalho e à sua mãe, Prof<sup>a</sup>. Siva Geni Ghersel pela correção do português e carinho que sempre teve comigo.

## Tamanduá diverso

Há vida no ar!  
De um ar tamanho,  
Selvagem d'antanho,  
Que sempre regeu o ser e o estar.  
A vida não invade: controla, retoma,  
Avoca, digere, renova, proclama,  
Gere cromatinas, eclode as cruzas,  
Brotando difusas... e o homem lá está.  
É mais um, voraz em seu viço,  
Mas tem compromisso, sob pena de arfar.  
Atitude e ciência, em prosa ou verso,  
enjaulam, libertam, dependem do tino.  
Valha-se em luz do diverso, desde menino  
E entenderá:  
Que beleza melhor representa a natureza,  
Do que o estranho esplendor de um Tamanduá?

Lúcio Bulhões  
22/02/2010

## RESUMO

MENDONÇA, M. A. C. **Análise descritiva do perfil espermático do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) de cativeiro.** [Spermatic profile of captive Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758)]. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootenia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O objetivo do presente estudo é descrever as características físicas, químicas, morfológicas e funcionais do sêmen do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) em cativeiro. Estes resultados representam um dos primeiros requisitos para o conhecimento das características seminais da espécie, visando, em médio prazo, a aplicação de técnicas de reprodução assistida e a formação de bancos de germoplasma. Treze animais foram submetidos à colheita de sêmen em zoológicos no estado de São Paulo – Brasil. O método para colheita de sêmen foi a eletroejaculação, semelhante ao realizado em várias espécies silvestres e domésticas, resultando em onze amostras colhidas de nove indivíduos (69,23%). Os testes convencionais indicaram um volume médio de  $1,30 \pm 0,58$  ml, a motilidade média de  $33,18 \pm 20,14\%$ , o vigor médio de  $2,30 \pm 0,65$ , a concentração média de  $129,41 \pm 114,3 \times 10^6 / \text{cm}^3$ , o pH médio de  $7,44 \pm 0,60$ . A avaliação morfológica apresentou média de defeitos totais de  $64,53 \pm 19,97\%$ , defeitos maiores  $53,77 \pm 33,22\%$  e defeitos menores  $10,75 \pm 6,23\%$ . Nos testes funcionais, a avaliação da integridade da membrana acrossomal mostrou uma média de  $16,3 \pm 9,3\%$  de danificadas. A avaliação da integridade da membrana plasmática mostrou uma média de  $18,9 \pm 12,2\%$  de danificadas. A avaliação da atividade mitocondrial revelou as seguintes médias: Classe I =  $66,4 \pm 19,0\%$ ; Classe II =  $18,7 \pm 9,1\%$ ; Classe III =  $8,0 \pm 6,3\%$ ; Classe IV =  $3,9 \pm 3,1\%$  e Classe V =  $3,0 \pm 2,9\%$ . A avaliação da fragmentação de cromatina resultou em uma média de  $13,21 \pm 9,13\%$ . Conclusão: foi demonstrada a aplicabilidade da eletroejaculação na colheita de sêmen de tamanduás-bandeira. Os testes possibilitaram uma análise detalhada das características seminais da espécie, aspectos estes ainda inéditos na literatura mundial. Houve grande variação nos resultados obtidos, refletindo diferenças das condições de manejo e de idade entre os indivíduos e, possivelmente um baixo

número amostral estudado. Novos estudos devem ser realizados em animais de vida livre.

Palavras-chave: *Myrmecophaga tridactyla*. Tamanduá-bandeira. Sêmen. Eletroejaculação. Espermograma.

## ABSTRACT

MENDONÇA, M. A. C. **Spermatic profile of captive Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758).** [Análise descritiva do perfil espermático do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) de cativo]. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootenia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The purpose of the present study was to describe the physical, chemical, morphological, and functional features of semen collected from Giant Anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) raised in captivity—a first step toward the feasibility of assisted reproduction techniques and germplasm banks for this species in the mid-term future. Electroejaculation, a method currently applied to a number of wild and domestic species, was performed in 13 animals housed in zoos located in the state of São Paulo, Brazil, yielding 11 samples from 9 animals (69.23%). The following mean values were obtained: volume,  $1.30 \pm 0.58$  mL; motility,  $33.18 \pm 20.14\%$ ; vigor,  $2.30 \pm 0.65$ ; concentration,  $129.41 \pm 114.3 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$ ; pH,  $7.44 \pm 0.60$ . Major and minor defects accounted for  $53.77 \pm 33.22\%$  and  $10.75 \pm 6.23\%$  of the total, respectively (mean total defect rate,  $64.53 \pm 19.97\%$ ). Damage was found in  $16.3 \pm 9.3\%$  of acrosomal membranes and  $18.9 \pm 12.2\%$  of plasma membranes. Mitochondrial activity, categorized as Classes I through V, was  $66.4 \pm 19.0\%$ ,  $18.7 \pm 9.1\%$ ,  $8.0 \pm 6.3\%$ ,  $3.9 \pm 3.1\%$ , and  $3.0 \pm 2.9\%$ , respectively. Chromatin fragmentation rate was  $13.21 \pm 9.13\%$ . Conclusion: The study demonstrated the feasibility of applying electroejaculation to Giant Anteaters for semen collection, allowing for a detailed description of semen features previously unreported for this species. The large variation found in the results reflects differences in management conditions, age range, and possibly the small number of sampled animals, thus warranting further studies with free-ranging specimens.

Keywords: *Myrmecophaga tridactyla*. Giant anteater. Semen. Electroejaculation. Spermogram.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Identificação do animal com leitora de microchip.....	52
Figura 2 - Colheita do sêmen de tamanduá-bandeira ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> ).....	56
Figura 3 - Colheita do sêmen de tamanduá-bandeira ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> ) .....	56
Figura 4 - Sêmen de tamanduá-bandeira ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> ) .....	56
Figura 5 - Aspecto geral do sêmen de tamanduá-bandeira ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> ). Aumento de 100x.....	57
Figura 6 - Sêmen de tamanduá-bandeira ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> ) centrifugado com soro fisiológico para lavagem.....	57
Figura 7 - Espermatozóide com acrossoma íntegro. Coloração simples de Pope. Aumento 3000x. ....	66
Figura 8 - Espermatozóide com acrossoma não-íntegro. Coloração simples de Pope. Aumento 3000x. ....	66
Figura 9 - Espermatozóide da direita com membrana plasmática não-íntegra e da esquerda íntegra. Coloração de E/N. Aumento 3000x. ....	68

Figura 10 - Espermatozoides com membrana plasmática íntegra e não-íntegra. Coloração de E/N. Aumento 1000x .....	68
Figura 11 - Classe I: espermatozóide com alta atividade mitocondrial. Aumento 3000x. ....	70
Figura 12 - Classe II: espermatozóide com predomínio da atividade mitocondrial. Aumento 3000x. ....	70
Figura 13 - Classe III: espermatozóide com mediana atividade mitocondrial. Aumento 3000x. ....	70
Figura 14 - Classe IV: espermatozóide pouca atividade mitocondrial. Aumento 3000x. ....	70
Figura 15 - Classe V: espermatozóide sem atividade mitocondrial. Aumento 3000x. ....	71

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Protocolo anestésico utilizado na colheita de sêmen dos tamanduás-bandeira dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 ..... 45
- Tabela 2 - Avaliação física e química do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 ..... 59
- Tabela 3 - Avaliação morfológica resumida do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 ..... 61
- Tabela 4 - Avaliação morfológica detalhada do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 ..... 62
- Tabela 5 - Ocorrência nas amostras e média das anormalidades espermáticas de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 ..... 63
- Tabela 6 - Avaliação da integridade do acrossoma com coloração simples de Pope (POPE et al., 1991) do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo - 2009 ..... 65
- Tabela 7 - Avaliação da integridade da membrana plasmática com eosina-nigrosina (Barth e Oko, 1989) do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 ..... 67

Tabela 8 - Avaliação da atividade mitocondrial através da técnica citoquímica de oxidação da DAB - 3,3'-diaminobenzidina (Hrudka,1987) do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 ..... 69

Tabela 9 - Percentual de fragmentação de cromatina através da Análise de Estrutura da Cromatina Espermática - SCSA (BOE-HANSENA, 2005) do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 ..... 72

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Zoológicos e criadouro do Estado de São Paulo e respectivos números de machos de tamanduá-bandeira em 2009 .....	41
Quadro 2 – Pesagem, hematócrito e temperatura no momento da colheita de sêmen dos tamanduás-bandeira dos zoológicos do Estado de São Paulo.....	42
Quadro 3 – Histórico reprodutivo dos animais submetidos à colheita de sêmen dos tamanduás-bandeira dos zoológicos do Estado de São Paulo .....	43
Quadro 4 - Peso, valores de hematócrito e temperatura retal dos tamanduás-bandeira dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 .....	53
Quadro 5 - Relação dos animais submetidos à colheita de sêmen com a respectiva produção - zoológicos do Estado de São Paulo – 2009 .....	55

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	27
2.1 SISTEMÁTICA .....	27
2.2 DISTRIBUIÇÃO .....	28
2.3 ASPECTOS ANATÔMICOS, FISIOLÓGICOS, REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTAIS .....	28
2.4 SITUAÇÃO ATUAL DA ESPÉCIE.....	31
2.5 AVALIAÇÃO DE SÊMEN .....	32
2.5.1 <b>Avaliação convencional</b> .....	32
2.5.2 <b>Avaliação funcional</b> .....	33
2.5.3 <b>Avaliação da integridade da membrana plasmática</b> .....	34
2.5.4 <b>Avaliação da integridade do acrossoma</b> .....	34
2.5.5 <b>Avaliação da atividade mitocondrial</b> .....	35
2.5.6 <b>Análise de estrutura da cromatina espermática</b> .....	36
2.5.7 <b>Síntese da avaliação de sêmen</b> .....	38
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>4 OBJETIVO</b> .....	40
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
5.1 ANIMAIS .....	41
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS .....	42
5.3 CONTENÇÃO E ANESTESIA.....	44
5.4 COLHEITA DE SÊMEN .....	45
5.5 AVALIAÇÃO DO SÊMEN .....	47
5.5.1 <b>Testes convencionais</b> .....	47
5.5.2 <b>Testes funcionais</b> .....	48
5.5.2.1 Preparo do sêmen para coloração.....	48
5.5.2.2 Avaliação da integridade acrossomal .....	49
5.5.2.3 Avaliação da integridade da membrana plasmática .....	49
5.5.2.4 Avaliação da atividade mitocondrial.....	50

5.5.2.5 Análise de Estrutura da Cromatina Espermática .....	51
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
6.1 ANIMAIS .....	52
6.2 COLHEITA DO SÊMEN.....	53
6.2.1 <b>Eletroejaculação</b> .....	53
6.3 TESTES CONVENCIONAIS .....	57
6.3.1 <b>Avaliação física e química do sêmen</b> .....	57
6.3.2 <b>Avaliação morfológica</b> .....	59
6.3.2.1 Avaliação morfológica detalhada .....	62
6.4 TESTES FUNCIONAIS .....	64
6.4.1 <b>Avaliação da integridade do acrossoma</b> .....	64
6.4.2 <b>Avaliação de membrana plasmática</b> .....	66
6.4.3 <b>Avaliação da atividade mitocondrial</b> .....	67
6.4.4 <b>Análise de Estrutura da Cromatina Espermática</b> .....	70
6.4.5 <b>Considerações sobre os resultados</b> .....	71
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente ação antrópica sobre as reservas verdes do planeta, justificada pelo desenvolvimento econômico, tem ameaçado constantemente espécies a extinção, incluindo aquelas nem ainda identificadas. A perda da diversidade pode ser analisada por meio de estudos dos efeitos da ocupação humana, promotora do empobrecimento ambiental progressivo e provocando o desaparecimento de uma variedade de espécies (MAZZOLLI, 2005). As causas mais freqüentes da degradação ambiental são os desmatamentos, as construções de barragens, a poluição química produzida pelas indústrias, os acidentes como derramamentos de óleo, o crescimento urbano desordenado, assim como as atividades rurais. Como resultado, ocorre a fragmentação e redução de diversos ecossistemas, interferindo diretamente na extinção de inúmeras espécies animais e vegetais (GUIMARÃES, 2001).

De modo semelhante, as rodovias também desempenham papel relevante como fator desenvolvimentista causador de impacto ambiental, pois nelas morrem muitos animais atropelados todos os anos, constituindo esta uma importante causa de mortalidade de fauna (RODRIGUES, 2002; SCOSS, 2002; ROSA, 2004; PRADA, 2004; BAGATINI, 2006; FEARNside, 2006; CHEREM, 2007; MELO, 2007; HENGEMÜHLE, 2008). As taxas de mortalidade de animais silvestres por atropelamento em rodovias brasileira variam de 2,39 a 3,35 animais/Km/ano. Este valor superior foi verificado na rodovia federal BR-070, que liga Cáceres a Cuiabá, no Estado de Mato Grosso, observada entre novembro de 2000 a outubro de 2001 (MELO, 2007). Nas rodovias no nordeste do Estado de São Paulo, entre agosto de 2002 a agosto de 2003 ocorreu uma taxa de 2,49 animais/Km/ano (PRADA, 2004). Nas rodovias da região de Planaltina, Distrito Federal, que circundam a Estação Ecológica de Águas Emendadas – ESECAE foi encontrada uma taxa de atropelamento de 2,392 animais/Km/ano entre 2004 e 2005 (BAGATINI, 2006). Logo, considerando somente a malha rodoviária federal, construída até 2008, que perfaz uma distância de 118.099 Km (DNIT, 2008), perceberemos que a mortalidade de animais silvestres por atropelamento nas rodovias brasileiras pode ser em número assustador, constituindo uma séria ameaça para a fauna. O levantamento sobre atropelamento de animais silvestres, realizado no Mato Grosso do Sul, ao

longo de 140 Km da BR-262, que liga as cidades de Campo Grande e Aquidauana, no período de maio de 2002 a agosto de 2004, revela que a ordem Xenarthra aparece na segunda e terceira posições em ocorrência de atropelamentos, representada pelo tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) respectivamente, sendo o lobinho (*Cerdocyon thous*) o animal silvestre mais atropelado (CASELLA, 2006).

Os incêndios naturais e provocados nos campos e nas matas são também causas de mortes, a exemplo do que ocorreu em 1994 no Parque Nacional das Emas no Estado de Goiás, que atingiu 100% daquela área e que provocou incalculáveis prejuízos à fauna e flora brasileiras (SILVEIRA, 1999).

Entre as 41.415 espécies listadas na International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN, 2007a), 16.306 foram consideradas ameaçadas em 2007, número superior em relação às 16.118 espécies do ano anterior, o que demonstra um aumento maior que 1% neste período. O número total já representa 785 espécies extintas na natureza. A proporção de 1 em 4 mamíferos, 1 em 8 aves, um terço de todos os anfíbios e 70% das plantas avaliadas, do planeta, que constam da Lista Vermelha de 2007 da IUCN, encontram-se ameaçadas (IUCN, 2007b). Portanto, os cativeiros, representados principalmente pelos zoológicos, desempenham um papel fundamental na manutenção de espécies silvestres ameaçadas de extinção. Entretanto, é importante ressaltar que todos os esforços pela manutenção e reprodução de espécies em cativeiros deveriam ser acompanhados da redução da degradação ambiental, fato este que teria um efetivo resultado na conservação (GUIMARÃES, 2001). A ciência da biodiversidade aumenta em quantidade e em qualidade, enquanto que a destruição de *habitats* nos grandes biomas brasileiros se mantém em taxas alarmantes (SCARANO, 2007).

O Brasil é considerado o quinto maior país em extensão territorial do planeta e o primeiro dentre os países megadiversos, que representa aproximadamente 14% da biota mundial, e que abriga a maior diversidade de mamíferos, com cerca de 530 espécies descritas e muitas ainda sem serem catalogadas (COSTA, 2005). Fonseca et al. (1999) ressaltam que a destruição do ambiente vem sendo, portanto, uma das principais causas do declínio populacional do tamanduá-bandeira. A baixa reprodução em cativeiro desta espécie é outro fator limitante para sua conservação (MIRANDA, 2004b).

Com a redução dos *habitats* e a fragmentação dos ecossistemas, ocorreu o isolamento de populações silvestres, ocasionando um decréscimo da reprodução e, portanto, diminuição do número de indivíduos. Com um número reduzido de indivíduos reproduzindo, aumenta a chance de ocorrer endogamia nessas populações, e conseqüentemente, redução da variabilidade genética, conduzindo a uma perda de adaptação. Nesse contexto, percebe-se a importância da reprodução, tanto *in situ*, quanto *ex situ* para a manutenção de uma dada população, evidenciando a relevância da aplicação de técnicas de reprodução assistida aplicada às espécies silvestres ameaçadas de extinção, objetivando favorecer o desempenho reprodutivo e promovendo a sobrevivência (GUIMARÃES, 2008).

As biotécnicas reprodutivas, como exemplo a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a clonagem necessitam de recursos para que possam ser utilizadas de forma consistente e produtiva. Isto requer o desenvolvimento de pesquisas básicas visando ao conhecimento dos mecanismos e estruturas envolvidas na reprodução da espécie para a obtenção de resultados confiáveis e consistentes da aplicação das técnicas de reprodução assistida. (HOWARD, 1993; GUIMARÃES, 2008).

Em vista disso, a aplicação de técnicas que podem incrementar o desempenho reprodutivo, torna-se de vital importância para a conservação do tamanduá-bandeira. Portanto, a biotecnologia é uma ferramenta importante para a manutenção da diversidade genética que, aliada à consciência ambiental, pode mitigar os prejuízos na fauna.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SISTEMÁTICA

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Mammalia

Ordem: Xenarthra

Família: Myrmecophagidae

Gênero: *Myrmecophaga*

Espécie: *Myrmecophaga tridactyla*

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758), pertencente à ordem *Xenarthra* (Xenon = estranho e Arthros = articulação), recentemente desmembrada em duas ordens: *Cingulata* representada pelos tatus e *Pilosa* pelos tamanduás e preguiças. O *Myrmecophaga tridactyla* pertence à subordem *Vemilingua* e família *Myrmecophagidae*, representada por três gêneros e quatro espécies de tamanduás. No Brasil ocorrem, além do tamanduá-bandeira, outras duas espécies representantes da família *Myrmecophagidae*: o tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e o Tamanduáí (*Cyclopes didactylus*), sendo este último, o menor representante dessa família, podendo atingir 200g de massa corporal na idade adulta. Anteriormente, as várias espécies de tamanduás, preguiças e tatus, pertenciam à ordem *Edentata*, o que significa “sem dentes”, porém, somente os tamanduás são totalmente desprovidos de dentes (MEDRI, 2006; MIRANDA, 2006).

## 2.2 DISTRIBUIÇÃO

O tamanduá-bandeira é um animal terrestre, de hábito solitário e está presente na América Latina, desde a região sul de Belize e Guatemala até o norte da Argentina. No Brasil, esta espécie habita todos os biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Campos Sulinos (FONSECA et al., 1996).

## 2.3 ASPECTOS ANATÔMICOS, FISIOLÓGICOS, REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTAIS

Em um levantamento biométrico, realizado no Parque Nacional das Emas, em 18 machos e 7 fêmeas, todos adultos, constatou-se uma diferença significativa no comprimento rostro-anal entre machos e fêmeas, apresentando, no macho as medidas de 1.279,44 mm e na fêmea 1.204,57 mm, respectivamente. O comprimento da cauda dos machos foi de 630,22 mm, enquanto que as fêmeas apresentaram 672,14 mm, não havendo diferença significativa entre as médias no teste-*t* (MIRANDA, 2003). O peso pode atingir 45 Kg na fase adulta (SILVEIRA, 1969).

Possuem articulações adicionais entre as vértebras lombares que possibilitam a este integrante da mastofauna latino-americana, assumir uma postura ereta sobre um tripé, formado pelos membros posteriores e a cauda, viabilizando sua resposta defensiva. Outra diferença anatômica é a veia cava posterior dupla, número de vértebras cervicais variando de seis a nove, dependendo da espécie, enquanto que a maioria dos outros mamíferos apresenta um número de sete vértebras cervicais. As fêmeas possuem um ducto comum para o trato urinário e genital e os machos apresentam testículos ovalados internos, intra-abdominais ao longo da vida (BARTMANN, 1991; NOWAK, 1999; DICKMAN, 2001). Os testículos são revestidos pela túnica albugínea e estão relacionados cranialmente com os rins, dorso medial com o reto e caudal com a bexiga e apresentam temperatura variando de 32° a 34° centígrados, em conformidade com a temperatura corporal desta espécie. A artéria

testicular ramifica os testículos de forma que o sangue de retorno flui por uma veia que faz parte do plexo pampiniforme e forma a veia renal. Apesar de ter um amplo plexo pampiniforme, este não atua na termorregulação testicular, provavelmente pelo fato de ser interno ao corpo. Apresenta cabeça, corpo e cauda do epidídimo por onde passa o sêmen produzido pelos testículos. As glândulas sexuais acessórias são representadas pela próstata, glândula vesicular e glândula bulbouretral e estão diretamente envolvidas com o transporte da secreção espermática. Apresenta um volume ejaculado relativamente elevado, provavelmente para compensar a pequena penetração vaginal. Existe a formação do tampão ejaculatório na vagina da fêmea. O pênis pequeno e chato é situado ventralmente ao ânus e fica coberto por uma vagina masculina, resquício do ducto de Müller. A saída uretral termina em uma posição dorso ventral. A uretra é envolta por um par de corpos cavernosos (BARTMANN, 1991).

Uma característica marcante da fisiologia do tamanduá-bandeira é a baixa temperatura corporal associada à baixa taxa metabólica, quando comparado aos demais mamíferos. Provavelmente, isto se deve à sua alimentação de baixo teor calórico, composta, predominantemente, por formigas (família Formicidae) e térmitas (famílias Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae) (DICKMAN, 2001). Isto parece limitar a distribuição da espécie, que ocorre nas regiões mais quentes. Em monitoramento com GPS (*Global Position System*) modificado, realizado no Pantanal, o *Myrmecophaga tridactyla* apresentou maior atividade nas horas em que as temperaturas eram amenas e, geralmente, valendo-se dos fragmentos de mata para abrigo, nos períodos mais quentes do dia. Esse comportamento sugere ser uma tentativa de realizar a regulação da temperatura corporal, podendo ter uma estreita faixa de conforto térmico, se comparado aos demais animais homeotermos (MEDRI, 2002).

Os tamanduás-bandeira possuem glândulas anais odoríferas favorecendo a comunicação e marcação de trajetos. Apresentam o olfato apurado, o que compensa a pouca visão e audição desta espécie. Possuem adaptações anatômicas com finalidade de favorecer a busca e apreensão de alimentos tais como garras dianteiras grandes e afiadas, com finalidade de abrir formigueiros e cupinzeiros, focinho alongado, saliva pegajosa e língua vermiforme e extensível, com até 60 cm de comprimento, podendo colocá-la para fora da cavidade bucal até 160 vezes por

minuto. Cada indivíduo adulto pode consumir até 35.000 formigas e/ou cupins por dia (NOWAK, 1999; DICKMAN, 2001). Nos zoológicos do Estado de São Paulo é oferecida uma papa que pode conter banana, mamão, maçã, beterraba, cenoura, ovo cozido, óleo de fígado de bacalhau, coalhada, ração canina, carne moída, leite de soja, leite em pó, Farinha Láctea®, Sustagen®, Karo®, vitamina K (10mg), complexo vitamínico e terra de cupinzeiro. Periodicamente é oferecido o montículo de um cupinzeiro para o animal realizar um repasto mais apropriado, favorecendo a redução do estresse de cativeiro (Informação verbal)<sup>1</sup>.

Os tamanduás não são territorialistas e têm um comportamento solitário, exceto as fêmeas paridas e casais durante o curto período de reprodução. Eventualmente ocorrem encontros agonísticos, cuja motivação é pouco conhecida. A gestação da fêmea dura em torno de 190 dias e produz um filhote por parição, com cerca de 1,3 kg e o carrega no dorso por 6 a 9 meses, demonstrando um intenso cuidado parental desta espécie (EISENBERG, 1999). A fêmea mantida em cativeiro não apresenta mudança comportamental no período do estro e em vida livre. Foi observado corrimento vaginal associado a este período. Durante o estro, quando cortejada pelo macho, levanta a cauda, sendo por ele seguida de perto e eventualmente, cheirada (SHAW et al., 1987). A cópula se dá com a fêmea em decúbito lateral, ocorrendo diversas vezes ao dia, durante três dias, mas o sucesso reprodutivo é excepcional (BARTMANN, 1983).

Os tamanduás têm apenas um período de atividade por dia, cuja duração é reduzida em função da diminuição da temperatura ambiente média diária. No Pantanal, geralmente com clima quente, os tamanduás-bandeira são noturnos, mas na medida em que a temperatura média diminui, a sua atividade inicia e termina progressivamente mais cedo.

---

Informação fornecida pelos médicos veterinários responsáveis nos zoológicos onde este trabalho foi realizado.

Portanto, com a progressiva redução da temperatura, tamanduás-bandeira vão se tornando cada vez mais ativos durante o dia e menos ativos durante a noite, aumentando assim a sua exposição à radiação solar, com finalidade de evitar perda excessiva de calor corporal durante a noite (ALVES, 2006). A velocidade máxima registrada por um animal desta espécie foi de 6,6 km/h com uma mediana de 0,2 km/h, podendo percorrer uma média de 5,8 km/dia (MEDRI, 2002). A área de vida de 4 machos rastreados com rádio-colar e unidade de GPS, programada para registrar o posicionamento a cada 10 minutos, realizado no Pantanal da Nhecolândia, nas Fazendas Nhumirim e Porto Alegre no município de Corumbá – MS, variou de 4,0 a 7,5 Km<sup>2</sup> com média de  $5,7 \pm 1,7$ , enquanto uma fêmea teve área de vida de 11,9 Km<sup>2</sup>, com a ocorrência de sobreposições (MEDRI, 2002). A espécie de carrapato encontrada com maior frequência foi o *Amblyomma cajennense*, coletada em 11 animais e *Amblyomma parvum*, coletada em 4 tamanduás-bandeira. O forrageamento ocorre nos campos em bordas de lagoas, onde há grande concentração de formigueiros, embora possa também ocorrer na mata fechada. No mês de junho, os tamanduás-bandeira são encontrados com maior frequência nos campos de capim carona (*Elyonurus muticus*), onde ocorrem cupinzeiros em maior quantidade. No Pantanal, a espécie de cupim mais forrageada foi *Nasutitermes coxipoensis*, sendo a segunda a *Armitermes* sp. As espécies de formigas consumidas foram: *Solenopsis interrupta* (36%), *Solenopsis saevissima* (36%), *Solenopsis pusillignis* (5%), *Camponotus crassus* (7%), *Camponotus renggeri* (5%), *Solenopsis invicta* (5%), *Ectatomma planidens* (2%), *Labidus spininodis* (2%) e *Odontomachus minutus* (2%) (MEDRI, 2002).

#### 2.4 SITUAÇÃO ATUAL DA ESPÉCIE

O tamanduá-bandeira está incluído na lista de fauna brasileira ameaçada de extinção do Ministério do Meio Ambiente (IBAMA, 2003) como espécie vulnerável em todos os biomas brasileiros. É também considerado “vulnerável” por instituições internacionais (CITES, 1999; IUCN, 2007a).

No Parque Nacional das Emas, foram encontradas evidências de baixo nível de polimorfismo em uma população de *Myrmecophaga tridactyla*, quando comparada aos dados de Garcia et al. (2005). Estes resultados indicam que o número de animais vem decrescendo ao longo dos anos e que os cruzamentos endogâmicos na espécie aumentaram, sendo isto corroborado pela baixa variabilidade genética. (COLLEVATTI, 2007).

## 2.5 AVALIAÇÃO DE SÊMEN

### 2.5.1 Avaliação convencional

A predição da fertilidade no macho é um tema amplamente discutido pela comunidade científica. Para determinar se um teste laboratorial tem correlação com fertilidade, é essencial que as avaliações sejam específicas e precisas para serem comparadas com os resultados de prenhes (AMANN, 1989). O diagnóstico de fertilidade masculina, no que se refere à *potentia generandi*, apresenta resultados dinâmicos e depende de uma criteriosa avaliação do ejaculado. Os parâmetros tradicionalmente usados para se avaliar um ejaculado são: o volume, o aspecto, o movimento de massa ou turbilhão, a motilidade, o vigor, a concentração de células e avaliação da morfológica (CBRA, 1998). Além de distúrbios na espermatogênese, fatores como a técnica e frequência da colheita contribuem para a variação de qualidade da amostra colhida (MALMGREN, 1997). Portanto, o exame andrológico deve ser realizado com cuidado e o resultado precisa ser interpretado de forma conservadora. Geralmente a fertilidade é considerada satisfatória, quando todos os critérios da avaliação apresentam resultados considerados normais para a espécie. Se um dos critérios utilizados para avaliar o sêmen apresentou resultado insatisfatório, a amostra deve ser classificada como inapta ou questionável. Ocasionalmente, um critério de qualidade do sêmen, avaliado como pobre, pode ser compensado por um outro critério avaliado como satisfatório; por exemplo, boa motilidade e baixa concentração, geralmente resultam em boas taxas de concepção

(ROBERTS, 1971). Para que a fertilidade seja plena, é necessário o acasalamento de machos e fêmeas funcionais e capazes de realizar todas as fases da reprodução. O macho deve produzir um sêmen normal e a fêmea, capaz de armazenar e ovular estruturas férteis. Concomitante a isso, o sistema reprodutivo da fêmea precisa favorecer o transporte dos espermatozóides e sua capacitação, a fecundação do óvulo, desenvolvimento embrionário e fetal e, finalmente, ser capaz de parir um filhote saudável (FOOTE, 2003). O princípio da fertilidade pode ser definido como um limiar mínimo de concentração espermática, da motilidade e alterações morfológicas, que devem ser ultrapassados para alcançar a concepção (AITKEN, 2006).

### **2.5.2 Avaliação funcional**

Há pouca dúvida de que as medidas de movimento de espermatozóides, status acrossomal e outras características, são significativamente correlacionados com a fertilidade (AMANN, 1989). Embora as avaliações do sêmen forneçam muitas informações, suas correlações com a fertilidade são, algumas vezes, contraditórias. Todavia, parece possível que a previsão de fertilidade no macho pode ser melhorada se parâmetros adicionais, com base nas características funcionais dos espermatozóides, fossem utilizados. Atualmente, é sugerida a realização de uma bateria de provas laboratoriais que avaliam a função celular, na tentativa de se prever a provável capacidade fecundante, tais como o uso de testes hiposmótico, citoquímico e sondas fluorescentes como marcador de integridade da membrana plasmática e acrossomal, função mitocondrial e de fragmentação de cromatina (HAFEZ, 1995; MALMGREN, 1997; COLENBRANDER, 2003; AITKEN, 2006; ANDRADE, 2007; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007; CELEGHINI, 2008).

### 2.5.3 Avaliação da integridade da membrana plasmática

A viabilidade espermática está intimamente relacionada à integridade da membrana plasmática (IMP), cuja avaliação pode ser por meio de colorações vitais. A literatura também nomeia como vivos e mortos, o levantamento da IMP. Os corantes utilizados são a eosina-nigrosina, azul de tripan e azul de bromofenol (DERIVAUX, 1980; MIES FILHO, 1987b; OLIVEIRA, 2009). A comparação entre testes avaliadores da IMP demonstrou, em sêmen congelado de cinco touros da raça nelore, a existência de correlação entre a coloração com eosina/nigrosina e o teste hiposmótico ( $r = 0,55$ ;  $p < 0,01$ ), e entre eosina/nigrosina e sondas fluorescentes ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,01$ ). Na coloração com eosina/nigrosina, é encontrada uma proporção maior de células com membrana plasmática íntegra, se comparada com a fluorescência e teste hiposmótico ( $p < 0,0001$ ); entretanto, o teste ainda é considerado eficaz. (BRITO et al., 2003; ZÚCCARI, 2009).

### 2.5.4 Avaliação da integridade do acrossoma

O acrossoma possui função importante na fecundação. Sua estrutura tem sido difícil de descrever, devido às alterações que sofre durante o envelhecimento celular, ou após a morte celular (HANCOCK, 1953), bem como sua natureza instável na presença de agentes químicos ou físicos envolvidos na preparação do material para a avaliação laboratorial (BISHOP, 1957). Os espermatozoides de mamíferos são previamente submetidos à capacitação no aparelho reprodutor feminino para que ocorra a fecundação. Evidências indicam um período mínimo de seis horas antes da ovulação, sendo provavelmente este, o tempo necessário para uma resposta fisiológica das alterações nos espermatozoides, que lhes permitam atingir o pleno potencial fecundante. O transporte dos espermatozoides, do local de deposição até a parte superior do oviduto, pode variar de alguns minutos a 6 horas, com um número muito pequeno de células presentes no local da fecundação. O tempo de espera do óvulo pode variar de 6 horas para coelho, 24 horas para furão e de 20 a 30 horas para suíno, ovino e bovino (CHANG, 1951).

As alterações subcelulares envolvidas na capacitação parecem permitir a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  necessários para o início da reação acrossômica, contribuindo também para a hiperativação da motilidade. A reação acrossômica (RA) é um evento que faz parte da capacitação, necessário para o espermatozóide penetrar na zona pelúcida e fundir com o oócito. A RA inicia com a fusão da membrana plasmática com a membrana externa do acrossoma, acompanhada de uma extensa vesiculação de sua parte anterior, sendo pré-requisito para a união da membrana plasmática do óvulo com a do espermatozóide e penetração da zona pelúcida (BEDFORD, 1983). A RA ocorre *in vivo*, na fase final do transporte do espermatozóide ao local de fecundação, durante a sua passagem através das camadas de células que envolvem o oócito ou após o apego à zona pelúcida (TESARIK, 1985). A RA de mamíferos pode ser examinada com microscópio de luz por várias técnicas. Microscopia com contraste de interferência diferencial, tem sido utilizada para estudar mudanças no acrossoma em espermatozóide bovino, fixados e a fresco (SAACKE, 1968). Vários métodos de coloração, tanto citoquímico e fluorescentes, têm sido desenvolvidos para avaliar o estado acrossomal e são amplamente utilizados em uma variedade de espécies (CROSS, 1989; POPE, 1991).

### 2.5.5 Avaliação da atividade mitocondrial

A avaliação do potencial de mitocôndria pode ser realizada com a técnica citoquímica fundamentada na oxidação do 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo citocromo c e complexo citocromo c oxidase. É uma reação em cadeia, onde o reagente é polimerizado e depositado nos locais de reação e identificado por sua cor marrom sob microscópio de luz ou por osmiofilia sob microscópio eletrônico. A reação ocorre em subcompartimentos mitocondriais, mais exatamente na face externa da membrana mitocondrial interna. A técnica foi validada em animais domésticos e de laboratório. O complexo citocromo c oxidase desempenha um papel fundamental na respiração celular e metabolismo energético, que é um pré-requisito para a função osmótica, de síntese, da motilidade e da manutenção da estrutura celular (HRUDKA, 1987).

### 2.5.6 Análise de estrutura da cromatina espermática

A função defeituosa do gameta masculino é a causa mais comum de infertilidade e, até recentemente, era difícil de ser avaliada e tratada. As membranas dos espermatozóides de mamíferos são ricas em ácidos graxos poli-insaturados e são sensíveis ao oxigênio indutor de danos mediado por peroxidação lipídica. A geração excessiva de espécies reativas de oxigênio por espermatozóides anormais e leucócitos seminais tem sido identificada como uma das poucas etiologias definidas, constituindo um poderoso mecanismo que podem danificar o espermatozóide, conduzindo à infertilidade. Em condições normais, o plasma seminal contém substâncias antioxidantes que podem proteger contra eventuais danos aos espermatozóides (SHEWEITA, 2005). Admite-se que o estresse oxidativo é um resultado do desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e de antioxidantes, presente nas células. Participam deste sistema enzimático a superóxido dismutase, glutathione peroxidase (GPx), catalase, vitamina C, vitamina E e outras substâncias como a albumina, glutathione, taurina, hipotaurina, as quais desempenham papel significativo na proteção celular contra danos oxidativos (CARVALHO, 2002; ALVAREZ, 2006; MAKKER, 2009). Os testes para avaliar a ação do estresse oxidativo sobre a integridade do DNA nuclear e mitocondrial fornecem informações sobre a capacidade de fecundação dos espermatozóides e de suporte do desenvolvimento embrionário (AITKEN, 2006).

Estresse fisiológico e ambiental, bem como as mutações genéticas e anomalias cromossômicas, podem perturbar os eventos bioquímicos, altamente refinados, que ocorrem durante a espermatogênese. Estas perturbações podem modificar a estrutura da cromatina, tornando a célula incompatível com a fertilidade, desencadeando a apoptose ou necrose (DARZYNKIEWICZ et al., 1997). As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) contribuem para as funções espermáticas fisiológicas em níveis baixos e funções patológicas em níveis elevados (BECKMAN, 1997). Em níveis fisiológicos, EROs modula as atividades de genes e proteínas, vitais para a gametogênese e função espermática. No entanto, níveis elevados de EROs estão relacionados à estrutura anormal da cromatina, apoptose e necrose celular (BIZE et al., 1991). Excesso de produção de EROs por espermatozóides

também está relacionada com a retenção de citoplasma residual na peça intermediária (GOMEZ et al., 1996) e alterações funcionais (AITKEN et al., 1995; AGARWAL et al., 1996). Sêmen criopreservado de mamíferos é geralmente reconhecido por ter uma fertilidade mais baixa, se comparado com o sêmen fresco. Perturbações na membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial podem ocorrer durante os processos de criopreservação de sêmen por influência da refrigeração, congelação, composição do diluente, estresse osmótico e descongelamento (PARKS, 1992; WATSON, 2000). Os fatores que influenciam no estado funcional das células recuperadas da criopreservação são a estabilidade da membrana, o dano oxidativo, a integridade do receptor de membrana e a estrutura nuclear (WATSON, 2000). A maioria das membranas apresenta componentes lipídicos heterogêneos e sofrem transições da fase de lamela para fase gel quando expostas à variação térmica (QUINN, 1985).

Nos homens férteis, a geração de EROs é devidamente controlado pelos antioxidantes. Sob essas condições, EROs desempenham um papel fundamental na manutenção das funções cinética e de fecundação do espermatozóide. Um dos EROs envolvidos nesta função é o peróxido de hidrogênio -  $H_2O_2$  - associado ao movimento de hiperatividade, necessário para o deslocamento dos espermatozoides no trato genital feminino até as células do cumulus (BIZE et al, 1991). Os radicais livres e  $H_2O_2$  estão envolvidos na indução da morte de células germinativas por apoptose e necrose (BARROSO, 2000). Modificações na estrutura da cromatina podem surgir durante a espermiogênese se o DNA fragmentado, atividades de ligação da nuclease endógena e DNA topoisomerase II (topo II) são anormais. Altos níveis de ambas, topo II e DNA fragmentado, estão presentes nas espermátides alongadas (ROCA, 1989; MC-PHERSON, 1993). Danos ao DNA em células da linhagem seminal têm sido associados a uma variedade de achados clínicos adversos, incluindo a fertilidade, um aumento da incidência de aborto e um risco aumentado de doença na prole (AITKEN, 2010). Espermatozoides com apoptose programada podem ter atividade mitocondrial, motilidade e características morfológicas normais, mas com o potencial fecundante baixo, o que pode ser definido pelo grau de atividade endonuclear e conseqüente fragmentação do DNA (BARROSO et al., 2000; HOST et al., 2000a,b). São recentes os ensaios utilizados em laboratório de pesquisa para avaliação de cromatina destacando-se o Cometa, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), Tunel, In Situ Nick Translation Assay

(NT) e a coloração com Acridine Orange. Evenson (2002) acredita que SCSA prestará uma sólida contribuição para a análise do perfil espermático, tanto para fins de diagnóstico, como de prognóstico.

### **2.5.7 Síntese da avaliação de sêmen**

Diante do exposto, é possível afirmar que a qualidade do espermatozóide é multifatorial e de difícil definição entre os diferentes fatores que variam em grau de importância nas diferentes espécies (MORRELL, 2008).

A reprodução assistida aplicada na conservação de espécies silvestres requer investigação básica para cada espécie. O estudo de mecanismos reprodutivos básicos é fundamental para o conhecimento dos processos fisiológicos que eventualmente permitam a utilização de técnicas de reprodução assistida (HOWARD, 1993). Até a presente data, nenhum estudo referente à técnica de colheita de sêmen ou das características seminais do *Myrmecophaga tridactyla* foi encontrado na literatura, o que sugere ser este um experimento inédito.

### 3 JUSTIFICATIVA

A descrição do perfil espermático do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) configura o primeiro requisito para o conhecimento das características seminais da espécie, visando, em médio prazo, a aplicação de técnicas de reprodução assistida como a criopreservação e inseminação artificial. Os resultados deste estudo poderão ser úteis para experimentos futuros que tem como objetivo a formação de bancos de germoplasma, e constituir um importante recurso tecnológico para a conservação dessa espécie.

#### 4 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é descrever as características físicas, químicas, morfológicas e funcionais do sêmen de exemplares mantidos em cativeiro do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

A população do estudo é constituída de treze exemplares machos, adultos da espécie *Myrmecophaga tridactyla*, que foram submetidos à colheita de sêmen pelo método de eletroejaculação. Os indivíduos são mantidos em zoológicos no Estado de São Paulo, conforme mostra o quadro 1.

Zoológico	Município	Nº de animais
Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros	Sorocaba	3
Parque Zoológico Municipal de Bauru	Bauru	2
Jardim Zoológico Municipal de Guarulhos	Guarulhos	1
Zooparque Itatiba	Itatiba	4
Instituto Bosque Municipal Dr. Fábio de Sá Barreto	Ribeirão Preto	2
Criadouro Conservacionista Alphavillage	Itu	1
	TOTAL	13

Quadro 1 – Zoológicos e criadouro do Estado de São Paulo e respectivos números de machos de tamanduá-bandeira em 2009

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram identificados segundo o método utilizado nas instituições onde o trabalho foi realizado. Todas as instituições, com exceção do Criadouro Conservacionista Alphavillage, que possui apenas um exemplar, utilizam o *microchip* com código exclusivo e inalterável, implantado no tecido subcutâneo, na região dorsal, inter-escapular e a identificação se dá com o uso de uma leitora que o decodifica. O método permitiu uma identificação inequívoca dos animais submetidos à colheita de sêmen. As amostras colhidas foram numeradas conforme consta no quadro 2.

Data da Colheita	Nome	Micro Chip	Tamanduá	Origem	Data de nascimento	Idade Anos	Amostras
16/03/09	-	963002000003608	Mt So1	Sorocaba	Sem registro	> 2	1
16/03/09	-	238322	Mt Bu2	Bauru	28/01/96	13	-
17/03/09	Aderbal	95900000016083	Mt Bu3	Bauru	28/01/96	13	2
17/03/09	Pascoal Neto	000131E38F	Mt So4	Sorocaba	05/04/02	7	3
17/03/09	Grandão	0001 DA53 B1	Mt So5	Sorocaba	Sem registro	Adulto	-
18/03/09	Tomé	00-0629-7A52	Mt Gl6	Guarulhos	01/05/07 ?	2	-
14/07/09	-	963002000003608	Mt So1	Sorocaba	Sem registro	> 2	4
14/07/09	Grandão	0001 DA53 B1	Mt So5	Sorocaba	Sem registro	Adulto	-
14/07/09	Pascoal Neto	000131E38F	Mt So4	Sorocaba	05/04/02	7	5
14/07/09	-	Criadouro Conservacionista Alphavillage	Mt lu7	Itu	Sem registro	Adulto	-
15/07/09	Duduzão	963002000002650	Mt Ri8	Ribeirão P.	Sem registro	Adulto	6
15/07/09	Tata	963002000002162	Mt Ri9	Ribeirão P.	Sem registro	Adulto	7
16/07/09	Tobias	963003000023231	Mt It10	Itatiba	Sem registro	Adulto	8
16/07/09	Tiaguinho	963003000024174	Mt It11	Itatiba	Sem registro	Adulto	9
16/07/09	Teodoro	963000000062549	Mt It12	Itatiba	Sem registro	Adulto	10
16/07/09	Teobaldo	963000000062421	Mt It13	Itatiba	Sem registro	Adulto	11

Quadro 2 – Pesagem, hematócrito e temperatura no momento da colheita de sêmen dos tamanduás-bandeira dos zoológicos do Estado de São Paulo

O quadro 3 mostra o histórico reprodutivo dos animais, colhido junto ao zoológico. Dos treze animais que participaram do levantamento, cinco não tinham histórico reprodutivo; um, nunca foi exposto à fêmea; quatro, tiveram contato ou copularam, mas sem sucesso; e três, tiveram progênie.

Tamanduá	Micro Chip	Origem	Histórico reprodutivo
Mt So1	963002000003608	Vida livre	Nunca foi exposto à fêmea.
Mt Bu2	238322	-	Sem histórico.
Mt Bu3	95900000016083	-	Cruzou em 2002 e nasceu um filhote.
Mt So4	000131E38F	Nasceu em Sorocaba	Convive com fêmeas, mas não produz.
Mt So5	0001 DA53 B1	Vida livre	Convive com fêmeas. Produziu o SB 606.
Mt Gi6	00-0629-7A52	-	Sem histórico.
Mt lu7	Criadouro Conser. Alphavillage	Nasceu em Sorocaba	Copulou sem sucesso.
Mt Ri8	963002000002650	Vida livre	Reproduziu por duas vezes, em 2006.
Mt Ri9	963002000002162	-	Copulou sem sucesso.
Mt It10	963003000023231	Vida livre	Copulou sem sucesso.
Mt It11	963003000024174	-	Sem histórico.
Mt It12	963000000062549	-	Sem histórico.
Mt It13	963000000062421	Vida livre	Sem histórico.

Quadro 3 – Histórico reprodutivo dos animais submetidos à colheita de sêmen dos tamanduás-bandeira dos zoológicos do Estado de São Paulo

### 5.3 CONTENÇÃO E ANESTESIA

No presente levantamento, todos os animais submetidos à colheita de sêmen realizaram jejum prévio mínimo de 12 horas. Antes da anestesia, foi realizada contenção física, ainda no recinto. A contenção dos animais foi realizada de acordo com os procedimentos rotineiros de cada instituição, geralmente utilizando puçá e escudo protetor. Na maioria dos animais, foi administrada a associação de cloridrato de cetamina e midazolam (Ketalar<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil e Dormonid injetável<sup>®</sup>, Roche, Brasil, respectivamente) por via IM (Tabela 1), com base no peso estimado do animal. Nos primeiros procedimentos anestésicos, no zoológico de Sorocaba, essa associação foi utilizada como pré-anestésico e a manutenção foi com óxido nitroso. O protocolo anestésico foi também modificado no zoológico de Guarulhos, onde o midazolam foi substituído por Diazepam. A complementação da dose deu-se logo após a pesagem, com finalidade de atingir um plano anestésico mais profundo, monitorado através dos sinais vitais e reflexos. Os animais foram conduzidos com auxílio de padiola e/ou veículo, do recinto onde se encontravam, até a sala de intervenções. Ali, eram pesados e colocados em macas de inox. Após o término do procedimento, o animal voltava ao recinto de origem e era acompanhado até o completo retorno da anestesia. A contenção química para realização do procedimento de colheita de sêmen, pelo método de eletroejaculação, vem sendo utilizada em espécies domésticas e silvestres (MIES FILHO, 1974; PLATZ et al., 1978; HOWARD, 1993).

Antes de se iniciar os procedimentos de colheita de sêmen, foi medida a temperatura retal e colhido sangue com anticoagulante, para realização de hematócrito, cujo objetivo foi avaliar minimamente o estado de saúde dos animais submetidos à avaliação do quadro espermático. O hematócrito ou volume globular (VG) representa um importante exame da série vermelha, de fácil execução, reprodutibilidade e sensibilidade (SILVEIRA, 1988; STRÖBER, 1993). As enfermidades são responsáveis, em maior ou menor grau, pela transformação do quadro espermático (DERIVAUX, 1980).

Tabela 1 – Protocolo anestésico utilizado na colheita de sêmen dos tamanduás-bandeira dos zoológicos do Estado de São Paulo - 2009

ANESTESIA				
Tamanduá	Peso Kg	Ketamina Mg/Kg	Midazolam Mg/Kg	Observação
Mt So1	36,6	5,0	0,5	Manutenção com óxido nitroso
Mt Bu2	30,0	5,0	0,5	
Mt Bu3	33,1	5,0	0,5	
		3,0	0,15	1º Complemento
			0,45	2º Complemento
Mt So4	38,0	5,0	0,5	Manutenção com óxido nitroso
Mt So5	54,2	5,0	0,5	Manutenção com óxido nitroso
Mt Gl6	29,8	5,0	2,0*	* Diazepam – dose total
		3,37	0,16*	Complemento
Mt So1	40,6	7,0	0,6	
Mt So5	54,2	7,0	0,6	
Mt So4	39,4	7,0	0,6	
Mt lu7	52,0	7,0	0,6	
Mt Ri8	46,0	7,0	0,6	
Mt Ri9	45,0	7,0	0,6	
Mt It10	30,5	7,0	0,6	
Mt It11	37,0	7,0	0,6	
Mt It12	34,5	7,0	0,6	
Mt It13	40,0	7,0	0,6	

#### 5.4 COLHEITA DE SÊMEN

O método para a colheita de sêmen foi a eletroejaculação, utilizado em várias espécies silvestres e domésticas (MIES FILHO, 1974; PLATZ et al., 1978; HOWARD, 1993). O aparelho para eletroejaculação (Duboi® - Brasil) utilizado na colheita de sêmen é alimentado com bateria de 12 Volts na frequência de 60 Hz e corrente máxima de 500 mA, equipado com um miliamperímetro. O eletrodo, instalado na sonda, tem saída máxima de 11 Volts, que circula através dos tecidos

adjacentes ao reto e sobre as glândulas anexas, caracterizando uma ação local, controlada por potenciômetro. A sonda construída para este trabalho apresenta 20 cm de comprimento total, com 11 cm para cada eletrodo (positivo e negativo). O diâmetro é de 1,3 cm. Essa medida é suficiente para abranger a região das glândulas anexas do tamanduá-bandeira. A distância entre a glândula bulbouretral e a próstata é, aproximadamente, de 11 cm no animal adulto, com cinco anos de idade (BARTMANN, 1991). Para a realização desse procedimento, o animal foi colocado sobre uma mesa de exame clínico, na posição de decúbito lateral. A região genital foi tricotomizada com tesoura, para facilitar o acesso. Em seguida, foi feita a limpeza da região genital com soro fisiológico estéril. A sonda foi lubrificada com carboximetil celulose, para facilitar a introdução no reto e melhorar a condutibilidade. Os eletrodos foram posicionados voltados para a região ventral, buscando um melhor contato com as glândulas anexas, e os estímulos elétricos foram iniciados com baixa amperagem/voltagem, monitorando-se os sinais externos de contração muscular (MIES FILHO, 1987b).

O procedimento foi iniciado com uma seqüência de cinco estímulos com intensidade de 25 mA, elevando para 50, 100, 150, 200, 250 chegando a 300 mA. Procurou-se manter o mesmo número de estímulos para cada intensidade com duração de 2 a 3 segundos e períodos de descanso semelhantes (MIES FILHO, 1987b). A intensidade dos estímulos era mantida assim que fosse observada secreção de cor branca. O procedimento era interrompido quando a fração branca parava de fluir. Aos animais que chegavam ao final da seqüência sem haver ejaculado, foi dado um descanso de cinco minutos para, em seguida, retomar a eletroejaculação com 50 mA. A colheita do ejaculado foi realizada diretamente em tubo de polipropileno (Falcon<sup>®</sup>) e, em seguida, a manipulação foi efetuada com o auxílio de pipeta automática de volume variável.

## 5.5 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

### 5.5.1 Testes convencionais

A avaliação dos aspectos físicos, químicos e morfológicos dos ejaculados colhidos, seguiram basicamente os critérios usados em testes convencionais para outras espécies, com a avaliação de volume, motilidade, vigor, concentração, morfologia e pH.

O volume do ejaculado foi medido com o auxílio de pipeta automática de volume variável.

As avaliações da motilidade e vigor foram realizadas de forma subjetiva, com o auxílio de microscópio de luz (Carl Zeiss® – mod. Axiostar - Alemanha), com aumento de 100 vezes, utilizando técnica de preparação úmida, com lâmina e lamínula pré-aquecidas em platina aquecedora (Duboi® - Brasil). Na avaliação da motilidade, foi considerado como 0% amostras sem movimentação espermática e 100% todas as células com movimentação. O vigor, representando a qualidade do movimento celular, foi classificado de zero a cinco, onde zero a célula está parada e cinco, expressando sua intensidade máxima. O critério adotado para estimar o vigor foi o mesmo utilizado para a espécie bovina. Nas amostras de sêmen mais concentradas, foi utilizada solução de citrato de sódio (Merck®) 2,94% (CBRA, 1998) com finalidade de clareamento para uma melhor visualização do campo microscópico.

Uma amostra com 5 µL de sêmen foi diluída em 245 µL de formol salina tamponada, contida em microtubo tipo eppendorf®, formando, portanto, uma diluição de 1:50. A averiguação da concentração espermática no ejaculado foi realizada em câmara hematómica de *Neubauer "improved"*, em microscópio de luz, com aumento de 100 vezes, conforme realizado em outras espécies.

As amostras destinadas à análise morfológica foram fixadas em solução de formol salina tamponada com pH 7,2 (solução de Hancock), utilizada frequentemente para citologia espermática. A contagem diferencial das anormalidades espermáticas foi em microscópio com interferência diferencial de fase (Olympus modelo BX 50), do Laboratório de Andrologia, do Departamento de

Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A contagem e a classificação das alterações morfológicas foram realizadas de acordo com o critério de separação dos defeitos em maiores e menores, proposto por Howard (1993) para carnívoros silvestres.

O pH do ejaculado foi verificado com tiras indicadoras da Merck® (MIES FILHO, 1987b).

### 5.5.2 Testes funcionais

A avaliação funcional do sêmen foi efetuada pelo uso dos testes de integridade da membrana acrossomal e membrana plasmática, avaliação da atividade mitocondrial e análise de estrutura da cromatina espermática, descritos a seguir.

#### 5.5.2.1 Preparo do sêmen para coloração

Foi realizada a lavagem de uma amostra do ejaculado, com a finalidade de remoção do plasma seminal viscoso e de uma substância arranjada em grânulos e não identificada com formato próximo do arredondado. O volume retirado do ejaculado foi em torno de 40 µL de sêmen em 1000 µL de solução fisiológica estéril. A centrifugação realizada por cinco minutos a 800 g (Centrífuga de Bancada Excelsa® - Modelo 206 BL - Fanem) foi suficiente para a formação do *pellet* composto de células no fundo do tubo de centrífuga. O sobrenadante foi removido com o auxílio de pipeta automática e o sedimento ressuspenso com 40 µL de solução fisiológica.

### 5.5.2.2 Avaliação da integridade acrossomal

A integridade da membrana acrossomal foi avaliada com a técnica da Coloração Simples de Pope (POPE et al., 1991).

No preparo da lâmina para o exame do sêmen, misturou-se 5 µL do corante com um volume igual do sêmen lavado, sobre uma lâmina desengordurada, permanecendo por 70 segundos sobre a platina aquecedora a 37° C. Em seguida, foi feito um esfregaço e secado à temperatura ambiente.

Na interpretação do resultado, as células que apresentaram a região acrossomal com coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal foram consideradas estruturas íntegras. O inverso, portanto, acrossoma não-íntegro, apresentava a região acrossomal com coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossoma.

### 5.5.2.3 Avaliação da integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi realizada a coloração com Eosina-Nigrisina (E/N), conforme descrito por Barth e Oko em 1989. Na interpretação dos resultados, as células que apresentarem membranas não-íntegras, tornar-se-ão rosa, demonstrando a permissividade à passagem da eosina para o seu interior. Os espermatozóides que apresentarem membranas íntegras não serão corados e apresentar-se-ão claros, contrastando com o fundo escurecido pela nigrosina.

#### 5.5.2.4 Avaliação da atividade mitocondrial

O potencial de mitocôndria da célula espermática foi avaliado através da técnica citoquímica desenvolvida por Hrudka (1987), baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pela enzima citocromo C oxidase. O teste baseia-se em uma reação em cadeia, na qual o DAB é polimerizado e depositado nos sítios da reação. Ao microscópio de luz, a célula espermática apresenta peça intermediária com coloração marrom, indicando atividade mitocondrial, que pode ser classificada em cinco classes, a saber:

- Classe I: Alta atividade mitocondrial.

Peça intermediária totalmente corada;

- Classe II: Predomínio da atividade mitocondrial.

Peça intermediária com mais segmentos corados (ativos) e menos não-corados (inativos);

- Classe III: Mediana atividade mitocondrial.

Peça intermediária com menos segmentos corados (ativos) e mais não-corados (inativos);

- Classe IV: Pouca atividade mitocondrial.

Peça intermediária com poucos segmentos corados (ativos) e mais não-corados (inativos);

- Classe V: Sem atividade mitocondrial.

Peça intermediária totalmente descorada (inativos).

### 5.5.2.5 Análise de Estrutura da Cromatina Espermática

A avaliação da integridade do DNA espermático foi realizada pela técnica de Análise de Estrutura da Cromatina Espermática (*Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA*) descrita por Boe-Hansen (2005). Este ensaio é baseado nas propriedades metacromática do corante laranja de acridina (LA) para distinguir o DNA íntegro do fragmentado. A amostra de sêmen foi diluída em 500  $\mu\text{L}$  de PBS e lavado duas vezes por centrifugação a 200 g por 5 minutos para remoção do plasma seminal. Após essa lavagem, amostra de sêmen diluída em 900  $\mu\text{L}$  de PBS com a concentração ajustada para 550 células/ $\mu\text{L}$ . Para a avaliação da fragmentação de DNA espermático, a amostra foi diluída em 100  $\mu\text{L}$  do tampão TNE (0,01 M Tris-Cl, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA dissódico, pH 7,4) e 0,40 mL de solução detergente ácido (HCl 0,08 M, 0,15 M NaCl, 0,1% de Triton X-100, pH 1,2). Após 30 segundos adicionou-se 1,2 mL de solução contendo 6  $\mu\text{g/ml}$  de LA (0,037 M de ácido cítrico 0,126 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,1 mM EDTA dissódico, 0,15 M NaCl, pH 6.0) e avaliado por citometria de fluxo (Guava EasyCyte<sup>®</sup>, Guava Technologies, Hayward, CA, E.U.A), com excitação de 488 nm e 15 mW.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ANIMAIS

Os animais submetidos à colheita de sêmen foram identificados com o auxílio da leitora de *microchip* (Figura 1). A seguir, foram pesados, aferida a temperatura corporal, colhido o sangue para hematócrito e classificados quanto à idade (Quadro 4). O peso variou entre 29,8 a 54,2 Kg, apresentando uma média de  $40 \pm 7,93$  Kg com intervalo de confiança (IC<sub>95%</sub>) 35,77 - 44,35 Kg.

A temperatura média encontrada nos animais de cativeiro foi de  $34 \pm 0,93^{\circ}\text{C}$ , havendo uma baixa dispersão deste dado demonstrado pelo coeficiente de variação de 2,73%, um IC<sub>95%</sub> variando de 33,70 - 34,70° C.

O hematócrito médio encontrado foi de 40,14%, com IC<sub>95%</sub> variando de 37,71 - 42,57  $\pm 4,50\%$ .

O período de indução anestésica durou em torno de 7 minutos e o período de sedação, que possibilitou o procedimento, durou entre 30 e 45 minutos.



Figura 1 – Identificação do animal com leitora de microchip

Data da colheita	Amostra Colhida	Tamanduá	Idade anos	Peso Kg	Temp. °C	Hematócrito %
16/03/09	1	Mt So1	> 2	36,6	32,5	39,0
16/03/09	-	Mt Bu2	Adulto	30,0	34,7	30,0
17/03/09	2	Mt Bu3	Adulto	33,1	34,7	-
17/03/09	3	Mt So4	Adulto	38,0	34,2	-
17/03/09	-	Mt So5	Adulto	54,2	34,2	-
18/03/09	-	Mt GI6	> 2	29,8	34,0	42,0
14/07/09	4	Mt So1	> 2	40,6	32,5	38,9
14/07/09	-	Mt So5	Adulto	54,2	< 32,0	46,0
14/07/09	5	Mt So4	Adulto	39,4	< 32,0	42,3
14/07/09	-	Mt lu7	Adulto	52,0	< 32,0	41,5
15/07/09	6	Mt Ri8	Adulto	46,0	34,5	42,0
15/07/09	7	Mt Ri9	Adulto	45,0	33,2	43,0
16/07/09	8	Mt It10	Adulto	30,5	35,0	41,0
16/07/09	9	Mt It11	Adulto	37,0	34,2	-
16/07/09	10	Mt It12	Adulto	34,5	35,2	32,0
16/07/09	11	Mt It13	Adulto	40,0	35,7	44,0
Mínimo				29,8	< 32,0	30,0
Máximo				54,2	35,7	46,0
Média				40,06	34,2	40,14
Desvio padrão				± 7,93	± 0,93	± 4,50
Coeficiente de variação				19,79	2,73	11,22
Intervalo de confiança (95%)				35,77 - 44,35	33,70 - 34,70	37,71 - 42,57

Quadro 4 - Peso, valores de hematócrito e temperatura retal dos tamanduás-bandeira dos zoológicos do Estado de São Paulo - 2009

## 6.2 COLHEITA DO SÊMEN

### 6.2.1 Eletroejaculação

As ejaculações foram obtidas com estímulos elétricos entre 200 e 300 mA (Figuras 2 e 3) e apresentaram duas frações. A duração da colheita do sêmen variou em torno de 15 minutos.

A primeira fração do ejaculado mostrou uma secreção translúcida, com aspecto viscoso, provavelmente com origem nas glândulas anexas e sem a presença de células espermáticas. A segunda, uma secreção cremosa, de cor variando entre o branco e o marrom claro, rica em células espermáticas, constitui o ejaculado (Figuras 3 e 4). Todos os ejaculados, incluindo duas colheitas onde se obteve somente a primeira fração, continham uma substância não identificada, em grande quantidade, com aspecto granuloso e formato semicircular (Figura 5). Após centrifugação com soro fisiológico ocorreu a separação desta substância permanecendo na parte superior do tubo (Figura 6).

Do total de treze animais, somente nove ejacularam, havendo a repetição da colheita de dois, no zoológico de Sorocaba, identificados como Mt So1 e Mt So4, obtendo-se, portanto, onze amostras de sêmen no total (Quadro 5). Admitindo que todos os animais submetidos à colheita de sêmen sejam livres de afecções reprodutivas que impeçam a ejaculação, podemos aceitar que o método de colheita de sêmen foi eficiente para 69% dos indivíduos expostos ao procedimento.

O tamanduá-bandeira de Guarulhos, Mt Gl6, produziu somente líquido seminal, podendo ser este, um caso de imaturidade sexual, por se tratar de um indivíduo com pouco mais de dois anos e com peso de 29,8 Kg, o menor encontrado nos animais examinados em cativeiro, considerando que para esta espécie, a maturidade sexual ocorre entre 2,5 a quatro anos (NOWAK, 1999).

Os animais identificados como Mt Gl6, Mt Bu2, Mt Lu7 e Mt So5, não ejacularam (Quadro 5) e foram os que apresentaram as maiores variações de peso e nos exames de hematócrito. Seus pesos foram 29,8 - 30,0- 52,0 e 54,2 Kg respectivamente. Esses valores de pesos são os limites mínimo e máximo encontrados neste trabalho. O peso médio dos tamanduás-bandeira nos zoológicos do Estado de São Paulo foi de 40 Kg ( $IC_{95\%} = 35,77 - 44,35$ ), em concordância com o peso máximo de 45 Kg na fase adulta, em animal de vida livre, citado por Silveira (1969). Os animais pesando 29,8 - 30,0 ficaram abaixo da média encontrada em até 10,2 Kg (Quadro 4). A condição corporal pode ser justificada pela alimentação e manejo em cativeiro.

Os animais identificados como Mt Bu2 e Mt So5, também apresentaram hematócrito de 30,0 e 46,0% respectivamente, enquanto a média foi de 40,14 ( $IC_{95\%} = 37,71 - 42,57$  - Quadro 4). Os resultados sugerem que estes indivíduos não estejam em perfeita higidez. Um levantamento retrospectivo de 1964 a 2003, realizado por

Miranda (2004a), no zoológico da cidade de São Paulo, mostrou que 23% de 74 tamanduás-bandeira morreram por caquexia e 77% por doenças. Esta situação vem se transformando favoravelmente, tendo em vista a melhoria do manejo nutricional, que favoreceu a condição de saúde e reprodução da espécie. No quadro 3 foram apontados os machos em cativeiros do Estado de São Paulo, que produziram prole, demonstrando boa adaptação ao cativeiro, o que não ocorria outrora.

Data da colheita	Tamanduá	Nome	Origem	Microchip	Amostra
16/03/09	Mt So1	-	Sorocaba	963002000003608	1
16/03/09	Mt Bu2	-	Bauru	238322	Sem produção
17/03/09	Mt Bu3	Aderbal	Bauru	95900000016083	2
17/03/09	Mt So4	Pascoal Neto	Sorocaba	000131E38F	3
17/03/09	Mt So5	Grandão	Sorocaba	0001 DA53 B1	Líquido seminal
18/03/09	Mt GI6	Tomé	Guarúlhos	00-0629-7 <sup>a</sup> 52	Líquido seminal
14/07/09	Mt So1	-	Sorocaba	963002000003608	4
14/07/09	Mt So5	Grandão	Sorocaba	0001DA53B1	Líquido seminal
14/07/09	Mt So4	Pascoal Neto	Sorocaba	000131E38F	5
14/07/09	Mt lu7	-	Itu	Criadouro Alphavillage	Sem produção
15/07/09	Mt Ri8	Duduzão	Ribeirão Preto	963002000002650	6
15/07/09	Mt Ri9	Tata	Ribeirão Preto	963002000002162	7
16/07/09	Mt It10	Tobias	Itatiba	9630030000023231	8
16/07/09	Mt It11	Tiaguinho	Itatiba	9630030000024174	9
16/07/09	Mt It12	Teodoro	Itatiba	9630000000062549	10
16/07/09	Mt It13	Teobaldo	Itatiba	9630000000062421	11

Quadro 5 - Relação dos animais submetidos à colheita de sêmen com a respectiva produção - zoológicos do Estado de São Paulo - 2009



Figura 2 – Colheita do sêmen de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*)



Figura 3 – Colheita do sêmen de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*)



Figura 4 – Sêmen de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*)



Figura 5 – Aspecto geral do sêmen de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). Aumento de 100x



Figura 6 – Sêmen de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) centrifugado com soro fisiológico para lavagem

### 6.3 TESTES CONVENCIONAIS

#### 6.3.1 Avaliação física e química do sêmen

Alguns dados da avaliação física dos ejaculados de tamanduá-bandeira apresentaram dispersão, demonstrado pelo coeficiente de variação (Tabela 2). A maior dispersão encontrada foi da concentração, que apresentou média de  $129,41 \pm 114,27 \times 10^6/\text{mm}^3$  com  $\text{IC}_{95\%}$  de 67,54 – 191,30 acompanhada do volume e motilidade, que apresentaram médias de  $1,3 \pm 0,86$  mL e  $33,18 \pm 20,14\%$  e  $\text{IC}_{95\%}$  de 0,81 – 1,74 mL e  $\text{IC}_{95\%}$  22,27 - 44,09%, respectivamente. Esta dispersão dos dados provavelmente está relacionada à variabilidade da condição reprodutiva entre os animais, justificada pelas condições anteriormente discutidas e, possivelmente, pelo método de colheita, que exige a anestesia do animal, ou pelo baixo número amostral. A menor variação de dados foi do vigor que apresentou média de  $2,27 \pm 0,65$  com um  $\text{IC}_{95\%}$  de 1,92 - 2,62%.

O pH médio foi de  $7,44 \pm 0,6$  com  $\text{IC}_{95\%}$  de 7,12 - 7,76% e um coeficiente de variação comparativamente baixo com 8,04% (Tabela 2).

As amostras 3, 5 (Sorocaba), 6 (Ribeirão Preto) e 9 (Itatiba), apresentaram os piores desempenhos em motilidade com 15, 10, 15 e 10, respectivamente. A avaliação de vigor não passou da nota 2 para as amostras 1, 3 e 4 (Sorocaba), e as 6 e 9 de Ribeirão Preto e Itatiba, respectivamente. As demais amostras atingiram a nota 3, chegando à nota 4 somente a amostra 11 de Itatiba. O vigor médio foi de 2,27 (IC<sub>95%</sub> 1,92 - 2,62), variando de 1 a 4. Este parâmetro apresentou um coeficiente de variação com 28,71%. O vigor espermático do tamanduá-bandeira pode ser julgado como baixo, se comparado a outras espécies. Isto poderia ser justificado pela alta viscosidade que tem o sêmen, impedindo o deslocamento com velocidade da célula espermática através do fluido seminal.

A concentração espermática média encontrada foi de  $129,41 \times 10^6/\text{mm}^3$  (IC<sub>95%</sub> 67,54 – 191,30), com resultados mínimo e máximo variando entre 0,50 e  $302,50 \times 10^6/\text{mm}^3$ , apresentando uma dispersão grande, com um coeficiente de variação de 88,30%. Alguns fatores, intrínsecos ao animal, podem estar relacionados à variação da concentração, entre os quais, a idade e condição nutricional (MIES FILHO, 1987a). Entre os fatores extrínsecos, podemos citar a ejaculação incompleta e a mistura das duas frações seminais.

Tabela 2 – Avaliação física e química do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo - 2009

Data da colheita	Amostra	Volume mL	Motilidade %	Vigor (0-5)	Concentração x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	Ph
16/03/09	1	1,656	40	1-2	259,312	-
17/03/09	2	1,20	25	2-3	68,062	7,0
17/03/09	3	0,446	15	1-2	281,250	-
14/07/09	4	0,07	20	2	0,50	7,0
14/07/09	5	1,011	10	1-2	25,625	7,5
15/07/09	6	2,30	15	2	2,250	8,0
15/07/09	7	2,45	60	2-3	117,812	8,0
16/07/09	8	1,09	60	3	135,00	6,5
16/07/09	9	2,60	10	2	1,875	7,0
16/07/09	10	0,04	50	3	302,50	8,5
16/07/09	11	1,20	60	3-4	229,375	7,5
Mínimo		0,04	10	1-2	0,50	7,0
Máximo		2,60	60	3-4	302,50	8,5
Média		1,30	33,18	2,27	129,414	7,44
Desvio padrão		± 0,86	± 20,14	± 0,65	± 114,270	± 0,60
Coeficiente de variação		67,17	60,71	28,71	88,30	8,04
Intervalo de confiança (95%)		0,81 - 1,74	22,27 - 44,09	1,92 - 2,62	67,535 - 191,294	7,12 - 7,76

### 6.3.2 Avaliação morfológica

A tabela 3 é uma síntese da morfologia espermática apresentada na tabela 4, onde constam os percentuais das anormalidades encontradas nas onze amostras colhidas.

O total de anormalidades espermáticas encontrado no Tamanduá-bandeira em cativeiro foi de  $64,53 \pm 19,97\%$  na média, com um IC<sub>95%</sub> de 53,73 - 75,33%. Os defeitos maiores apresentaram maior incidência que os menores, com  $53,77 \pm 18,4\%$  e  $10,75 \pm 6,23\%$ , respectivamente (Tabela 3).

A diversidade de anormalidades morfológicas encontradas e classificadas como defeitos maiores, foi em número de vinte e as classificadas como defeitos menores, foram em número de nove. Os três defeitos maiores mais encontrado nas amostras examinadas foram a cauda fortemente dobrada, defeito peça intermediária e cauda dobrada com gota em 10, 10 e 9 amostras, respectivamente. A anormalidade que mais incidiu em um mesmo animal foi a cauda dobrada com gota com 29,5% (Tabela 5).

Os defeitos maiores, de percentual mais elevado, que ocorreram entre as onze amostras examinadas, foram os de cauda fortemente enrolada (50,4%), cauda fortemente dobrada (51,3%), defeito de peça intermediária (58,4%) e cauda dobrada com gota (86,6%), com o percentual médio por amostra de 7,2%, 5,1%, 5,8% e 9,6% respectivamente. Estas anormalidades espermáticas podem ser um indicativo de disfunção no trânsito epididimário e na espermatogênese (MIES FILHO, 1987b; BARTH, 1989). Entretanto, a comparação com os animais de vida livre é importante para se verificar se estas características morfológicas estão presentes naquela categoria.

A maior contagem de células anormais foi a de um animal do Zoológico de Sorocaba, identificado como Mt So1, com 97,5% e 95,3% nas amostras 1 e 4, colhidas nos dias 16/03/09 e 14/07/09 (Tabela 4). Estas amostras apresentaram motilidade e vigor na primeira e segunda colheita de 40% 1-2 e 20% 2, respectivamente. A concentração de células espermáticas no ejaculado foi de  $259.312,5 \times 10^3/\text{mm}^3$  na primeira e  $500 \times 10^3/\text{mm}^3$  na segunda colheita. No histórico apresentado pelo zoológico, o indivíduo Mt So1, ainda sem nome, chegou debilitado e estava se recuperando, o que pode ser confirmado pelas pesagens que foram de 36,6 Kg no dia 16/03/09 e 40,6 Kg no dia 14/07/09, mostrando um ganho de peso de 10,9% em quase quatro meses (Quadro 4).

Tabela 3 - Avaliação morfológica resumida do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo - 2009

M O R F O L O G I A				
Tamanduá	Amostra	Defeito Maior %	Defeito Menor %	Total %
Mt So1	1	91	6,5	97,5
Mt Bu3	2	78	12	90
Mt So4	3	44	4	48
Mt So1	4	72,5	22,8	95,3
Mt So4	5	52	6	58
Mt Ri8	6	44	4	48
Mt Ri9	7	59	10	69
Mt It10	8	29	8	37
Mt It11	9	40	8	48
Mt It12	10	36	21	57
Mt It13	11	46	16	62
Média		53,77	10,75	64,53
Desvio padrão		± 18,4	± 6,23	± 19,97
Coeficiente de variação		33,22	57,92	30,94
Intervalo de confiança		43,82 - 63,72	7,38 - 14,12	53,73 - 75,33

## 6.3.2.1 Avaliação morfológica detalhada

Tabela 4 - Avaliação morfológica detalhada do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>DEF. MAIORES</b>											
Acrossoma	3	3	7		3	8	3	1		2	2
Contorno anormal	4,5	1	2	2,8	3	2	1	5	2		
Defeito peça intermediária	10	11	10	1,4	10	4	1		8	1	2
Cauda fortemente enrolada	7	22	2	11,4	4	2				2	
Cauda fortemente dobrada	13	3	8	4,3	5	4	2		8	1	3
Piriforme	1,5			8,5	2	12	2	2		1	4
Estreito na base	4		1	1,4			3	2	4	13	3
Largo na base		1				2	9	5			
Pouch formation	2,5	1	1							1	
Cauda enrolada na cabeça	6	3		7,1	5	2	10	1		1	
Cauda dobrada com gota	29,5	3	8	17,1	8		5	3		1	12
Cabeça isolada anormal	2	11		17,1	2	2	2	10			2
Cabeça pequena anormal	1,5	3	1		4	4	5		2		3
Cabeça grande anormal	1	7	1							1	
Gota citoplasmática proximal	2	3	3	1,4	3		9		10		4
Subdesenvolvido						2	4		4	4	
Teratológico	2,5				3					3	5
Acrossoma destacado							2			1	
Crista nuclear											
Knobbed sperm											
Subdesenvolvido	1	5								4	6
<b>Fraturada de cauda</b>											
Ausência de cauda		1					1		2		
Total de Defeitos Maiores %	91	78	44	72,5	52	44	59	29	40	36	46
<b>DEFEITOS MENORES</b>											
Cauda dobrada		1				4	1		6	6	1
Cabeça isolada normal	4,5	11		20	3		1	4	2		1
Cabeça grande normal	0,5		1				1				
Cabeça delgada normal								1			
Cabeça pequena normal											
Abaxial	0,5				1		1	1		9	
Retroaxial			1	1,4						2	
Paraxial	1			1,4							
Cauda enrolada terminal			1				1				
Gota citoplasmática distal			1		2		5	2		4	14
Total de Defeitos Menores %	6,5	12	4	22,8	6	4	10	8	8	21	16
Total de Defeitos %	97,5	90	48	95,3	58	48	69	37	48	57	62

Tabela 5 – Ocorrência nas amostras e média das anormalidades espermáticas de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo - 2009

DEFEITOS MAIORES	TOTAL %	Número de amostras onde ocorreu	Média	Limite superior	Limite inferior
Acrossoma	32,0	9	3,56	8	1
Contorno anormal	23,3	9	2,59	4,5	1
Defeito peça intermediária	58,4	10	5,84	11	1
Cauda fortemente enrolada	50,4	7	7,20	22	2
Cauda fortemente dobrada	51,3	10	5,13	13	1
Piriforme	33,0	8	4,13	12	1
Estreito na base	31,4	8	3,93	13	1
Largo na base	17,0	4	4,25	9	1
Pouch formation	5,5	4	1,38	2,5	1
Cauda enrolada na cabeça	35,1	8	4,39	10	1
Cauda dobrada com gota	86,6	9	9,62	29,5	1
Cabeça isolada anormal	48,1	8	6,01	17,1	2
Cabeça pequena anormal	23,5	8	2,94	5	1
Cabeça grande anormal	10,0	4	2,50	7	1
Gota citoplasmática proximal	35,4	8	4,43	10	1,4
Subdesenvolvido	14,0	4	3,50	4	2
Teratológico	13,5	4	3,38	5	2,5
Acrossoma destacado	3,0	2	1,50	2	1
Crista nuclear	0	-	-	-	-
Knobbed sperm	0	-	-	-	-
Subdesenvolvido	16,0	4	4,00	6	1
Fraturada de cauda	0	-	-	-	-
Ausência de cauda	4	3	1,33	2	1
Total de Defeitos Maiores %	591,5		53,77	91	29
<b>DEFEITOS MENORES</b>					
Cauda dobrada	19	6	3,17	6	1
Cabeça isolada normal	46,5	8	5,81	20	1
Cabeça grande normal	2,5	3	0,83	1	0,5
Cabeça delgada normal	1	1	1,00	1	1
Cabeça pequena normal	0	-	-	-	-
Abaxial	12,5	5	2,50	9	0,5
Retroaxial	4,4	3	1,47	2	1
Paraxial	2,4	2	1,20	1,4	1
Cauda enrolada terminal	2	2	1,00	1	1
Gota citoplasmática distal	28	6	4,67	14	1
Total de Defeitos Menores %	118,3		10,75		
Total de Defeitos %	709,8		64,53		

## 6.4 TESTES FUNCIONAIS

### 6.4.1 Avaliação da integridade do acrossoma

A avaliação da integridade de acrossoma apresentou média para acrossoma intacto (Figura 7) de  $83,7 \pm 9,3\%$  (IC<sub>95%</sub> 78,67 - 88,73) e para acrossoma danificado (Figura 8) de  $16,3 \pm 9,3\%$  (IC<sub>95%</sub> 11,27 - 21,33). Avaliando isoladamente os resultados veremos que apenas a amostra 9 do animal Mt It11 apresentou uma condição inferior, com 43% de acrossoma danificado, longe da segunda pior amostra com 19% (Tabela 6). A amostra 9 também apresentou a motilidade de 10% com vigor 2, sugestivo de baixa qualidade de sêmen para este indivíduo. Não foi encontrada justificativa para este achado.

Tabela 6 - Avaliação da integridade do acrossoma com coloração simples de Pope (POPE et al., 1991) do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo - 2009

Data da colheita	Amostra	Tamanduá	Acrossoma Intacto	Acrossoma danificado
16/03/09	1	Mt So1	85,5	14,5
17/03/09	2	Mt Bu3	85	15
17/03/09	3	Mt So4	83,5	16,5
14/07/09	4	Mt So1	83	17
14/07/09	5	Mt So4	82	18
15/07/09	6	Mt Ri8	81	19
15/07/09	7	Mt Ri9	85	15
16/07/09	8	Mt It10	97	3
16/07/09	9	Mt It11	57	43
16/07/09	10	Mt It12	95	5
16/07/09	11	Mt It13	87	13
Mínimo			57	3
Máximo			97	43
Média			83,7	16,3
Desvio padrão			± 9,3	± 9,3
Coeficiente de variação			11,1	57,4
Intervalo de confiança (95%)			78,67 - 88,73	11,27 - 21,33



Figura 7 - Espermatozóide com acrossoma íntegro. Coloração simples de Pope. Aumento 3000x



Figura 8 - Espermatozóide com acrossoma não-íntegro. Coloração simples de Pope. Aumento 3000x

#### 6.4.2 Avaliação de membrana plasmática

A avaliação de membrana plasmática intacta obteve média de  $81,1 \pm 12,2\%$  ( $IC_{95\%}$  74,50 - 87,70) e para a danificada foi de  $18,9 \pm 12,2\%$  ( $IC_{95\%}$  12,30 - 25,50), (Figura 9 e 10). Os piores resultados foram das amostras 1,2 e 3 com 34%, 34,5% e 41,5%, respectivamente, para membrana plasmática danificada. As amostras 1 e 3 são originárias de Sorocaba e a 2, de Bauru. O animal da amostras 1 foi repetido na amostra 4 e apresentou 27% de danos na membrana plasmática, semelhante ao primeiro exame e consideravelmente acima da média de 18,9% (Tabela 7).

Tabela 7 – Avaliação da integridade da membrana plasmática com eosina-nigrosina (Barth e Oko, 1989) do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo – 2009

Data da colheita	Amostra	Tamanduá	Membrana intacta	Membrana danificada
16/03/09	1	Mt So1	66	34
17/03/09	2	Mt Bu3	65,5	34,5
17/03/09	3	Mt So4	58,5	41,5
14/07/09	4	Mt So1	73	27
14/07/09	5	Mt So4	82	18
15/07/09	6	Mt Ri8	82	18
15/07/09	7	Mt Ri9	90	10
16/07/09	8	Mt It10	97	3
16/07/09	9	Mt It11	93	7
16/07/09	10	Mt It12	93	7
16/07/09	11	Mt It13	92	8
Mínimo			58.5	3
Máximo			97	41,5
Média			81,1	18,9
Desvio padrão			$\pm 12,2$	$\pm 12,2$
Coeficiente de variação			15,0	64,5
Intervalo de confiança (95%)			74,50 - 87,70	12,30 - 25,50

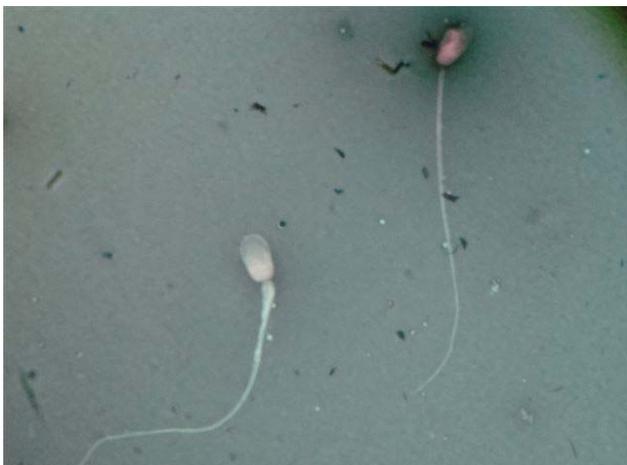


Figura 9 - Espermatozóide da direita com membrana plasmática não-íntegra e da esquerda íntegra. Coloração de E/N. Aumento 3000x



Figura 10 - Espermatozóides com membrana plasmática íntegra e não-íntegra. Coloração de E/N. Aumento 1000x

#### 6.4.3 Avaliação da atividade mitocondrial

Na avaliação da atividade mitocondrial, a soma das classes I com  $66,4 \pm 19,0\%$  ( $IC_{95\%}$  56,12 - 76,68) e II com  $18,7 \pm 9,1\%$  ( $IC_{95\%}$  13,78 - 23,62), consideradas as melhores classificações, resulta em 85,1% de atividade nas amostras avaliadas, sugerindo que as células espermáticas desta espécie apresentam um bom potencial de mitocôndria (Figuras 11, 12, 13, 14 e 15). O pior resultado foi o da amostra 9, Mt It11, apresentando somente 58% na somatória das duas melhores classes. O segundo pior resultado apresentou 73% de atividade mitocondrial. Os melhores resultados para esta característica funcional variou de 86% a 99% (Tabela 8).

Tabela 8 – Avaliação da atividade mitocondrial através da técnica citoquímica de oxidação da DAB - 3,3'-diaminobenzidina (Hrudka,1987) do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo - 2009

Data da colheita	Amostra	Tamanduá	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V
16/03/09	1	Mt So1	80.5	15.5	3	0	1
17/03/09	2	Mt Bu3	54	32	7	2	5
17/03/09	3	Mt So4	71	17	6	4	2
14/07/09	4	Mt So1	62	24	7	3	4
14/07/09	5	Mt So4	53	26	9	6	6
15/07/09	6	Mt Ri8	72	14	5	7	2
15/07/09	7	Mt Ri9	97	1	2	0	0
16/07/09	8	Mt It10	93	6	0	1	0
16/07/09	9	Mt It11	30	28	22	10	10
16/07/09	10	Mt It12	71	16	9	3	1
16/07/09	11	Mt It13	47	26	18	7	2
Mínimo			30	1	0	0	0
Máximo			97	32	22	10	10
Média			66,4	18,7	8,0	3,9	3,0
Desvio padrão			± 19,0	± 9,1	± 6,3	± 3,1	± 2,9
Coeficiente de variação			28,6	48,8	78,9	79	96,4
Intervalo de confiança (95%)			56,12 - 76,68	13,78 - 23,62	4,59 - 11,41	2,22 - 5,58	1,43 - 4,57



Figura 11 – Classe I: espermatozóide com alta atividade mitocondrial.  
Aumento 3000x



Figura 12 – Classe II: espermatozóide com predomínio da atividade mitocondrial.  
Aumento 3000x



Figura 13 – Classe III: espermatozóide com mediana atividade mitocondrial.  
Aumento 3000x.



Figura 14 – Classe IV: espermatozóide pouca atividade mitocondrial.  
Aumento 3000x.

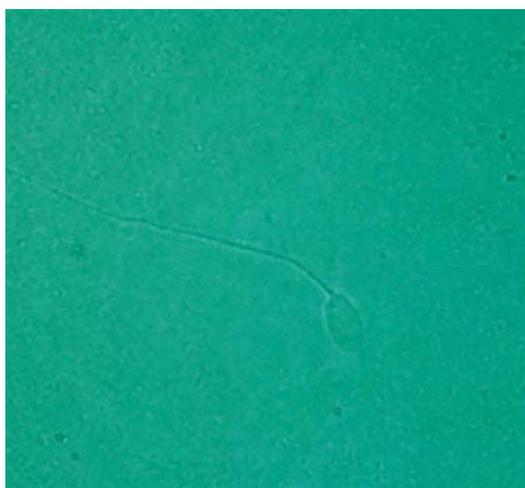


Figura 15 – Classe V: espermatozóide sem atividade mitocondrial.  
Aumento 3000x.

#### 6.4.4 Análise de Estrutura da Cromatina Espermática

A análise de estrutura de cromatina espermática foi realizada em sete amostras. As amostras 1, 2 e 10 apresentaram os maiores índices de fragmentação espermática com 18,28%, 29,78% e 20,88%, respectivamente.

Não foi possível examinar a estrutura de cromatina espermática das amostras 3,4,5 e 11 por questões técnicas, relativas aos citômetro de fluxo ou de concentração espermática na amostra. As análises das amostras 1, 2 e 10, apresentaram os maiores índices de fragmentação com 18,28%, 29,78% e 20,88%, respectivamente, se comparadas com as demais amostras com variação entre 4,40% e 7,96%. As amostras são originárias de Sorocaba, Bauru e Itatiba, respectivamente. Estes resultados apresentaram uma média de  $13,21 \pm 9,13\%$  ( $IC_{95\%}$  8,27 - 18,15), com dispersão calculada pelo coeficiente de variação de 69,13% (Tabela 9).

Tabela 9 – Percentual de fragmentação de cromatina através da Análise de Estrutura da Cromatina Espermática - SCSA (BOE-HANSENA, 2005) do sêmen colhido dos tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) dos zoológicos do Estado de São Paulo - 2009

Data da colheita	Amostra	Tamanduá	Fragmentação %
16/03/09	1	Mt So1	18,28
17/03/09	2	Mt Bu3	29,78
17/03/09	3	Mt So4	-
14/07/09	4	Mt So1	-
14/07/09	5	Mt So4	-
15/07/09	6	Mt Ri8	7,96
15/07/09	7	Mt Ri9	4,48
16/07/09	8	Mt It10	6,66
16/07/09	9	Mt It11	4,40
16/07/09	10	Mt It12	20,88
16/07/09	11	Mt It13	-
Mínimo			4,4
Máximo			29,78
Média			13,21
Desvio padrão			$\pm 9,13$
Coeficiente de variação			69,13
Intervalo de confiança (95%)			8,27 - 18,15

#### 6.4.5 Considerações sobre os resultados

Os melhores resultados de motilidade e vigor foram atribuídos às amostras 7 (Ribeirão Preto), 8 e 11 (Itatiba). É possível que estas características estejam ligadas aos aspectos peculiares do manejo, como grandes recintos e riqueza de vegetação, o que pode sugerir o controle do estresse de cativeiro.

O tamanduá-bandeira, doador da amostra 6 reproduziu por duas vezes no ano de 2006 e não apresentou alterações funcionais nos exames. O animal da amostra 2 também reproduziu em 2002, mas atualmente apresenta duas alterações de ordem funcional. O animal de Sorocaba, conhecido como Grandão e identificado como Mt So5, foi submetido ao procedimento, mas sem sucesso na colheita de sêmen; convive com fêmea e já produziu um filhote.

A colheita e avaliação do sêmen do tamanduá-bandeira de cativeiro foi importante para o início da construção do perfil espermático desta espécie. Os resultados mostraram uma variabilidade entre os animais que poderiam ser justificadas pela idade do indivíduo, estresse de cativeiro, manejo nutricional e sanitário. Outro importante fator a ser considerado é o tamanho reduzido da amostra e o fato de ter sido realizada somente uma análise na maioria dos animais.

## 7 CONCLUSÃO

Foi demonstrada a aplicabilidade e a eficiência da eletroejaculação na colheita de sêmen de tamanduás-bandeira.

Os testes utilizados possibilitaram uma análise mais detalhada das características seminais da espécie, aspectos estes ainda inéditos na literatura mundial.

Houve grande variação individual nos resultados obtidos, refletindo as diferenças das condições de manejo, de idade e, possivelmente, de um baixo número amostral estudado.

Serão necessários outros levantamentos, para aumentar o número amostral e, futuramente, comparar os resultados encontrados em cativeiro com obtidos em indivíduos de vida livre.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SHEKARRIZ, M.; SIDHU, R. K.; THOMAS, A. J. JR.; Value of Clinical Diagnosis in Predicting the Quality of Cryopreserved Sperm from Cancer Patients. **The Journal of Urology**, v. 155, n. 3, 1996, p. 938.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; BRINDLE, J.; GOMEZ, E.; BAKER, H.W. G.; IRVINE, D. S. Andrology: Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. **Human Reproduction**, v. 10, n. 8, p. 2061-2071, 1995.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3-13, 2010.

AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **Journal of Andrology**, v. 29, p. 69-75, 2006.

ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.

ALVES, C.; PAIVA, C. S.; MOURAO, G. M. Responses of a Specialized Insectivorous Mammal *Myrmecophaga tridactyla* to Variation in Ambient Temperature. **Biotropica**, v. 38, n. 1, p. 52-56, 2006.

AMANN, R. P. Can the Fertility Potential of a Seminal Sample Be Predicted Accurately? **Journal of Andrology**, v. 10, n. 2, p. 89-98, 1989.

ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; MARTINS, S. M. M. K.; MORETI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 190-194, 2007.

BAGATINI, T. **Evolução dos índices de atropelamento de vertebrados silvestres nas rodovias do entorno da estação ecológica águas emendadas, DF, Brasil, e eficácia de medidas mitigadoras**. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

BARROSO, G.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, p.1338–1344, 2000.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. p. 285.

BARTMANN, W. Haltung und Zucht von Großen Ameisenbären, *Myrmecophaga Tridactyla* Linné, 1758, im Dortmunder Tierpark. **Zoologischer Garten** v. 53, n. 1, p. 1-31, 1983.

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

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. **J. Biol Chem**, v. 272, p.19633–19636, 1997.

BEDFORD, J. M. Significance of the Need for Sperm Capacitation Before Fertilization in Eutherian Mammals. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 108-120, 1983.

BISHOP, M. W. H.; AUSTIN, C. R. Mammalian spermatozoa. **Endeavour**, v. 16, p.137, 1957. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/83151>> Acesso em: 13 abr. 2010.

BIZE, I.; SANTANDER, G.; CABELLO, P.; DRISCOLL, D.; SHARPE, C. Hydrogen Peroxide Is Involved in Hamster Sperm Capacitation In Vitro<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 398-403, 1991.

BOE-HANSENA, G. B.; MORRISB, I. D. ; ERSBØLLA, A. K.; GREVEA, T.; CHRISTENSENA, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, p. 1789–1802, 2005.

BRITO, L. F. C.; BARTHA, A. D.; BILODEAU-GOESELSB, S.; PANICHB, P. L.; KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1539-1551, 2003.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002.

CASELLA, J.; CÁCERES, N. C.; GOULART, C. S.; PARANHOS FILHO, A. C. Uso de sensoriamento remoto e análise espacial na interpretação de atropelamentos de fauna entre Campo Grande e Aquidauana, In: **SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL**, 1., 2006, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Informática Agropecuária/INPE, 2006. p. 321-326.

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

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, .v . 104, n. 2, p. 119-131, 2008.

CHANG, M. C. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. **Nature**, v. 168, p. 697-698, 1951.

CHEREM, J. J.; KAMMERS M.; GHIZONI-JR I. R.; MARTINS A. Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. **Biotemas**, v. 20, n. 2, p. 81-96, 2007.

CITES - CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA. **Environment Protection and Biodiversity Conservation Act 1999**. 1999. Disponível em:

<<http://www.environment.gov.au/biodiversity/trade-use/lists/cites/index.html>>. Acesso em: 28 abr. 2008.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 305-311, 2003.

COLLEVATTI, R. G.; LEITE, K. C. E.; MIRANDA, G. H. B. de; RODRIGUES, F. H. G. Evidence of high inbreeding in a population of the endangered giant anteater, *Myrmecophaga tridactyla* Myrmecophagidae, from Emas National Park, Brazil. **Genet. Mol. Biol.** , v. 30, n. 1, 2007. DOI: 10.1590/S1415-47572007000100020. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572007000100020&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572007000100020&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 14 fev. 2008.

COSTA, L. P.; LEITE, Y. L. R.; MENDES, S. L.; DITCHFIELD, A. D. Conservação de mamíferos no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 103-112, 2005.

CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for Evaluating the Acrosomal Status of Mammalian Sperm, **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.

DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of apoptosis and Accidental Cell Death Necrosis. **Cytometry**, v. 27, p. 1-20, 1997.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. 1. ed. Zaragoza: Acribia, 1980. 119 p.

DICKMAN, C. R. Anteaters. In: MACDONALD, D. (Ed.). **The new encyclopedia of mammals**. Oxford: Oxford University Press, 2001, p. 786-787.

DNIT Brasília. **Relatório de Gestão de 2008 do Departamento Nacional de Infra-Estrutura dos Transportes – DNIT**, Brasília, 2008, 642 p. Disponível em: <<http://www.dnit.gov.br/sitemap>> Acesso em: 14 mar. 2010.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics: the central neotropics**. Chicago: The University of Chicago Press, 1999. v. 3, p. 610.

EVENSON, D. P.; LARSON, K. L.; JOST, L. K. Sperm Chromatin Structure Andrology Lab Corner Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, 2002.

FEARNSIDE, P. F. Containing destruction from Brazil's Amazon highways: now is the time to give weight to the environment in decision-making. **Environmental Conservation**, v. 33, n. 3, p. 181-183, 2006.

FONSECA, G. A. B.; HERMANN, G.; LEITE, Y. L. R.; MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; PATTOA, J. C. **Lista anotada dos mamíferos do Brasil**. Chicago: Occasional Papers in Conservation Biology. 1996. v. 4, p. 1-31.

FONSECA, G. A. B.; MITTERMEIER, R. A.; CAVALCANTI, R. B.; MITTERMEIER, C. G. Brazilian Cerrado. In: MITTERMEIER, R. A.; MYERS N.; ROBLES GIL, P.; MITTERMEIER, C. G. (Ed.). Hotspots. **Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. México: Cemex/Conservation International, 1999. p. 148-155.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v. 75, n. 1, p. 119-139, 2003.

GARCIA, J. E.; VILAS BOAS, L. A.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Contel EPB. Identification of microsatellite DNA markers for the giant anteater *Myrmecophaga tridactyla*. **Journal of Heredity** v. 96, p. 600-602. 2005. DOI: 10.1093/jhered/esi089. Disponível em: <<http://jhered.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/96/5/600>> Acesso em: 14 fev. 2008.

GOMEZ, E.; BUCKINGHAM, D. W.; BRINDLE, J.; LANZAFAME, F.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J.; Development of an Image Analysis System to Monitor the Retention of Residual Cytoplasm by Human Spermatozoa: Correlation With Biochemical Markers of the Cytoplasmic Space, Oxidative Stress, and Sperm Function. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 276-287, 1996.

GUIMARÃES, M. A. B. V. Aplicação de técnicas de reprodução assistida em animais silvestres mantidos em cativeiro. **Rev. Bras. Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 116-117, 2001.

GUIMARÃES, M. A. B. V. Reprodução de animais silvestres. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 161-168.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 582.

HANCOCK, J. L. The spermatozoa of sterile bulls. **Journal of Experimental Biology**, v. 30, p. 50-56, 1953.

HENGEMÜHLE A.; CADEMARTORI C. V. Levantamento de mortes de vertebrados silvestres devido a Atropelamento em um trecho da estrada do mar RS-389. **BIODIVERSIDADE PAMPEANA PUCRS**, v. 6 n. 2, p. 4-10, 2008.

HOST, E.; LINDENBERG, S.; SMIDT-JENSEN, S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 79, p. 189–193, 2000a.

HOST, E.; LINDENBERG, S.; SMIDT-JENSEN, S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 79, p. 559–563, 2000b.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. **Zoo e wild animal medicine current therapy**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p. 390-399.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of citocrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Ministério do Meio Ambiente. **Nova lista da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 2003. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>>. Acesso em: 18 fev. 2008.

IUCN – INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **IUCN Red List of Threatened**. 2007a. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/search/details.php/14224/all>> Acesso em: 28 abr. 2008a.

IUCN – INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **Red List of Threatened Species**. 2007b. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/info/programme>> Acesso em: 28 abr. 2008b.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. **Oxidative stress & male infertility**. *Indian Journal of Medical Research*, v. 129, n. 4, p. 357-67, 2009.

MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: A review. *Theriogenology*, v. 48, n. 4, p. 523-530, 1997.

MAZZOLLI, M. Efeito de gradientes de floresta nativa em sistemas agropecuários sobre a diversidade de mamíferos vulneráveis. **Relatório técnico WWF-BRASIL. Projeto CSR 283-2002**. Brasília, DF. 2005. Disponível em: <[http://uniplac.net/~puma/Artigo\\_wwf.pdf](http://uniplac.net/~puma/Artigo_wwf.pdf)>. Acesso em: 12 maio 2008.

McPHERSON, S. M. G.; LONGO, F. J. Fragmentaçãoing of Rat Spermatid and Spermatozoa DNA: Possible Involvement of DNA Topoisomerase II. *Developmental Biology*, v. 158, n. 1, p. 122-130, 1993.

MEDRI, I. M.; MOURÃO, G. M. **Área de vida e uso de hábitat de tamanduá-bandeira – *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758 - Nas fazendas Nhumirim e Porto Alegre, Pantanal da Nhecolândia, MS**. 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso, Campo Grande, 2002.

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

MELO, E. S.; SANTOS-FILHO, M. Efeitos da BR-070 na Província Serrana de Cáceres, Mato Grosso, sobre a comunidade de vertebrados silvestres. *Revista Brasileira de Zociências*, v. 9, n. 2, p. 185-192, 2007.

MIES-FILHO, A.; TELECHEA, N. L.; BOHRER, J. L.; WALLAWER, W. P. Produção espermática de *Panthera onca*. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 2, n. 1, p. 55-65, 1974.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987a. v. 1, p. 1-314.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987b. v. 2, p. 327-750.

MIRANDA, F.; COSTA, A. M. *Xenarthra* Tamanduá, Tatu, Preguiça. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Rocca, 2006. p. 402-407.

MIRANDA, F. R.; RAMIRO, S. H.; TEIXEIRA, R. H.; FEDULLO, J. D. L.; LOPES, D. A.; DIAS, J. L. C. Retrospective study of causes death in giant anteater *Myrmecophaga tridactyla* at Fundação Parque Zoológico de São Paulo FPZSP – from 1964 to 2003. In: HEALTH AND CONSERVATION OF CAPTIVE AND FREE-RANGING WILDLIFE, 2004a, San Diego. **Proceeding...** p. 605.

MIRANDA, F. Projeto tamanduá: o grupo de trabalho pela conservação do tamanduá no Brasil. **Edentate**, n. 6, p. 56-57, 2004b Disponível em: <[http://science.conservation.org/portal/server.pt/gateway/PTARGS\\_0\\_124186\\_9375\\_8\\_0\\_0\\_18/Edentata%20\\_lo%20res.pdf](http://science.conservation.org/portal/server.pt/gateway/PTARGS_0_124186_9375_8_0_0_18/Edentata%20_lo%20res.pdf)> Acesso em: 22 mar. 2008.

MIRANDA, G. H. B.; RODRIGUES, F. H. G.; SANTOS, F. V.; LOPES, F. R.; BORGES, P. A. L.; AMARAL, P. S. T. Análise Morfométrica de Tamanduás-bandeira *Myrmecophaga tridactyla* capturados no Parque Nacional das Emas GO e Entorno. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 6., 2003, Fortaleza. **Anais...** v. 1, p. 467-468.

MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A-M.; HAMMAR, L.; SANDEBERT, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 2, p. 1-7, 2008.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**. 6. ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1999. v. 1, 836 p.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para avaliação da morfologia do espermatozóide ovino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 862-869, 2009.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PLATZ JR., C. C.; SEAGER, W. J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 10, p. 1353-1355, 1978.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

PRADA, C. S. **Atropelamento de vertebrados silvestres em uma região fragmentada no nordeste no Estado de São Paulo: Quantificação do impacto e análise de fatores envolvidos**. 2004. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. Disponível em: <<http://lakh.unm.edu/handle/10229/26159>> Acesso em: 14 mar. 2010.

QUINN, P. J. A Lipid-Phase Separation Model of Low-Temperature Damage to Biological Membranes. **Cryobiology**, v. 22, p. 128-146, 1985.

ROBERTS, S. J. Ed **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 2. ed. Ithaca: Edwards Brothers, 1971. p. 695-706.

ROCA, J.; MEZQUITA, C. DNA topoisomerase 11 activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids. *The Embo Journal*, v. 8, n. 6, p. 1855-1860, 1989.

RODRIGUES, F. H. G. **Biologia e conservação do Lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas**, DF. 2002. 105 f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Fertility and Development**, v. 19, p. 91-101, 2007.

ROSA A. O.; MAUHS J. Atropelamento de animais silvestres na rodovia RS – 040. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 16, n. 1, p. 35-42, 2004.

SAACKE, R. G.; MARSHALL, C. E. Observations On The Acrosomal Cap Of Fixed And Unfixed Bovine Spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.16, p. 511-514, 1968.

SCARANO, F. R. Perspectivas das ciências da biodiversidade no Brasil. **Sci. agric.**, v. 64, n. 4, 2007 DOI: 10.1590/S0103-90162007000400016. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90162007000400016&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162007000400016&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 18 fev. 2008.

SCOSS, L. M.; SILVA, E. **Impacto de estradas sobre mamíferos terrestres: o caso do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais**. 2002. 96 p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

SHAW, J. H.; MACHADO-NETO, J.; CARTER, T. S. Behavior of free-living giant anteaters *Myrmecophaga Tridactyla*. **Biotropica**, v. 19, n. 3, p. 255-259, 1987.

SHEWEITA, S. A.; TILMISANY, A. M.; AL-SAWAF, H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. **Current Drug Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 495-501, 2005.

SILVEIRA, E. K. P. da. História natural do tamanduá-bandeira, *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus. 1758, Myrmecophagidae. **Vellozia**, v. 7, p. 34-43, 1969.

SILVEIRA, J. M. **Patologia clínica veterinária – Teoria e interpretação**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. p. 2-4.

SILVEIRA, L.; JÁCOMO, A. T. A.; DINIZ FILHO, J. A. F.; RODRIGUES, F. H. G. Impact of wildfires on the megafauna of Emas National Park, central Brazil. **Oryx**, v. 33, n. 2, p. 108–114, 1999. DOI:10.1046/j.1365-3008.1999.00039.x.

STRÖBER, M.; GRÜNDER, H. D. Sistema Circulatório. In: ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1993, p. 115-117.

TESARIK, J. Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 383-388, 1985.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

ZÚCCARI, C. E. S. N.; LEITE, P. A.; PASSOS, T. S.; CARRIJO, P. R.; KIEFER, C. Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide bovino criopreservados. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 10, n. 3, p. 678-684, 2009.