



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Ana Cássia Sarmiento Ferreira

Produção *in vitro* de embriões de caititu (*Pecari tajacu*) criados em cativeiro

Belém
2014

Ana Cássia Sarmiento Ferreira

Produção *in vitro* de embriões de caititu (*Pecari tajacu*) criados em cativeiro

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia

Orientadora: Profa. Diva Anelie Guimarães

**Belém
2014**

Ana Cássia Sarmiento Ferreira

Produção *in vitro* de embriões de caititu (*Pecari tajacu*) criados em cativeiro

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal . Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Produção Animal.

Belém - PA: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Dra Diva Anelie Guimarães
Orientadora, Universidade Federal do Pará

Dr Otávio Mitio Ohashi
Membro Titular, Universidade Federal do Pará

Dra Simone do Socorro Santos Damasceno
Membro Titular, Universidade Federal do Pará

Dra. Naiara Zocal Saraiva
Membro Titular, EMBRAPA-Amazônia Oriental

Dr. André Salin Khayat
Membro Titular, Universidade Federal do Pará

Prof. Moysés dos Santos Miranda.
Membro suplente, Universidade Federal do Pará

As minhas amadas filhas Manuela, Rafaela e Daniela.

A meu amado esposo Augusto Paes.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida

À Universidade Federal do Pará. Instituição de ensino responsável pela minha formação e qualificação.

Aos meus pais José Augusto e Ana Maria pela vida e valores ensinados. Especialmente a minha mãe pela ajuda incansável com as minhas filhas, principalmente no decorrer dessa pesquisa, sem ela não teria conseguido.

Aos meus irmãos Carlos, Cláudia, Carla e Carolina que torcem pelo sucesso desse trabalho. Ao meu irmão Carlos responsável pela confecção do Abstract.

Ao meu esposo Augusto Paes, por sempre estar ao meu lado, em todos os momentos e maior incentivador para a conclusão desse trabalho. Te amo

A Prof. Diva Guimarães pela orientação competente, conhecimento transmitido, conselhos, críticas enfim pela sua presença marcante.

Aos amigos do laboratório de Fertilização *in vitro*, Alessandra, Marcela, Thiago, Nathalia, Priscila de Paula, Priscila Ramos, Paulo e Hamilton que me auxiliaram diretamente durante os experimentos. A toda Família FIV pela alegre convivência.

Ao Prof. Otávio Ohashi por mais uma vez me receber e disponibilizar seu laboratório para execução dessa pesquisa, além do conhecimento inquestionável.

A Alessandra Ximenes, amiga recente que me acompanhou desde a coleta e experimentos, principalmente de madrugada, muito obrigado.

A Prof Simone Damasceno pelos conselhos e apoio na execução desse trabalho.

Aos Amigos do LARA, especialmente Agatha Botelho e Suleima Silva pelo apoio e conselhos nas horas difíceis.

A prof. Natalia Albuquerque, responsável pelo Criatório científico da EMBRAPA – Amazônia Oriental, que me deu todo incentivo e apoio junto aos animais durante a pesquisa.

Aos tratadores, responsáveis pelos animais Sr. Deóclecio (*in memorian*), Sr. Reginaldo e Luiz (Fazenda porangaba), pelo auxílio com os animais durante as coletas.

Ao amigo Igor Seligmann pela amizade e cedência dos animais à Embrapa. Muito obrigado.

E Finalmente a todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho.

Muito obrigado a todos!!!!

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

RESUMO

Trata-se da aplicação de biotecnias de reprodução na espécie *Pecari tajacu* para melhorar seu potencial para a criação em cativeiro visando sua produção, conservação e multiplicação de recursos genéticos. Para determinar o tempo de maturação *in vitro* foram utilizados 48 fêmeas, foram selecionados 69 CCOs e divididos em 4 grupos por idade e tempo de MIV, e então submetidos a ativação partenogenética em Ionomicina e 6-DMAP. Para análise da progressão meiótica 165 oócitos foram divididos em 4 grupos conforme a suplementação de hormônios na MIV e tempo de maturação. Na criopreservação foram utilizados espermatozoides epididimários de 9 machos, diluídos em Tris-frutose e ACP-120 e divididos em grupos de refrigeração a 4°C e congelamento a -196°C e presença da glutatona (GSH), foram avaliados os parâmetros motilidade, vigor e viabilidade após a diluição *a fresco* e criopreservação. Para a produção de embriões, 97 oócitos após MIV de 36 horas foram divididos grupos de ativação partenogenética, FIV e ICSI. Através da ativação partenogenética obteve-se taxas de clivagens (47%) para os oócitos de fêmeas com menos de 2 anos submetidos a MIV em 36 horas, em todos os grupos observaram-se clivagens porém não houve diferenças significativas ($P>0,05$) entre os grupos analisados, observou-se taxa de blastocisto (15,4%) somente no grupo de oócitos ativados após MIV de 44 horas. Na análise da progressão meiótica, em todos os tempos analisados foram encontrados oócitos em MII. Na criopreservação dos espermatozoides observaram-se queda nos parâmetros analisados nos dois diluidores em todos os grupos, a presença da glutatona não interferiu significativamente nos parâmetros analisados. No resfriamento, as taxas de motilidade e viabilidade foram superiores no ACP-120 (> 50%) e no congelamento em tris-frutose (33% e 18%). A produção de embriões *in vitro* foi bem sucedida na ativação partenogenética (62,9%) e na ICSI (52,6%), na FIV as taxas foram baixas (7%), a produção de blastocisto ocorreu somente nos embriões partenotos (4,5%). Os resultados mostraram a viabilidade de biotecnias reprodutivas como conservação de gametas, e produção *in vitro* de embriões na espécie *Pecari tajacu*.

Palavras chaves: *Pecari tajacu*, MIV, ativação partenogenética, FIV, ICSI, criopreservação, biotecnias da reprodução.

ABSTRACT

This work considers the application of reproduction biotechniques on species *Pecari tajacu* designed to improve its potential for upbringing in captivity and aiming its production, conservation and the multiplication of genetical resources. To determine the maturation time *in vitro*, 48 females were utilized. An amount of 69 CCOs were selected and divided in 4 groups, per age and per time of MIV. They were then submitted to parthenogenetic activation in ionomycin and 6-DMAP. For the meiotic progression analysis, 165 oocytes were divided in 4 groups according to supplementation of hormones in MIV and time of maturation. For the cryopreservation, epididymal sperm of 9 males were utilized, diluted in Tris-fructose and ACP-120 and divided in groups of refrigeration at 4°C and freezing at -196 °C in the presence of glutathione (GSH), where the parameters of motility, vigor and viable sperm were evaluated, after fresh dilution and cryopreservation. For the embryo production, 97 oocytes after MIV of 36 hours were divided in groups of parthenogenetic activation, IVF and ICSI. Through parthenogenetic activation the rates of cleavages were obtained (47%) for the oocytes of females with less than 2 years of age, submitted to MIV in 36 hours. In all groups cleavages were observed, but with no significant difference ($P>0,05$) among the groups analysed. One blastocyst rate of 15,4% was observed only in the group of oocytes activated after MIV of 44 hours. In the meiotic progression analysis, in all times analyzed oocytes were found in MII. In the cryopreservation of the spermatozoa it was observed a drop of the parameters analyzed in the two extenders in all groups. The presence of glutathione did not interfere significantly in the parameters analyzed. In the freezing, the rates of motility and viable sperm were superior in ACP-120 (> 50%) and in the freezing in tris-fructose, 33% and 18%. The production of embryos *in vitro* was well succeeded in the parthenogenetic activation (62,9%) and in ICSI (52,6%). In IVF the rates were low (7%). The production of blastocyst occurred only in the partenotes embryos (4,5%). The results of this work showed the feasibility of reproductives biotechniques, such gametes conservation and *in vitro* production of embryos of the species *Pecari tajacu*.

Key words: *Pecari tajacu*, IVM, parthenogenetic activation, IVF, ICSI, cryopreservation, reproduction biotechniques.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Família Tayassuidae, representadas pelas seguintes espécies: A- <i>Pecari tajacu</i> ; B- <i>Tayassu pecari</i> e C- <i>Catagonus wagneri</i> (Fonte: pt-fotopedia.com)	15
Figura 2	Recinto de criação de caititus, em sistema intensivo de produção, localizado na Embrapa Amazônia Oriental. A unidade familiar é formada por machos e fêmeas adultos, jovens e filhotes	16
Figura 3	Distribuição geográfica de caititus (Fonte: CENAP/ICMBio/novembro de 2011)	17
Figura 4	Anatomia do sistema reprodutor feminino de <i>Pecari tajacu</i> . (1) ovários; (2) tubas uterinas; (3) cornos uterinos; (4) corpo uterino; (5) cervix; (6) vagina	19
Artigo 1		
Figura 1	Ovários de caititus evidenciando a presença do corpo lúteo (1) e folículos ovarianos (2)	38
Figura 2	Oócitos de caititus, selecionados de acordo com a presença de células do <i>cumulus oophorus</i> compactas e refrigentes	40
Figura 3	Embriões de caititus visualizados no 7º dia, após ativação partenogenética, evidenciando o estágio inicial de blastocisto (seta) e expandido (BLX)	43
Figura 4	Oócito de caititu maturado <i>in vitro</i> -36 horas, visualizado por imunofluorescência, após coloração em Hoesch 33342, evidenciando a MII e 1º CP. Aumento 400X	45
Artigo 2		
Figura 1	Testículo de <i>Pecari tajacu</i> dissecado para a remoção da cauda	42
Artigo 3		
Figura 1	Micromanipulação do oócito de caititu para injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Aumento 400X	72
Figura 2	Embriões partenogenotos, blastocisto (BL), embriões em estágio de 4-8 células; não clivados (NC), degenerados (D), observados no 7º dia do desenvolvimento embrionário. Aumento 400X.	75
Figura 3	Progressão das clivagens nos 03 grupos ao longo do desenvolvimento embrionário	76
Figura 4	Observação das clivagens e número de células observadas durante o desenvolvimento embrionário, nos três experimentos, sendo possível observar aumento progressivo na ICSI	76
Figura 5	: Embriões de ICSI no 7º dia, mostrando embriões com 8 células, embriões não clivados (NC).	77

LISTA DE ABREVIACOES

- PIVE – Produção *in vitro* de embriões
- MIV – Maturação *in vitro*
- FIV – Fertilização *in vitro*
- CIV – Cultivo *in vitro*
- ICSI – Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides
- GSH – Glutathiona reduzida
- GPX – Glutathiona peroxidase
- COC – Complexo cumulus oócito
- IA – Inseminação artificial
- TE – Transferência de embriões
- NCSU-23 – North Carolina South University
- BTS - Beltsville Thawing Solution
- PZM – Porcine zygote medium
- PGM – Porcine growth médium
- TALP - Tyrode's albumina, lactato piruvato
- SOF - Fluido sinttico do oviduto
- CR - Charles Rosenkrans
- 6-DMAP – Dimetilaminopurina
- EDTA - etileno diamino tetracetato
- ROS – espécies reativas de oxigênio
- VG – Vesícula germinativa
- MII - Metafase II
- MI - Metafase I

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1- Objetivo Geral.....	14
2.2- Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Características gerais	15
3.2. Biologia reprodutiva do Caititu (<i>Pecari tajacu</i>).....	17
3.3 Biotecnologias reprodutivas	20
Referências Bibliográficas	28
4. ARTIGO 1: MATURAÇÃO IN VITRO E ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA DE OÓCITOS DE <i>Pecari tajacu</i>	35
Resumo	36
4.1 Introdução	37
4.2 Materiais e Métodos	38
4.3 Resultados	42
4.4 Discussão	45
Referências Bibliográficas	45
5. ARTIGO 2: AÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM MEIOS DE RESFRIAMENTO E CONGELAÇÃO EM ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE <i>Pecari tajacu</i>.	49
Resumo	50
5.1 Introdução	51
5.2 Materiais e Métodos	52
5.3 Resultados.....	56
5.4 Discussão.....	59
Referências Bibliográficas	63
6. ARTIGO 3: PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE CAITITU (<i>Pecari tajacu</i>)	66
Resumo	67
6.1 Introdução	68
6.2. Materiais e métodos	69
6.3. Resultados.....	74
6.4. Discussão	77
Referências Bibliográficas	81
7. CONCLUSÃO GERAL	84

1. INTRODUÇÃO.

O Brasil é um dos países que possui maior biodiversidade, sendo a região amazônica responsável por mais de 80% de todo esse recurso natural, de grande potencial sócio-econômico, o qual é muito pouco conhecido e utilizado em benefício das comunidades locais.

Os recursos genéticos animais, tanto domésticos como silvestres, constituem um dos mais promissores segmentos da economia nacional. Eles representam um nicho capaz de responder rapidamente a investimentos pontuais. Portanto, o que hoje parece distante e utópico do ponto de vista de aplicabilidade pode se tornar uma realidade amanhã, já que o elemento determinante na relação custo/benefício das modernas biotécnicas da reprodução animal é o mérito genético do material a ser multiplicado (RUMPF, 2000).

Sobre às espécies silvestres, o manejo de fauna compreende uma área tão nova quanto ampla, e vem despertando interesses, principalmente em relação a real importância que possa ter no contexto científico, econômico e político. Nessa área, devem-se considerar três aspectos: 1- o conservacionista, uma vez que a redução de habitat promove o isolamento de populações silvestres e a redução de variabilidade genética; 2- o uso de espécies silvestres mantidas em criatórios científicos para pesquisa; 3- a criação de animais silvestres em cativeiro para o uso comercial (GUIMARÃES, 2008).

Com relação a este último item, há uma lista de animais da fauna nativa de interesse em bioprospecção. Algumas espécies como o caititu (*Pecari tajacu*), a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), a cutia (*Dasyprocta* sp.), a paca (*Cuniculus paca*) e alguns quelônios são amplamente utilizados para o consumo de carne e/ou ovos (BONAUDO et al., 2005; PEZZUTI et al., 2004). Em florestas tropicais, a carne de caça silvestre é a única fonte de proteína animal para algumas populações locais (BAIA-JR et al. 2010), a importância do uso desse recurso natural conduz a diversos estudos realizados em áreas rurais da Amazônia com objetivo de avaliar as atividades de caça nessas comunidades locais e suas implicações na biodiversidade (BODMER et al. 2004a, BONAUDO et al. 2005; BAIA-JR, 2010)

O uso da biotecnologia da reprodução possibilita a conservação da diversidade biológica, sendo mais um recurso para evitar a perda das espécies (ANDRABI; MAXWELL, 2007).

Neste contexto, Rumpf et al. (2000) comentam que: Os marcadores genéticos; a formação de bancos de sêmen, óvulos, embriões e folículos; a sexagem do sêmen e de embrião; a transferência de embriões; a produção in vitro de embriões; a clonagem; e a própria transgenia são ferramentas disponíveis aos programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos animais.

Nas espécies silvestres existe pouco estudo relacionado a este conhecimento, sendo necessárias pesquisas que enfatizem as variações fisiológicas espécie-específicas, assim como, as alterações dos gametas durante a refrigeração, congelamento e pós-descongelamento (FICKEL et al. 2007).

O caititu é um dos animais mais caçados na Amazônia para alimentação humana, a espécie é apreciada por sua carne e couro de excelente qualidade (BODMER; ROBINSON, 2004b). Essa espécie apresenta potencial para a criação em cativeiro, tanto por sua capacidade produtiva quanto pela demanda de mercado para os seus produtos (MAYOR et al., 2007a). Segundo Nogueira e Nogueira-filho (2011) a sua produtividade é melhor do que quando comparada ao bovino.

Diante de seu potencial comercial, o interesse pela criação de caititus em cativeiro tem sido crescente, por isso, o desenvolvimento de modelos sustentáveis de criação constituem uma alternativa racional para aproveitar economicamente os animais cativos, favorecer a segurança alimentar de populações tradicionais e contribuir para reduzir a pressão de caça (KAHWAGE et al. 2010). Todavia, para a manutenção da espécie em cativeiro e obtenção de resultados positivos, seja para conservação ou melhoramento genético, se faz necessário o conhecimento de sua biologia reprodutiva (GARCIA et al. 2009).

Os aspectos reprodutivos de machos e fêmeas de caititus vêm sendo amplamente estudados (GUIMARÃES et al. 2005; MAYOR et al. 2006a; MAYOR et al. 2007a; MAYOR et al. 2007b; KAHWAGE et al. 2008; COSTA et al. 2010), o que é fundamental para o emprego de biotecnologias da reprodução. Dentre as biotécnicas, algumas já estão sendo empregadas na espécie, como, a criopreservação de sêmen (GARCIA et al., 2012), sendo esse o passo inicial para o emprego de outras como a produção *in vitro* de embriões.

Desta forma, este trabalho visa à aplicação de biotécnicas da reprodução em caititus, com o intuito do melhoramento genético animal, apresentando as seguintes hipóteses: oócitos de *Pecari tajacu* submetidos a maturação *in vitro* durante 36 e 44 horas apresentam desenvolvimento competente após ativação partenogenética; a adição de glutatona reduzida (GSH) no meio de criopreservação em dois diferentes diluidores melhora a viabilidade após o descongelamento dos espermatozoides de *Pecari tajacu*; é viável a produção de embriões *in vitro* de *Pecari tajacu* através da fecundação *in vitro* e injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

2. OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar biotécnicas reprodutivas em *Pecari tajacu* criado em cativeiro visando à produção, conservação e multiplicação de recursos genéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 - Determinar o tempo de maturação *in vitro* de oócitos de *Pecari tajacu* e o seu desenvolvimento competente, por meio da ativação partenogenética;

2.2.2 - Estabelecer protocolos de criopreservação de espermatozoides, obtidos a partir da cauda do epidídimo.

2.2.3 - Analisar o efeito de antioxidantes na viabilidade dos espermatozoides, durante a criopreservação.

2.2.4 - Produzir embriões por fecundação *in vitro* e injeção intracitoplasmática de espermatozoides, e viabilizar o desenvolvimento dos embriões produzidos de *Pecari tajacu*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS

Segundo Hassanin et al (2012) a Ordem Cetartiodactyla constitui os animais que apresentam número de dedos pares nos membros, tendo com alguns exemplos, camelos, suínos, pecari, cervos. A subordem Suina é representada por duas famílias a Suidae, que são os suínos do velho mundo e Tayassuidae que são os porcos do mato neotropicais.

Segundo SOWLS (1997); Wilson e Reeder (2005), a família Tayassuidae (Figura 1) inclui a espécie *Pecari tajacu*, cujos representantes são conhecidos vulgarmente como caititus ou catetos, o queixada (*Tayassu Pecari*) e o taguá ou porco-do-chaco (*Catagonus wagneri*).

Os tayassuídeos caracterizam-se por possuírem quatro dedos nos membros anteriores e três nos posteriores, sendo apenas dois funcionais, munidos de pequenos cascos. Não se observa dimorfismo sexual, a distinção entre os sexos se faz pela visualização do escroto, uma vez que os dentes caninos e o tamanho dos machos são apenas um pouco maior do que das fêmeas (SOWLS, 1997).

Figura 1: Família Tayassuidae, representadas pelas seguintes espécies: A- *Pecari tajacu*; B- *Tayassu pecari* e C- *Catagonus wagneri* (Fonte: pt-fotopedia.com).



Os caititus são caracterizados pela cabeça relativamente grande, em comparação com o tamanho do corpo, e pela presença de um colar de pelos brancos ao redor do pescoço (Figura 2). Os pelos do dorso formam uma crina erétil, os membros são delgados e o corpo robusto (SOWLS, 1997). De acordo com Santos et al. (2007), o caititu vive aproximadamente 15 anos na natureza e até 24 anos em cativeiro.

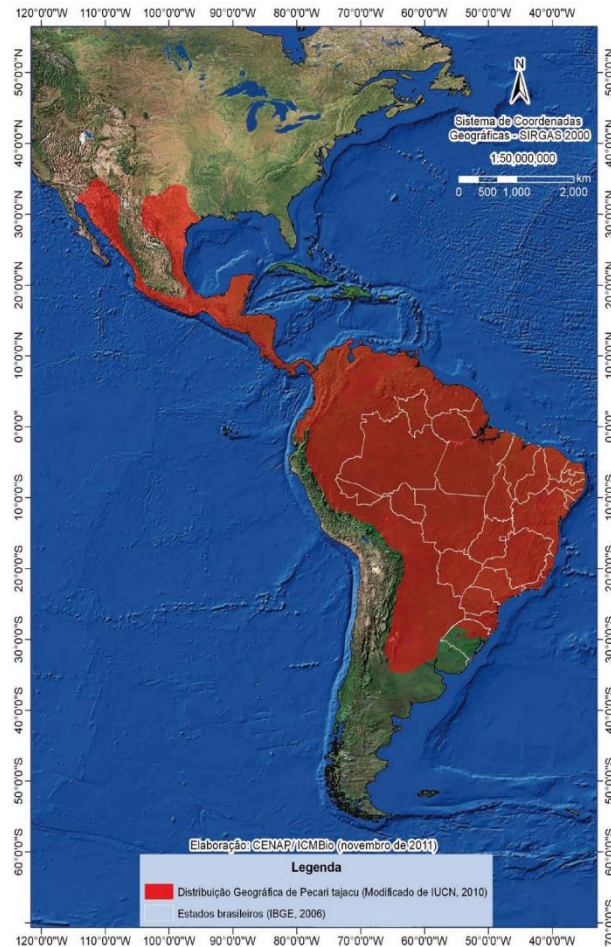
Os caititus adultos medem entre 70 a 100 cm de comprimento e pesam de 15 a 28 kg, a pelagem é acinzentada, diferente dos infantes que são mais avermelhados (Figura 2).

Figura 2: Recinto de criação de caititus, em sistema intensivo de produção, localizado na Embrapa Amazônia Oriental. A unidade familiar é formada por machos e fêmeas adultos, jovens e filhotes. (Fonte: Suleima Silva, 2013).



A distribuição geográfica dos caititus estende-se do sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina (Figura 3), onde habitam regiões desérticas, estepes áridas e florestas (BODMER; SOWLS, 1993). Na natureza são predominantemente herbívoros, alimentando-se de raízes, frutos, bulbos, caules e folhas (BODMER; SOWLS, 1993; KEUROGHLIAN et al., 2004). Ocasionalmente, podem comer larvas, pequenos vertebrados e carniça (DESBIEZ, 2007). Em cativeiro são alimentados com grãos, frutos, hortaliças, forragens, além de ração comercial para suínos (NOGUEIRA FILHO, 1997; 1999). Os caititus são animais sociais que vivem em grupos coesos e estáveis por longos períodos de tempo com machos e fêmeas de diferentes idades em uma razão sexual de 1:1. A espécie é territorial e indivíduos estranhos ao grupo podem ser perseguidos em ambiente natural (BYERS; BEKOFF, 1981).

Figura 3: Distribuição geográfica de caititus (Fonte: CENAP/ICMBio/novembro de 2011).



3.2. BIOLOGIA REPRODUTIVA DO CAITITU (*PECARI TAJACU*)

O início da vida reprodutiva de machos e fêmeas ocorre dos 8 aos 16 meses de idade. A duração do ciclo estral é de 22 a 28 dias, e a duração média da gestação em caititus é de 140 a 150 dias. Fêmeas em fase de estro apresentam maior abertura vaginal, intumescimento e vermelhidão da vulva, além de secreção de fluido mucoso após o pico de estrógeno (MAYOR et al., 2007a). O tamanho da ninhada varia de um a quatro filhotes (média de dois), sendo que o peso ao nascer é aproximadamente de 604 gramas, e o desmame ocorre em torno de dois meses. O primeiro estro pós-parto ocorre somente de quatro a 16 dias após o desmame dos filhotes (SOWLS, 1966, 1984; GARCIA et al, 2009). Em respeito ao desempenho reprodutivo em cativeiro o tamanho médio das ninhadas é $1,85 \pm 0,43$ filhotes por parto, a idade média do primeiro parto foi de 639 ± 243 dias, o intervalo de partos foi de 196 ± 104 dias, o intervalo observado do parto à reconcepção foi de 58 ± 104 dias. A maioria dos partos em caititus é duplo (79,7%), havendo também partos únicos (17,6%) e triplos (2,7%). A proporção sexual ao nascimento é de 52,6% de fêmeas para 47,7% de machos. Os caititus podem apresentar mais de um parto por ano, sendo a produção média por fêmea de $1,03 \pm 0,73$ ninhadas por ano. Fêmeas multíparas são mais prolíficas, com $1,40 \pm 0,5$ partos por ano e $2,47 \pm 0,99$ filhotes por ano, o

que faz com que a produção média em um rebanho composto por fêmeas de diversas idades seja de 2,35 partos e 4,7 filhotes por fêmea ao ano (MAYOR et al., 2007a).

Os órgãos reprodutivos femininos do caititu compõem-se internamente de ovários, tubas uterinas, útero e vagina (Figura 4); além da genitália externa (MAYOR, et al. 2006b). Os ovários localizam-se na parte superior da cavidade abdominal, abaixo da quarta vértebra lombar, suspensos por uma prega de peritônio e são revestidos parcialmente pela bolsa ovárica (SANTOS et al. 2000; PAULA et al. 2003; MAYOR, et al. 2006b).

As tubas uterinas são longas, finas e não tão sinuosas como nos suínos, medindo em média $8,88 \text{ cm} \pm 2,59 \text{ cm}$ no lado direito, e $8,26 \text{ cm} \pm 2,14 \text{ cm}$ no lado esquerdo (PAULA et al. 2003). Podem ser divididas em três segmentos funcionais: 1- o istmo, porção estreita próxima do útero e bem visível; 2- a ampola, uma dilatação na tuba uterina, e 3- o infundíbulo, caracterizado por numerosas pregas, as fímbrias, que se projetam sobre a superfície do ovário (SANTOS et al. 2000).

O útero pode ser classificado como bicórneo, semelhante ao dos suínos (SOWLS, 1997; SANTOS et al., 2000; PAULA et al., 2003; MAYOR et al., 2006b). Os cornos uterinos apresentaram-se grossos, curtos e pouco flexível, comunicando-se com o corpo uterino e com as tubas uterinas (SANTOS et al., 2000). O corpo uterino é curto e possui comprimento de $3,08 \text{ cm} \pm 0,32 \text{ cm}$. A cérvix apresenta-se longa e espessa nas fêmeas pluríparas, e fina nas nulíparas, apresentando várias projeções da mucosa para sua luz (SANTOS et al., 2000).

A vagina é um órgão tubular com as paredes finas constituída de longas dobras longitudinais (MAYOR et al., 2006b), e medindo aproximadamente $7,74 \text{ cm} \pm 2,60 \text{ cm}$.

Figura 4: Anatomia do sistema reprodutor feminino de *Pecari tajacu*. (1) ovários; (2) tubas uterinas; (3) cornos uterinos; (4) corpo uterino; (5) cervix; (6) vagina. (Fonte: Arquivo pessoal, 2013)



Os machos apresentam bolsa escrotal localizada na região pélvica, em posição intermediária entre a região perineal e inguinal, de modo que o eixo maior dos testículos inclina-se para a região dorsocaudal (GARCIA et al., 2009). Os testículos são posicionados mais ventralmente que nos suínos, devido à grande curvatura dorsal da coluna vertebral presente nos caítus. A pele da bolsa escrotal possui pigmentação como no restante do corpo, porém não apresenta pelos longos e espessos, característicos de tayassuídeos, com apenas alguns pelos finos (SONNER et al., 2004).

Os testículos projetam-se caudalmente na superfície corporal, possuem forma ovalada e são achatados laterolateralmente. Possuem duas margens (livre e epididimária) e duas extremidades (capitata e caudata). Na extremidade capitata, localiza-se o funículo espermático, que contém artérias, ducto deferente, vasos linfáticos, veias, além de nervos, músculo cremaster e a túnica vaginal. Na extremidade caudata, o epidídimo origina o ducto deferente. O túbulo seminífero de caítus apresenta $224 \pm 48,45$ μ m de comprimento, altura de $66,33 \pm 5,12$ μ m e diâmetro médio de $278 \pm 16,54$ μ m, estando esses valores dentro da faixa considerada típica para a maioria dos amniotas (GARCIA et al., 2009).

Em geral, a espermatogênese dos caítus é considerada muito semelhante à dos suínos, caracterizada pela alta eficiência na produção espermática, uma vez que os caítus possuem um dos mais baixos números de células de Sertoli por grama de testículo e uma das mais altas

proporções volumétricas, em que 16% do parênquima é ocupado por compartimento intertubular e 84% por túbulos seminíferos (COSTA et al., 2004). A eletroejaculação é o principal método de coleta de sêmen em caititus, o sêmen do caititu pode ser dividido em três frações: uma pobre (constituída de secreção das glândulas acessórias e pobre em células), uma rica e uma fração gel. As análises das características seminais de caititus mostram que o volume total do ejaculado é de $2,0 \pm 0,2$ mL, a concentração média é de $49,68 \pm 65 \times 10^6$ SPTZ/mL (GARCIA et al., 2009). A coleta por eletroejaculação demonstra um sêmen de aspecto ralo, de cor esbranquiçada (KAHWAGE et al., 2010).

3.3 BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS

As técnicas de reprodução assistida como, inseminação artificial (IA), produção *in vitro* de embriões (PIVE), transferência de embriões (TE) e criopreservação de gametas são essenciais ao melhoramento do desempenho reprodutivo, conservação da biodiversidade e desenvolvimento de pesquisas básicas (GOBELLO; CORRADA, 2003), no entanto, para o sucesso da aplicação dessas biotecnologias é necessário o conhecimento da fisiologia reprodutiva da espécie em estudo.

3.3.1 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões envolve etapas de maturação (MIV), fecundação, e cultivo ou co-cultivo de zigotos e estruturas embrionárias (CIV). Tem sido utilizada nos diferentes segmentos da reprodução assistida, sendo inicialmente empregada como instrumento para estudar os fenômenos fisiológicos relacionados aos gametas. Fato esse que permitiu o melhor entendimento dos fenômenos de crescimento, maturação e fecundação de oócitos, da capacitação espermática, bem como o desenvolvimento embrionário precoce e os seus mecanismos de regulação (GONÇALVEZ, et al., 2008).

A PIVE envolve quatro aspectos principais: 1) a aquisição suficiente de número de oócitos com maturação nuclear e citoplasmática; 2) a fertilização *in vitro* desses oócitos; 3) o cultivo dos embriões e a transferência desses embriões para as fêmeas (BIGGERS, 2012).

3.3.1.1 Maturação *in vitro* de oócitos

O ovário apresenta duas funções principais, sendo a primeira a produção cíclica de oócitos fertilizáveis e a segunda a produção de hormônios esteroides em proporções balanceadas (HAFEZ, 2004). A maturação oocitária envolve um período de crescimento e um

período de preparação nuclear e citoplasmática final sendo um pré-requisito para a fertilização e o desenvolvimento final.

O oócito, no interior do folículo, está envolto por células da granulosa, formando o complexo *cumulus*-oócito (CCO), o *cumulus* apresenta função diferenciada devido ao seu contato íntimo com o oócito. Substâncias reguladoras produzidas pelo oócito tem função importante na atividade das células do *cumulus*, assim como essas células somáticas tem participação ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos oócitos (GONÇALVEZ et al., 2008).

A maturação *in vitro* envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas do oócito, que devem ocorrer de forma simultânea de modo a capacitar a fecundação e possibilitar o desenvolvimento embrionário adequado (DODE et al., 2000; SILVA, 2010). Os eventos nucleares envolvem a retomada da meiose e prosseguimento da maturação após pico de LH. Este processo inicia com a quebra da vesícula germinativa e formação do fuso da meiose I. A posição central do fuso conduz uma divisão celular assimétrica ocorrendo à redução do número cromossômico, extrusão do 1º corpúsculo polar e retenção máxima do citoplasma do oócito. O processo de maturação finaliza com a condução da meiose II até a parada na metáfase II, sendo que aquela só será finalizada com a fertilização do oócito e extrusão do 2º corpúsculo polar (LI & ALBERTINI, 2013). As mudanças citoplasmáticas envolvem reprogramação na síntese proteica, mudança na atividade do fator promotor de maturação, desenvolvimento dos mecanismos de liberação de Ca²⁺, aumento de deposição lipídica, redução do aparelho de Golgi, alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana plasmática e expansão das células do *cumulus* (DIELEMAN et al., 2002).

Além da maturação nuclear e citoplasmática, as células somáticas que envolvem o oócito, a granulosa e do *cumulus* desempenham importantes funções nesse processo. As células do *cumulus* tornam-se suspensas em uma matriz de muco durante a maturação. Hormônios endógenos e fatores produzidos pelo oócito estimulam a síntese de ácido hialurônico pelas células do *cumulus* induzindo a sua expansão durante o período de maturação (GONÇALVEZ, et al., 2008).

Uma grande variedade de meios tem sido utilizados para maturação *in vitro*, sendo o mais comum o TCM-199 com sais de EARLE, a esse meio são adicionados outros aditivos e hormônios. Na MIV em suínos ainda não existe um meio padrão (SANTOS et al., 2011), porém já foram desenvolvidos alguns meios como o NCSU-23 e NCSU-37 (PETTERS; WELLS, 1993; SUZUKI et al., 2006), o PZM e PGM (YOSHIOKA et al., 2002), e o TCM-199 como meio base (HULINSKA et al., 2011)

3.3.1.2. Capacitação espermática.

O espermatozoide é funcionalmente imaturo, enquanto permanece no testículo, somente adquirindo potencial fecundante durante o trânsito pelo epidídimo (KNOBIL & NEILL, 1994). Os espermatozoides, quando em contato com o plasma seminal, sofrem incorporações e modificações de várias substâncias de sua superfície que inibem o potencial fecundante dos mesmos. Este fenômeno bioquímico é denominado decapacitação espermática (RATH, 2001). Portanto, é fundamental a ocorrência da capacitação espermática, ou seja, a retirada de uma camada glicoproteica e de proteínas do plasma seminal, as quais estão aderidas a membrana plasmática na região que sobrepõe a região do acrossoma (RATH, 2001).

Durante a capacitação proteínas adicionadas na cauda do epidídimo e plasma seminal são removidas da superfície dos espermatozoides, fenômeno essencial para a série de eventos que ocorrem na fertilização (MACHATY et al. 2012). A capacitação espermática é efetivada pela remoção de fatores inibidores deste processo, derivados do plasma seminal e da interação das células espermáticas com os chamados fatores capacitantes, os quais se encontram no trato genital feminino.

A capacitação é desencadeada a partir da ejaculação no trato genital feminino e acredita-se que se inicie no útero, todavia, o principal local da capacitação parece ser a tuba, especificamente, a região do istmo (RATH, 2001). Glicosaminoglicanos e proteoglicanos presentes na tuba uterina estão envolvidos na capacitação. Tais informações conduzem ao desenvolvimento de métodos efetivos de capacitação *in vitro*, onde as proteínas de superfícies são removidas através da lavagem e centrifugação em gradiente descontínuo de densidade (MACHATY et al. 2012)

A fecundação *in vitro* (FIV) tem sido realizada com sêmen capacitado em meio de alta força iônica, com a utilização de ionóforo de Ca^{2+} e em bovinos, por exemplo, a heparina tem sido usada como o glicosaminoglicano na capacitação espermática (ANDERSON, 1991). Em suínos utiliza-se a cafeína na indução da capacitação espermática (MARTINEZ et al., 1993).

O espermatozoide capacitado na presença do cálcio extracelular tem habilidade de se ligar a zona pelúcida e sofrer a reação acrossômica. Essa ligação se dá pela ZP3 (glicoproteína da zona pelúcida). Esse processo envolve a segmentação progressiva do acrossomo, e a fusão das membranas plasmática e acrossômica externa, permitindo a liberação de enzimas que são importantes para a penetração e fecundação (GONÇALVES et al. 2008).

3.3.1.3 Fecundações *in vitro* e desenvolvimento embrionário.

A fusão do oócito com o espermatozoide ocorre após a penetração, especificamente, pelo contato entre o segmento equatorial do espermatozoide e a membrana plasmática do oócito. Dessa forma, dois fenômenos ocorrem simultaneamente: 1) a inclusão da carga genética paterna, com o reestabelecimento do número diploide dos cromossomos; 2) a ativação do oócito, necessária ao bloqueio à polispermia e o início da clivagem embrionária (GONÇALVES et al. 2008).

A fecundação *in vitro* já esta bem estabelecida em animais domésticos, porém em animais silvestres apresenta sucesso restrito. Foram registrados resultados satisfatórios utilizando-se a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) em espécies primatas e felinos silvestres. O principal fator limitante para essa biotécnica é a necessidade de um grande número de oócitos, principalmente para espécies raras ou ameaçadas de extinção, uma vez que existem poucos exemplares em cativeiro (GUIMARÃES, 2008).

Para a fecundação *in vitro* após a maturação dos oócitos e separação dos espermatozoides viáveis deve-se promover um ambiente adequado para a capacitação espermática e a fecundação. O meio mais utilizado é o Fert-TALP (Tyrode's albumina, lactato piruvato), contendo heparina para a capacitação dos espermatozoides, os quais são co-cultivados com os oócitos por um período que varia de 6 a 22 horas (GUIMARÃES, 2008). Em suínos o meio que apresenta os melhores resultados é o TCM-199, acrescido de 10% soro fetal bovino e cafeína que utilizando sêmen fresco, apresentou taxa de fecundação de 94% (FUNAHASHI; DAY, 1993; SERRET et al. 2007).

Para o desenvolvimento embrionário é necessário a utilização de um meio simples que suporte a nutrição celular e o desenvolvimento, durante a fase de pré-implantação embrionária. Nessa fase, ocorrem eventos significativos como clivagens, ativação do genoma embrionário, agregação e compactação dos blastômeros, expansão da blastocela, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e o rompimento da zona pelúcida (GONÇALVES, 2008).

Os métodos de cultivo foram aperfeiçoados para permitirem o desenvolvimento *in vitro*, utilizando-se sistemas de co-cultivo com uma variedade de células somáticas, tais como: células epiteliais do oviduto (CEOB), células da granulosa, células VERO, células BRL (GONÇALVES, 2008; MACHATY et al. 2012). Dentre os meios mais utilizados estão o fluido sintético do oviduto (SOF), baseado na composição bioquímica do fluido tubário-uterino de ovelhas, e os meios CR 1 e 2 (Charles Rosenkrans). São adicionados a esses meios: glutamina, citrato e aminoácidos não essenciais e BSA para dar suporte ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto (MACHATY et al., 2012).

Em suínos um fator limitante para o cultivo dos embriões é o desenvolvimento até o estágio de quatro células. Considera-se que este fato ocorra por condições inadequadas de cultivo, e que coincida com o tempo das primeiras ativações do genoma embrionário (SERRET et al., 2007). Porém utilizando-se o meio NCUS a taxa de desenvolvimento embrionário é de 30%.

3.3.1.4 Ativações partenogenética de oócitos

Em mamíferos, está bem estabelecido que a penetração de um espermatozoide em um oócito em metafase II inicia uma série de oscilações de Ca^{2+} por diversas horas induzindo a retomada da meiose e iniciando o desenvolvimento embrionário (CHA et al. 1997)

A ativação artificial é utilizada na obtenção de embriões partenogenotos e serve como modelo no estudo de eventos bioquímicos e morfológicos durante a embriogênese inicial (MEERSCHAUT et al. 2014). Na ausência do espermatozoide, a concentração de cálcio intracelular pode ser elevada por diferentes tratamentos como estímulo elétrico ou por uma variedade de agentes químicos como etanol e estrôncio (MEO et al. 2004), Ionoforo A23187 (FUNAHASHI et al., 1994a), a ciclohexamida (CHA et al., 1997), estrôncio (OKADA et al. 2003), 6- dimetilaminopurina (GRUPEN et al. 2002).

O aumento do Ca^{2+} destrói o fator citostático Calcio dependente (CSF) resultando na diminuição da atividade do fator promotor de maturação (MPF), resultando na ativação partenogenética. O MPF é constituído pela quinase CDC2 e ciclina B, sendo essencial para a parada da meiose em metafase II (VARGA et al. 2008).

Os métodos de ativação mais eficientes são os que combinam a inativação temporária do MPF obtida com um pico de cálcio, com a sua inativação que é induzida por inibidores da síntese proteica ou inibidores da proteína quinase (GRUPEN et al., 2002).

3.3.2 Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

A primeira ICSI em oócitos de mamíferos foi realizada por Uehara e Yanagimachi (1976). Essa técnica é largamente usada na reprodução assistida e tem produzido informações relevantes sobre os mecanismos básicos da fecundação. Oócitos de mamíferos injetados com espermatozoides evidenciam mecanismos de ativação, liberação de Ca^{2+} e podem desenvolver a termo (NERI et al., 2014)

A técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides consiste em inserir os espermatozoides no interior do ooplasma, e foi primeiramente desenvolvida em animais, em ouriço-do-mar (HIRAMOTO, 1962). Em oócitos de mamíferos, Uehara e Yanagimachi (1969)

observaram altas taxas de descondensação do núcleo de espermatozoides após microinjeção em oócitos de hamster, a ICSI tem sido utilizada para estudar o tempo de formação do prónucleo feminino. A técnica de ICSI é amplamente usada na reprodução assistida uma vez que produz informações relevantes sobre a ciência básica da fertilização (NERY et al. 2014), mecanismos de interação de gametas, ativação do oócito pelo espermatozoide, e controle do início do ciclo celular (SHIRAZI et al., 2009).

3.3.3 Características seminais e criopreservação de espermatozoides

O processamento do sêmen é definido como todo e qualquer tipo de manipulação ou tratamento laboratorial do ejaculado, de suas frações ou seus componentes. O processamento inclui a avaliação das características física e químicas do sêmen e da morfologia espermática, a diluição, o resfriamento, o envasamento e a congelamento do sêmen (REICHENBACH et al. 2008). Segundo o mesmo autor, a refrigeração e congelamento do sêmen têm a finalidade de manutenção da vitalidade espermática por períodos variáveis, objetivando a sua utilização futura.

O estudo inicial da conservação de sêmen para evitar danos às células espermáticas e manter a viabilidade foi feito a partir de um meio de nutrição. Este deveria proporcionar uma fonte de energia que permitisse a viabilidade dos espermatozoides, mantivesse-os fecundantes por um período de vários dias, e eliminasse o uso diário do reprodutor (RONDON et al. 2012). Assim, a necessidade em se utilizar substâncias com ação protetora sobre espermatozoides submetidos a diferentes métodos de conservação, seja resfriamento e/ou congelamento, tem sido amplamente estudada em diferentes espécies de animais domésticos, para evitar os danos devido ao choque térmico (NUNES; COMBARNOUS, 1995; ALVARENGA et al., 2000; RONDON et al. 2008) e o estresse oxidativo (PEÑA et al. 2004; MORAES et al. 2010).

Os diluentes de sêmen possuem várias funções básicas, como aumentar o volume da amostra, suprir a necessidade de nutrientes para a produção de energia, proteção dos espermatozoides ao choque térmico, apresentar tampão para controlar as variações de pH, permitir balanço osmótico e controlar o desenvolvimento bacteriano (BORTOLOZZO et al. 2008). Os diluidores amplamente utilizados para conservação do sêmen em suínos são Kiev® (JOHNSON et al. 1982), (EDTA), Zorlesco (PAQUIGNON et al. 1987), Beltsville Thawing Solution - BTS® (WOELDERS, 1992) e água de coco em pó -ACP® (RONDON et al. 2008). Em caimitus (*Pecari tajacu*) foram utilizados o TRIS frutose e Tris-Glicose (CASTELO et al. 2010), o BTS (GARCIA et al. 2012); a ACP-116 (SILVA et al. 2013).

Dentre as técnicas de colheita de sêmen podem ser citadas: a massagem das glândulas vesiculares e das ampolas dos condutos deferentes, a vagina artificial e a eletroejaculação. A

recuperação de espermatozoides viáveis do epidídimo e sua criopreservação podem ser usadas para a preservação de germoplasma de animais de alto valor genético. Os estudos nesses espermatozoides se concentram no efeito da adição do plasma seminal, comparação de meios diluentes adequados para a congelação e viabilidade espermática (MONTEIRO et al. 2009). O ambiente da cauda do epidídimo permite que os espermatozoides armazenados nesta região sobrevivam por várias semanas, primariamente pela manutenção quiescente do metabolismo e a prevenção da ativação prematura dos mesmos (GLORIA et al. 2011).

Em caititus (*Pecari tajacu*), estudos de tecnologia de sêmen tem se restringido a definição de protocolos para colheita e avaliação. Dessa forma é necessário o desenvolvimento de pesquisas para a preservação de gametas (CASTELO et al. 2010). Segundo o autor, torna-se necessário enfatizar variações espécie-específicas na fisiologia celular do espermatozoide, bem como as transformações que o gameta sofre durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. Nessa espécie, Silva et al. (2013), verificaram que os espermatozoides são resistentes as curvas de congelamento que variam de -10 a -40°C/min a partir de 5°C até -196°C, utilizando como crioprotetor o glicerol.

Em suínos, vários fatores influenciam a qualidade espermática durante o processo de conservação por resfriamento ou congelação, que podem estar relacionados à suscetibilidade ao choque térmico, a velocidade de resfriamento, à composição dos diluentes, aos fatores inerentes ao espermatozoide, às diferenças entre cachaços e ejaculados, além de taxas de diluição do sêmen (BORTOLOZZO et al. 2008). Um dos fatores importantes que podem ocasionar sérios danos às células, inclusive às espermáticas, é o estresse oxidativo que gera espécies reativas ao oxigênio (ROS). Estas substâncias são prejudiciais ao espermatozoide diminuindo viabilidade, além de causar danos irreversíveis no DNA do espermatozoide maturo (DE AMBROGI et al. 2006). Além disso, foi comprovado que o espermatozoide suíno é muito sensível ao dano peroxidativo devido à alta concentração de ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolípídeos de sua membrana plasmática (CEROLINI et al. 2001; RONDON et al. 2012).

3.3.4 Sistemas antioxidantes – o papel da glutatona na criopreservação

Os antioxidantes são substâncias como vitaminas, minerais, pigmentos naturais, aminoácidos, ácidos graxos e outros compostos vegetais, que bloqueiam ou neutralizam o efeito nocivo dos radicais livres (WILHELM-FILHO, 1994). Os mecanismos de defesa antioxidante presentes no plasma seminal e na célula espermática incluem sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático compreende enzimas como a superóxido dismutase (SOD),

a glutathione redutase (GSH), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Esta última atua como catalisadora na reação de redução do peróxido de hidrogênio à água e ao oxigênio molecular. Seu papel antioxidante diminui os riscos de formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 , via reação de Fenton (WILHELM-FILHO, 1994; RONDON et al. 2012).

O processo de resfriamento, congelamento-descongelamento produz estresse físico e químico na membrana de espermatozoides o que reduz a viabilidade e poder de fertilização dos mesmos. O choque frio dos espermatozoides está associado com estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio (GADEA et al. 2004). Os estresses oxidativo e osmótico causam danos às membranas plasmáticas e acrossomal, respectivamente, assim como contribuem para a antecipação da capacitação e da reação acrossomal, no processo de refrigeração e de congelamento/descongelamento, reduzindo a longevidade do espermatozoide (DE AMBROGI et al. 2006; RONDON et al. 2012)

A glutathione é o antioxidante intracelular mais abundante, com múltiplas e complexas funções biológicas é um tripeptídeo ubiquitinona presente em células vivas e desempenha um importante papel em mecanismos de defesa intracelular contra o estresse oxidativo. O seu uso na criopreservação de sêmen suíno tende a aumentar o potencial de fertilização de espermatozoides na espécie (GADEA et al. 2004).

Para minimizar o efeito deletério das ROS na membrana do espermatozoide durante a criopreservação, pesquisas atuais têm estudado a adição de antioxidantes aos diluidores, tais como a glutathione (GSH), catalase e ácido ascórbico. A adição de antioxidantes aos diluidores para a criopreservação permite melhorar a qualidade espermática após a descongelamento, além de aumentar a longevidade dos espermatozoides (MONTEIRO et al. 2009). Porém, o uso da glutathione nos meios de criopreservação não tem contribuído para elevar os parâmetros seminais em ovinos (PERES et al., 2012), suínos (GADEA et al., 2004) equinos (BARROS et al., 2013) em equinos. Porém ao adicionar, a glutathione no meio de descongelamento, Gadea et al. (2005) observaram queda na produção de ROS no sêmen suíno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA M.A. et al. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v.32, p.541-545, 2000.
- ANDERSON, G.B. Fertilization, early development and embryo transfer. In: CUPPS, P. **Reproduction in Domestic Animals**, 4.ed. San Diego: Academic Press, p.279-313. 1991.
- ANDRABI, S.M.H; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, 2007.
- BAIA JÚNIOR, P.C, GUIMARÃES, D.A.A., LE PENDU, Y. Non-legalized commerce in game meat in the brazilian amazon: a case study. **Revista de Biología Tropical**, v.58, p.1079-1088. 2010.
- BARROS, L.O. et al. Efeito da adição de glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor de congelamento do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.430-438, 2013.
- BIGGERS, J. D. IVF and embryo transfer: historical origin and development. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 25, 118– 127. 2012.
- BODMER, R.E., E.P. LOZANO, FANG, T.G. Economic analysis of wildlife use in the Peruvian Amazon. p. 191-207. In: K.M.SILVINS, R. E. BODMER; J.M.V. FRAGOSO (eds.). **People and nature: wildlife conservation in South and Central America**. Columbia University Press, New York, New York, USA. 2004a.
- BODMER, R.E., ROBINSON, J.G. Evaluating the sustainability of hunting in the neotropics, In: SILVIUS, KIRSTEN M. BODMER, RICHARD E. FRAGOSO, J.M. V. (Ed.), **People in Nature: Wildlife Conservation in South and Central America**. New York : Columbia University Press, New York, p. 299–323. 2004b
- BONAUDO, T, et al. The effects of deforestation on wildlife along the transamazon highway. **European Journal of Wildlife Research**, v.51, p.199-206. 2005.
- BORTOLOZZO, F.P. et al. Inseminação artificial em suínos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ED – São Paulo – Roca, 2008.
- BYERS, J A; BEKOFF, M. Social, spacing, and cooperative behavior of the collared peccary, *Tayassu tajacu*. **Journal of Mammalogy**, v. 62, p. 767–785, 1981.
- CASTELO, T.S. et al. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Cryobiology**, v.61, p. 275–279. 2010
- CEROLINI, S. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v.121, p.395-401, 2001.

- CHA, S.K. et al. Effect of cytochalsin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and in vitro development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. **Reproduction. Fertility and. Development**, v. 9, 441–446. 1997.
- COSTA D.S, HENRY M, PAULA T.A.R. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.46-51, 2004.
- COSTA, G.M.J., et al. Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (collared peccary, *Tayassu tajacu*). **Journal of Andrology**, v.31, p. 221-230. 2010
- DE AMBROGI, M. et al. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, p.1994-2000. 2006.
- DESBIEZ, A L J. **Wildlife Conservation in the Pantanal: Habitat alteration, invasive species and bush meat hunting**. University Of Kent, Canterbury. 2007.
- DIELEMAN, S.J. et al. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v.57, p.5-20, 2002.
- DODE, M.A.N; ADONA, P.R; RODOVALHO, N.C.M. Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. **Arq Fac Vet UFRGS**, v.28, suplemento., p.241, 2000.
- FICKEL, J.; WAGCHER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research.**, v.53, p. 81-89, 2007.
- FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Amsterdam, v. 99 p. 97-103, 1993.
- FUNAHASHI, H. et al. In vitro development of in vitro matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 50, p.1072–1077. 1994a.
- GADEA, J. et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v. 62. 2004.
- GADEA, J. et al. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.26, n° 6. 2005.
- GARCIA, A.R.; KAHWAGE, P.R.; OHASHI, O.M. Aspectos reprodutivos de caaitus (*Tayassu tajacu*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p.71-81. 2009
- GARCIA, A.R. et al. Chilled Semen of Captive Collared Peccaries (*Pecari tajacu*): effects of Preservation at 17 °C on Semen Quality. **Journal of Agricultural Science and Technology**, p 921-929. 2012.

GLORIA, A. et al. Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. **Animal Reproduction Science**, v. 128, p. 117–122, 2011.

GOBELLO, C.; CORRADA, Y. Biotechnology in canine reproduction: an update. **Analecta Veterinaria**, v. 23, n. 1, p. 30-37, 2003.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª Ed. São Paulo, Roca, 2008.

GRUPEN, C.G. et al. Effect of 6-dimethylaminopurine on electrically activated in vitro matured porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p. 387–396. 2002.

GUIMARÃES, D.A.; et al. Productive and reproductive management of the collared peccary (*Tayassu tajacu*) in captivity. **Revista de Ciências Agrárias**, v.43, p. 1-5, 2005.

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**. 2ª ED – São Paulo – Roca, 2008.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ª Ed. Manole – SP. 2004.

HASSANIN, A.; DELSUC, F.; ROPIQUET, A. *et al.* Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus Biologies**, v. 335, n. 1, p. 32–50, 2012.

HIRAMOTO, Y. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs, **Experimental Cell Research**, v. 27, p. 416–426. 1962.

HULINSKA, P. et al. Efficiency of in vitro fertilization is influenced by the meiotic competence of porcine oocytes and time their maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 112-117, 2011.

JOHNSON, L.A. et al. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 180C. **Journal Animal Science**, v.54, p.132-141, 1982.

KAHWAGE, P.R. et al. Eletroejaculação e características seminais de caititus (*Tayassu tajacu*). In REUNIÃO REGIONAL DA FESBE, III, 2008, Fortaleza-Ce. **Anais...** Fortaleza: FESBE, 2008.

KAHWAGE, P.R., et al. Biometria testicular, eletroejaculação e características seminais de caititus, *Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Artiodactyla, Tayassuidae) mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. **Acta Amazonica**, v.40(4), p. 771 – 778. 2010

KEUROGHLIAN, A; EATON, D. P.; LONGLAND, W. S. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu Pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment. **Biological Conservation**, v. 120, n. 3, p. 411–425, 2004

- KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. 2. ed, New York : Raven Press,., p. 190. 1994.
- LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature reviews/Molecular cell biology**, v. 14, 2013.
- MACHATY, Z.; PEIPPO, J. PETER, A. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. **Theriogenology**, v. 78 p. 937–950. 2012.
- MARTINEZ, E. et al. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 547-557, 1993.
- MAYOR, P. Et al. A health evaluation in a colony of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Research in Veterinary Science**, v. 81, 2006a.
- MAYOR, P; FENECH, M; BODMER, R.E; LOPEZ-BEJAR. Ovarian features of the wild collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the northeastern Peruvian Amazon. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, p. 268-275. 2006b.
- MAYOR, P. et al. Reproductive performance of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Animal Reproduction Science**, v.102, p. 88-97. 2007a.
- MAYOR, P. A.; FITA, D.S.; LÓPEZ BÉJAR, M. Sostenibilidad en la Amazonia y cría de animales silvestres. **Centro de estudios Teológicos de la Amazonía**: Iquitos-Peru. 2007b. 261 p.
- MEERSCHAUT, F. V. et al. Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. **Reproductive BioMedicine Online**. *In press* 2014.
- MEO, S.C.; LEAL, C.L.; GARCIA, J.M. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p.35–46. 2004.
- MONTEIRO, G.A; GUASTI, P.N.; PAPA, F.O.; Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperados da cauda do epidídimo. **Veterinaria e Zootecnia**, v.16, nº3, p. 448-458, 2009.
- MORAES, E.A. et al. Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a qualidade do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1460-1468, 2010.
- NERI, Q.V.A. et al. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection. **Cell Calcium**, v. 55, p. 24–37. 2014.
- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; LAVORENTI, A. O. Manejo do caititu (*Tayassu tajacu*) e do queixada (*T. Pecari*) em cativeiro. In: C. V PADUA; R. E. BODMER; R. Cullen Jr (Eds.); **Manejo e Conservação de vida Silvestre no Brasil**. p.106–115. Brasília: CNPq/Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 1997.

- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; SATO, T.; NOGUEIRA, S. S. C. **A organização social de queixadas (*Tayassu Pecari*) e caíditus (*T. tajacu*) em cativeiro.** 1999.
- NOGUEIRA, S.S.C.; NOGUEIRA-FILHO, S.L.G. Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests? **Biodiversity and Conservation**, v.20, p.1385–1397. 2011.
- NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações como diluidor de sêmen dos mamíferos domésticos. **In: Simpósio Nacional da Reprodução de Mamíferos Domésticos**, Fortaleza. Anais... Fortaleza: SNBRMD, p.57-63. 1995.
- OKADA, K.; MIYANO, T.; MIYAKE, M. Activation of pig oocytes by intracytoplasmic injection of strontium and barium. **Zygote**, v.11, p.159–165. 2003.
- PAULA, V.V. *et al.* Morfologia dos órgãos genitais femininos criados em cativeiro no semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.27, n.2. p.276-277. 2003.
- PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRE, J.; BARITEAU, F. Resultats recents en matiere de technologies de la conservation de la semence de verrat. **Journal Recherche Porcine**, v.19, p.63-78, 1987.
- PEÑA, F.J. *et al.* Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. **Zygote**, v.12, p.117-124, 2004.
- PEREZ, E.G.A. *et al.* Efeito da adição de glutatona na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 262-268, 2012.
- PETERS, R. M.; WELLS, K. D. Culture of pig embryos. **Journal Reproduction and Fertility**, Suppl, v. 48, p. 61-73, 1993.
- PEZZUTI, J.C.B. *et al.* Caça e a pesca no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil. In: Borges, S.H. (Org.). **Janelas para a biodiversidade no Parque Nacional do Jaú: uma estratégia para o estudo da biodiversidade na Amazônia.** Manaus: Fundação Vitória Amazônica. Cap. 14, p. 213-230. 2004.
- RATH, D. Producción *in vitro* de embriones porcinos. *In:* PALMA, G.A. **Biotechnología de la reproducción.** Argentina, p. 651 –652, 2001
- REICHENBACH, H.D.; MORAES, J.C.F.; NEVES, J.P. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P.B.D.*et al.* (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2.ed. São Paulo, Roca: 2008.
- RONDON, R.M.M. *et al.* Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluidor de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, p.848-854, 2008.
- RONDON, R.M.M.*et al.* Perspectivas sobre o uso de antioxidantes na conservação do sêmen de suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.3, p.141-147. 2012.

RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; FELICIANO, A. E. D. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. In: II Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, **Revista da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, p. 248- 253. 2000.

SANTOS, T.C. *et al.* Morfologia dos ovários, tubas uterinas e útero em catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) e queixadas (*Tayassu Pecari*, Link, 1795). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 37, nº 3, 2000.

SANTOS, D.O. Et al. A Criação de Caititus (*Tayassu tajacu*) como alternativa de diversificação de produção e renda na região Cacaueira da Bahia , Brasil. **Memórias: Manejo de Fauna silvestre em Amazonia y Latinoamérica**, p. 247–256, 2007.

SANTOS, E.C.S. et al. Avaliação de diferentes meios na maturação *in vitro* de oócitos suínos. In: XIII ENCONTRO NACIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO. Pelotas, 2011. **Anais...** Pelotas: XIII ENPOS, 2011.

SERRET, C.G. et al. Produção *in vitro* de embriões suínos. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.13, nº.3, p. 285-289, 2007.

SHIRAZI, A. et al. In vitro developmental competence of ICSI derived activated ovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p. 342-348, 2009.

SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, M.V.A.; SARAIVA, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.4. 2010.

SILVA, M.A. et al. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. **Cryobiology**, v. 67, p. 50–55. 2013.

SONNER, J.B. et al. Aspectos macroscópicos e morfométricos dos testículos em catetos e queixadas. **Biota Neotropica**, v.4, p.1-12, 2004.

SOWLS, L.K. Reproduction in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). In: Rowlands IW. **Comparative biology of reproduction in mammals**. London: Zoological Society of London, p.155-172, 1966.

SOWLS, L.K. **The Peccaries**. The University of Arizona Press, Tucson, USA. 1984.

SOWLS, L. K. **Javelinas and other peccaries, their biology, manegement and use**. 2a ed ed. Texas: A&M Universiy Press, 1997.

SUZUKI, M. et al. Successful piglet production by IVF of oocytes matured in vitro using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. **Theriogenology**, v. 65, p. 374-386, 2006.

UEHARA T.; YANAGIMACHI R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. **Biology of Reproduction**, v.15, p.467-470. 1976.

VARGA, E. et al. Parthenogenetic development of in vitro matured porcine oocytes treated with chemical agents. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 226–233. 2008.

WILHELM-FILHO D. Oxigênio, radicais livres de oxigênio e saúde. **Biotemas**, v.7, p.7-18, 1994.

WILSON, D. E.; REEDER., D. M. **Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference**. 3^a.ed. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press, 2005. 2000 p.

WOELDERS H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. **Pigs-Misset**, v.8, p.22-23, 1992

YOSHIOKA, K. et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.112-119, 2002.

4. ARTIGO 1: MATURAÇÃO IN VITRO E ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA DE OÓCITOS DE *Pecari tajacu*.

O artigo segue as normas da revista *Theriogenology* o qual será submetido.

Ana Cássia Sarmiento Ferreira^{a*}, Alessandra Ximenes Santos^a, Nathalia Nogueira da Costa^a, Marcela da Silva Cordeiro^b, Thiago Velasco Guimarães Silva^a, Otávio Mitio Ohashi^a, , Diva Anelie de Araújo Guimarães^a

^a Instituto de Ciências Biológicas, Laboratorio de Reprodução Animal, PA, Brasil

^b Instituto Federal do Pará – Campus Abaetetuba

*Correspondência: Universidade Federal do Pará; Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Reprodução Animal, Pa, Brasil. CEP. 66075-900. Fone +55 91 32017773

Endereço de email: ana.cassia76@gmail.com (A. Ferreira)

Resumo

A espécie *pecari tajacu* representa um potencial zootécnico de grande interesse para a inclusão em programas de criação em cativeiro na Amazônia. O presente trabalho teve como objetivo definir o tempo de maturação *in vitro* de oócitos, e observar a competência dos oócitos para o desenvolvimento após a ativação partenogenética. Foram utilizados 48 fêmeas, que foram anestesiadas e eutanasiadas para coleta dos ovários. Foram selecionados 69 CCOs e divididos em 4 grupos por idade e dois tempos de MIV (36 h e 44 h), após o tempo de MIV foram ativados partenogeneticamente. A progressão meiótica foi analisada em 165 COCs divididos em 4 grupos em três tempos de MIV (30 h, 36 h e 44 h) e conforme a suplementação de hormônios na MIV. Após a ativação partenogenética a taxa de clivagem foi de 47% nos oócitos maturados em 36 h e em fêmeas com idade inferior a 2 anos, em todos os grupos observaram-se clivagens porém não houve diferenças significativas ($P>0,05$) entre eles. Somente no G3 observou-se a presença de blastocisto (15,4%). Na análise da progressão meiótica, em todos os tempos analisados foram encontrados oócitos em MII, as diferenças foram significativas em todos os tempos de MIV, entre aqueles que se apresentavam em VG e MI e ($p<0,01$) e para aqueles que se encontravam em MII ($p<0,05$) e entre VG, MI, e MII ($p<0,05$). No grupo controle (G1), aquele em que o tempo de maturação ocorria totalmente em meio enriquecido com hormônios, não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) com os grupos submetidos aos tratamentos (troca para meio sem hormônio), independente do tempo final de maturação. Os resultados demonstraram que a maturação oocitária *in vitro* de *Pecari tajacu* ocorre em 36 horas e que oócitos submetidos a ativação partenogenética após a MIV iniciaram o desenvolvimento embrionário, o que torna viável a produção de embriões *in vitro* por meio da fertilização *in vitro* e injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Tais resultados podem ser usados como parâmetros a fim de aprofundar pesquisas relacionadas à reprodução assistida nessa espécie, aumentando o seu potencial de produção em cativeiro.

Palavras-chaves: *Pecari tajacu*, maturação *in vitro*, ativação partenogenética, oócitos, reprodução, FIV.

4.1. Introdução

O caititu (*Pecari tajacu*) é uma das espécies mais caçadas na Amazônia, pois representa um importante recurso alimentar [1]. No entanto, na maioria dos casos, a caça de subsistência é realizada sem planejamento sustentável, o que pode levar a diminuição da espécie [2]. Dessa forma, o caititu representa um potencial zootécnico de grande interesse para a inclusão em programas de criação em cativeiro, visando tanto a produção como a conservação [3,4].

O bom desempenho reprodutivo do caititu é um dos aspectos mais importantes no seu manejo em cativeiro. Sendo que o conhecimento da biologia reprodutiva dessa espécie contribui para melhorar a sua produção [4]. A puberdade em fêmeas de caititus ocorre aproximadamente aos sete meses [5]. O ciclo estral nesse animal é do tipo poliestral, ou seja, apresentam ciclos estrais regulares e sucessivos, possui ovulação espontânea e a média do número de folículos ovulados observados em cada ciclo estral, é de $2,3 \pm 0,6$ [6]. Todavia, até o momento, não há informações sobre a produção *in vitro* de embriões nessa espécie, sendo que, essa informação pode auxiliar os programas de manejo clínico da espécie os quais contribuirão para a sua conservação.

A maturação meiótica do oócito *in vivo* ocorre próximo a ovulação, quando o folículo atinge seu diâmetro máximo. Porém, *in vitro* a maturação meiótica inicia-se, imediatamente, após a remoção do oócito do interior do folículo. Os oócitos de mamíferos utilizados na PIV são aspirados do interior de folículos, com diâmetro entre 2 mm e 8 mm, antes da divergência folicular. Esses folículos são utilizados em decorrência do número disponível no ovário, e da dificuldade em se determinar os oócitos que estão capacitados antes da fecundação [7].

Em animais silvestres, há poucos estudos sobre biotecnologias aplicadas a reprodução, apesar de ser um dos aspectos fundamentais para a conservação [8,9]. Em relação a este assunto, é necessário estudar os mecanismos envolvidos na obtenção de oócitos fertilizáveis para se alcançar, posteriormente, a produção *in vitro* (PIV) de embriões. A maturação oocitária se divide em dois estágios: um período de crescimento e um período de preparação nuclear e citoplasmática final, que é pré-requisito para a fertilização e desenvolvimento final [10].

O presente trabalho teve como objetivo definir um protocolo de maturação *in vitro* de oócitos, e determinar o tempo de maturação dos oócitos de fêmeas adultas de caititus, além de observar a competência dos oócitos para o desenvolvimento após a ativação partenogenética.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Animais

Todas as fêmeas, utilizadas nesse trabalho, foram provenientes do criatório científico da Embrapa-Amazônia Oriental (IBAMA 1501.5219/2011). Para a obtenção dos ovários as fêmeas foram previamente anestesiadas com cloridrato de ketamina¹ (5mg/kg) e cloridrato de xilazina² (1mg/kg), e posteriormente eutanasiadas com cloreto de potássio (1 mg/kg). Esse experimento foi submetido ao CEPAE-UFGA (Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará) e aprovado sob número de protocolo 18413.

Para ativação partenogenética a partir de diferentes tempos de maturação oocitária *in vitro* (MIV), foram obtidos os ovários de 26 fêmeas, sendo 06 com idade superior a dois anos e 20 com idade inferior a dois anos.

Para análise da investigação da progressão meiótica foram obtidos ovários de 22 fêmeas todas com idade superior a um ano de idade, Do total de fêmeas utilizadas para análise da progressão meiótica, em quatro fêmeas foram quantificados o número de oócitos recuperados após aspiração folicular em cada ovário.

Após a coleta, os ovários (Figura 1) foram transportados em PBS, para os procedimentos laboratoriais.

Figura 1: Ovários de caititus evidenciando a presença do corpo lúteo (1) e folículos ovarianos (2). Fonte: Arquivo pessoal, 2013.



¹Dopalen-CEVA P002/13; ²Rompum-Bayer P001/12.

4.2.2 Seleção dos complexos cumulus oócitos (COCs)

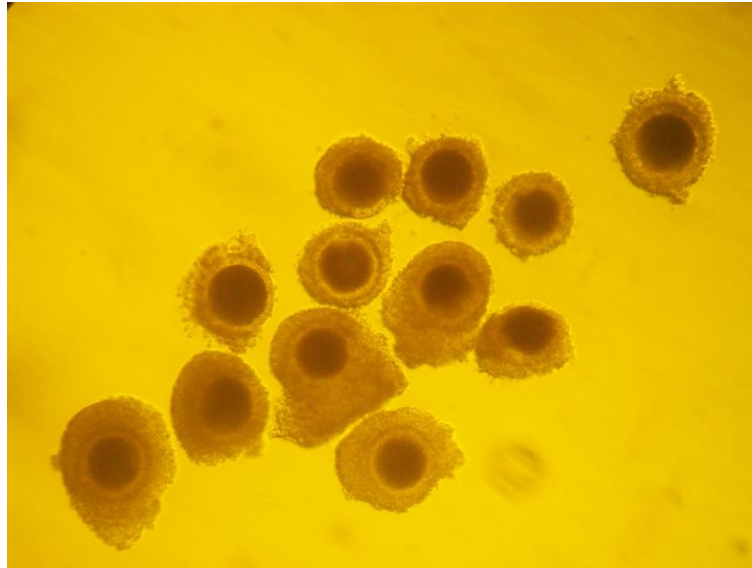
Os complexos *cumulus*-oócito foram obtidos a partir da aspiração dos folículos (2 mm a 8 mm de diâmetro) com auxílio de agulha de 25x8 mm acoplada a seringa de 5mL, e transferidos para uma placa de Petri estéril de poliestireno³. O rastreamento e seleção dos COCs foi realizado com auxílio de estereomicroscópio⁴ sob fluxo laminar, em Meio TCM-199⁵ (tampão Hepes) acrescido 10% de SFB⁶ (v/v), 22µg/mL de piruvato⁷ e 50µg/mL de gentamicina⁸. Foram selecionados os oócitos com células do *cumulus oophorus* compactas e refringentes (Figura 2).

4.2.3 Maturação *in vitro* (MIV)

Em torno de 10-15 COCs/gota selecionados foram lavados e incubados em placas de Petri de poliestireno contendo gotas de 100 µL de Meio de MIV – 199⁹ (tampão bicarbonato de sódio), suplementado com 10% SFB (v/v), 0,5µg/mL FSH¹⁰, 50µg/mL LH¹¹, 22µg/mL de piruvato e 50µg/mL de gentamicina [11], sob óleo mineral¹² por um período de 22 horas. Depois foram transferidos para o meio de MIV, sem adição de hormônios, durante o período restante da maturação conforme o delineamento experimental. A maturação *in vitro* ocorreu em estufa de cultivo com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂, sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5 °C. O tempo de maturação *in vitro* utilizado no presente trabalho foi baseado no tempo de maturação *in vitro* em suínos, uma vez que não há trabalhos na espécie em estudo.

³ Corning 430165, ⁴ Olympus S261, ⁵ Gibco-12340-030; ⁶ Gibco 12657-029; ⁷ Sigma P-5280; ⁸ Sigma G-1264; ⁹ Gibco 11150-059; ¹⁰ folltropin V Bioniche, ¹¹ Lutropin V Bioniche, ¹² Sigma-Aldrich M8410

Figura 2: Oócitos de caititus, selecionados de acordo com a presença de células do *cumulus oophorus* compactas e refrigentes. Fonte: Arquivo pessoal, 2013.



4.2.4 Ativação partenogenética dos COCs

Após os tempos de MIV, 36 e 44 horas respectivamente, os oócitos que apresentavam o *cumulus oophorus* expandidos foram submetidos à ativação partenogenética.

Os COCs foram retirados da placa de MIV e desnudados em hialuronidase¹³ 0,1% até a remoção total das células do *cumulus oophorus*. Após a remoção, foi realizada a seleção dos oócitos quanto a presença ou não do 1º corpúsculo polar.

Os oócitos foram lavados em 100 mL de Meio HEPES e colocados por cinco minutos em placa de petri contendo H-Ionomicina¹⁴. Para a remoção da Ionomicina os oócitos foram lavados em meio H-saturado por 10 minutos e então transferidos para a placa contendo 2% de 6-DMAP¹⁵, onde permaneceram por três horas na estufa de CO₂.

4.2.5 Progressão meiótica dos oócitos maturados in vitro.

Após o tempo de maturação, os COCs foram submetidos a investigação nuclear para verificar a progressão meiótica. Os oócitos foram desnudados com auxílio de pipeta, em meio de MIV contendo 0,1% de hialuronidase, fixados em formol salino e então transferidos para uma gota contendo o corante Hoescht¹⁶, por um período de 10 minutos. Os oócitos corados foram examinados em microscópio de fluorescência para detecção e análise das células em maturação meiótica (MII e liberação do 1º corpúsculo polar).

¹³Sigma H3757, ¹⁴Sigma I0634, ¹⁵Sigma D2629, ¹⁶Sigma 33342

4.2.6 Delineamento experimental

Para o desenvolvimento dos embriões partenogenotos foi realizado o sistema de co-cultivo. O meio de cultivo utilizado foi o Fluido Sintético do Oviduto [12], com modificações. Na placa de MIV, as gotas foram substituídas por 50 µl de meio SOF. Dessa forma os oócitos foram cultivados com as células do *cumulus-oophoro* provenientes da maturação oocitária. Após 48 horas de co-cultivo (D2) foi avaliada a taxa de clivagem embrionária, e após 120 horas (D7) a taxa de blastocisto.

Foram definidos quatro grupos experimentais para maturação *in vitro* e ativação partenogenética. Os grupos foram distribuídos em dois tempos de maturação, conforme o seguinte delineamento:

Grupo 01: COCs maturados em 36 horas – Idade superior a dois anos

Grupo 02: COCs maturados em 36 horas – Idade inferior a dois anos

Grupo 03: COCs maturados em 44 horas – Idade superior a dois anos

Grupo 04: COCs maturados em 44 horas – Idade inferior a dois anos

Para análise da progressão meiótica foram definidos quatro grupos experimentais, a partir de oócitos provenientes de 22 fêmeas. Para cada grupo foram realizadas três repetições. Os grupos foram distribuídos em dois tempos de maturação, conforme o seguinte delineamento:

Grupo I (controle): COCs cultivados em meio de MIV com FSH e LH por 36 horas.

Grupo II: COCs cultivados em meio de MIV com FSH e LH, por 22 horas, e transferidos para o meio de MIV sem FSH e LH por 8 horas. Tempo de maturação 30 horas.

Grupo III: COCs cultivados em meio de MIV com FSH e LH por 22 horas e transferidos para o meio de MIV sem FSH e LH por 14 horas. Tempo de maturação 36 horas.

Grupo IV: COCs cultivados em meio de MIV com FSH e LH por 22 horas e transferidos para o meio de MIV sem FSH e LH por 22 horas. Tempo de maturação 44 horas.

4.2.7 Análise estatística

Para a análise da ativação partenogenética dos oócitos, foi utilizado o teste exato de Fisher. Para análise do desenvolvimento embrionário foi aplicado o teste ANOVA one-way. Para a análise da progressão meiótica foi utilizado o teste ANOVA, com nível de significância de 5%. Havendo diferença significativa entre os grupos foi aplicado o pós-teste de Tukey. O programa utilizado foi o Biostat 5.3 [13]

4.3 Resultados

O número de oócitos e sua classificação após aspiração em quatro fêmeas estão representados na tabela 01.

Tabela 01: Classificação de oócitos obtidos em 04 fêmeas de *Pecari tajacu*

Fêmeas	COC	Desnudos	Semi-desnudos	Expandidos	Degenerados
01	05	16	02	02	03
02	06	10	0	05	07
03	02	3	0	0	07
04	02	16	04	0	11
X \pm DP	3,75 \pm 2,1	11,25 \pm 6,2	1,5 \pm 1,9	2,3 \pm 2,5	7 \pm 3,6

Os resultados mostraram que após a ativação foi possível observar clivagens e desenvolvimento até o estágio de blastocisto com os dados estão apresentados na tabela 02.

Tabela 02: Análise do desenvolvimento embrionário dos oócitos de caítilus maturados *in vitro*, em diferentes tempos e idades, após ativação partenogenética.

Grupos	Número de oócitos	Clivagens (%)	Blastocisto (%)	Não clivados (%)
G1(36 h >2 anos)	14	2 (14,3) ^{a,A}	0 ^{a,A}	12 (85,7) ^{a,B}
G2 (36 h <2 anos)	19	9 (47,3) ^{a,A}	0 ^{a,B}	10 (52,6) ^{a,A}
G3 (44 h >2 anos)	13	4 (30,8) ^{a,A}	2 (15,4) ^{a,A}	9 (69,2) ^{a,B}
G4 (44 h <2 anos)	23	10 (43,5) ^{a,A}	0 ^{a,A}	13 (56,5) ^{a,B}

^a letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) - $P = 0,66$ (clivagens), $p = 0,39$ (não clivados), $p = 1,0$ (blastocisto).

^{A,B} letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,01$)

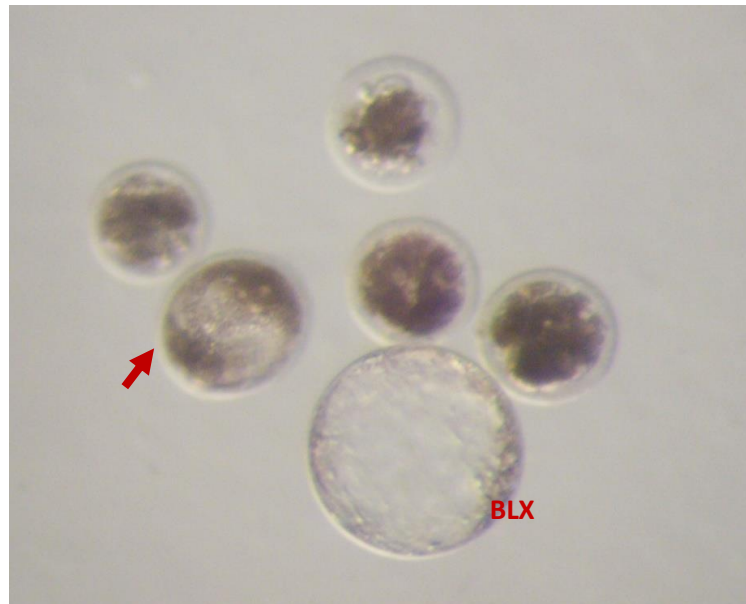
Conforme observado na tabela 02, a melhor taxa de clivagens no 2º dia do desenvolvimento foi no G2, com tempo de maturação de 36 horas e com idade inferior a dois anos. Ao analisar os diferentes grupos não foi observado diferença significativa no percentual de clivagens ($P > 0,05$), ao se comparar os tempos de MIV e a idade das fêmeas analisadas.

Em todos os grupos foram observados elevados percentuais de oócitos que não clivaram após ativação, porém esses dados também não se mostraram significativos entre os grupos ($P > 0,05$).

Ao se analisar o 7º dia, observou-se que somente no G3, cujos oócitos foram maturados em 44 horas e em fêmeas com idade superior a dois anos, o desenvolvimento progrediu até o estágio de blastocisto (Figura 3).

Ao se analisar cada grupo é possível observar diferenças significativas ($p < 0,01$) entre o número de oócitos ativados, as taxas de clivagens e blastocisto. O número de oócitos que não sofreram clivagens foram superiores ao que iniciaram o desenvolvimento em todos os grupos.

Figura 3: Embriões de caititus visualizados no 7º dia, após ativação partenogenética, evidenciando o estágio inicial de blastocisto (seta) e expandido (BLX). Fonte: Arquivo pessoal, 2013



Os resultados da investigação nuclear para análise da progressão meiótica nos oócitos de *Pecari tajacu* estão expressos na tabela 03:

Tabela 03: Progressão meiótica em oócitos de caititus, em diferentes tempos de MIV.

Tempo de MIV	Oócitos fixados	VG	MI	MII	DEG	SV
G1 -36 h	29	0 ^{A,a}	2 ^{A,a} (7%)	15 ^{A,b} (51,7%)	0 ^{A,a}	12 ^{A,a} (41,4%)
G2 -30 h	23	0 ^{A,a}	1 ^{A,a} (4,3%)	12 ^{A,b} (52,2%)	0 ^{A,a}	10 ^{A,a} (43,5%)
G3-36 h	51	4 ^{A,a} (7,8%)	2 ^{A,a} (4%)	26 ^{A,b} (51%)	0 ^{A,a}	19 ^{A,a} (37,3%)
G4-44 h	34	0 ^{A,a}	2 ^{A,a} (6%)	18 ^{A,b} (53%)	10 ^{A,a} (29,4%)	4 ^{A,a} (11,8%)

Letras maiúscula diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$)

VG – vesícula germinativa; MI - Metáfase I; MII - Metáfase II; SV – sem visualização; DEG - degenerados.

Na tabela 03 quando se comparou as progressões meióticas (MI – MII) entre os diferentes tempos de maturação, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Em todos os grupos foram observados oócitos em metafase II (MII) e com a extrusão do 1º corpúsculo polar (figura 4), caracterizando a maturação nuclear.

O G4 foi o grupo com maior tempo de MIV, e apesar da presença das MII, a grande maioria encontrava-se fragmentada e alguns oócitos estavam em processo de degeneração (29,4%).

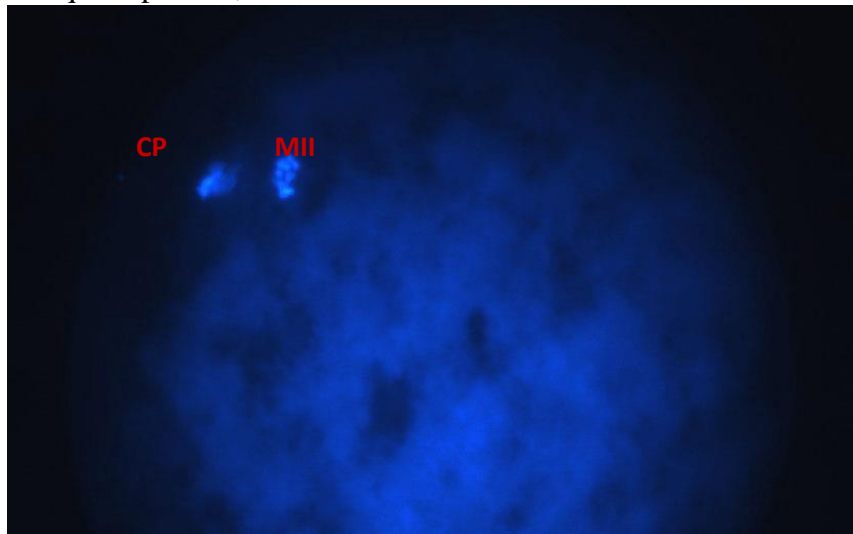
Outro aspecto relevante é que o grupo controle (G1), aquele em que o tempo de maturação ocorria totalmente em meio enriquecido com hormônios, não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) com os grupos submetidos aos tratamentos (troca para meio sem hormônio), independente do tempo final de maturação.

Em todos os grupos foram observados alguns oócitos em MI com a ausência do 1º corpúsculo polar e somente no G3 observou-se oócitos em estágio de vesícula germinativa.

Ao analisar as progressões meióticas em cada grupo, observou-se diferenças significativas em todos os tempos de MIV, entre aqueles que se apresentavam em VG e MI e ($p < 0,01$) e para aqueles que se encontravam em MII ($p < 0,05$) e entre VG, MI, e MII ($p < 0,05$).

Os oócitos sem visualização foram aqueles em que não foi possível fazer uma análise meiótica devido a problemas de fixação, coloração, rompimento ou perda da célula durante a montagem da lâmina.

Figura 4: Oócito de caaitu maturado *in vitro*-36 horas, visualizado por imunofluorescência, após coloração em Hoesch 33342, evidenciando a MII e 1º CP. Aumento 400X. Fonte: Arquivo pessoal, 2013.



4.4. Discussão

No presente estudo, foi possível observar que, durante a seleção dos COCs para a MIV, a maioria dos oócitos $11,25 \pm 6,2$ encontravam-se desnudos após a punção, enquanto somente $3,75 \pm 2,1$ oócitos apresentavam células do *cumulus oophoro* compactas. Esse fato pode estar relacionado a degeneração predominante de folículos secundários e antrais em caaitus, ocasionado pela atresia folicular, que pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular ou pela luteinização das células da camada da granulosa e da camada da teca. [14]

Os resultados mostraram que oócitos em metáfase II foram visualizados a partir de 30 horas de maturação *in vitro*. Porém no tempo de 36 horas os oócitos em MII, com a extrusão do 1º corpúsculo polar se apresentavam em maior número e mais bem visualizados. Não há relatos referente à maturação *in vitro* na espécie *Pecari tajacu*, porém em suínos Santos et al. (2011) [15], observaram que após 48 horas de MIV em TCM-199 48% dos oócitos encontravam-se em MII. Seong Sung et al. (2012) [16], no tempo de 44 horas de MIV observaram a taxa de até 88% dos oócitos em MII.

Segundo Seong sung et al. (2012) [16], em suínos (*Sus domesticus*) um dos maiores obstáculos à essa técnica inclui imprecisão na MIV, uma vez que o baixo desenvolvimento competente de oócitos maturados *in vitro* pode ser causado pela maturação citoplasmática inapropriada, mesmo ocorrendo maturação nuclear. Esses autores utilizaram o antioxidante resveratrol, em diferentes concentrações, na maturação e observaram metáfase II em mais de 80% dos oócitos analisados, após 44 horas de MIV, e acima de 90% de clivagem e 60% de blastocisto, após ativação partenogênica. Em búfalos, ao analisarem a cinética da maturação

nuclear *in vitro* em diferentes tempos de maturação observaram taxas de MII que variaram de 22,5% no tempo de 14 horas a 74,9% em 32 horas em meio enriquecido com hormônios [17].

Ao se observar as condições de MIV, no presente trabalho não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) entre o grupo controle, em que os oócitos foram cultivados durante todo o tempo de maturação em meio contendo hormônios, para aqueles em que ocorreu a troca para o meio sem hormônio após 22 horas de maturação. Porém o maior número de MII foi observado no G3 no tempo de 36 horas de MIV. A remoção do suplemento hormonal do meio de maturação a partir de 20 horas de cultivo, aumentam as taxas de formação do pró-núcleo masculino em oócitos de suínos [18].

Através da ativação partenogenética de oócitos de caítus, em diferentes tempos de maturação, foram obtidas taxas significativas de embriões clivados em todos os grupos analisados. Esse aspecto mostra que a idade não foi um fator limitante, apesar das fêmeas mais novas (< dois anos) apresentarem as melhores taxas de clivagens (47,3% em 36 horas e 43,5% em 44 horas de MIV). Essas taxas foram inferiores às observadas em suínos [19], os autores citados ativaram oócitos com agentes químicos isolados e combinados, obtendo as seguintes taxas cloreto de estrôncio (53%), 6-DMAP + estrôncio (49%) e ciclohexamina + estrôncio (54,3%). Entretanto a maioria dos embriões também pararam o desenvolvimento em estágio de 2-4 células. Embriões suínos cultivados em meio NCSU-23 apresentaram taxas de 77% de clivagens e 39,4% de blastocistos [20], apesar da elevada taxa de clivagem a maioria dos embriões desenvolveu até o estágio de 2-4 células, ocorrendo a parada no desenvolvimento. Um fator limitante para o cultivo dos embriões suínos, é o desenvolvimento até o estágio de quatro células. Considera-se que esse fato ocorra por condições inadequadas de cultivo, e que coincida com o tempo das primeiras ativações do genoma embrionário. [21]

Em dromedários (*Camelus dromedarius*), as taxas de clivagens (74%) e blastocisto (32%) foram superiores quando se utilizou a combinação de estímulo elétrico com 6-DMAP [22]

Os resultados demonstraram que a maturação oocitária *in vitro* de *Pecari tajacu* ocorre em 36 horas. Sendo que esses os oócitos iniciaram o desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética. Portanto, viáveis para produção de embriões *in vitro* por meio da fertilização *in vitro* e injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Os resultados aqui observados podem ser usados como parâmetros a fim de aprofundar pesquisas relacionadas à reprodução assistida nessa espécie, aumentando o seu potencial de produção *ex situ* e contribuindo para os programas de conservação *in situ*.

Referências Bibliográficas

1. BODMER, R.E., ROBINSON, J.G. Evaluating the sustainability of hunting in the neotropics, In: SILVIUS, K.M. BODMER, R.E.; FRAGOSO, J.M.V. (Ed.), **People in Nature: Wildlife Conservation in South and Central America**. New York : Columbia University Press, New York, p. 299–323. 2004.
2. DESBIEZ, A.L.J. et al. Avaliação do risco de extinção do cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v.3, 74–83. 2012.
3. SOWLS, L.K. **The Peccaries**. The University of Arizona Press, Tucson, USA. 1984.
4. MAYOR, P. A.; FITA, D.S.; LÓPEZ BÉJAR, M. Sostenibilidad en la Amazonia y cría de animales silvestres. **Centro de estudios Teológicos de la Amazonía: Iquitos-Peru**. 261 p., 2007b.
5. NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.G. ; NOGUEIRA, S.S. DA C. Captive breeding programs as an alternative for wildlife conservation in Brazil, in: Silvius, K.M., Bodmer, R., Fragoso, J.M.V. (Eds.), **People and Nature: Wildlife Conservation in South and Central America**. Columbia University Press, NEW YORK, USA, pp. 171–190. 2004
6. MAYOR, P; FENECH, M; BODMER, R.E; LOPEZ-BEJAR. Ovarian features of the wild collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the northeastern Peruvian Amazon. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, p. 268-275. 2006b
7. GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª Ed. São Paulo, Roca, 2008.
8. FICKEL, J.; WAGCHER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research.**, v.53, p. 81-89, 2007.
9. ANDRABI, S.M.H; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction science**, v.99, 2007.
10. HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ª Ed. Manole – SP. 2004.
11. LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 1994.
12. TERVIT, H.R; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 30, p.493-497, 1972.
13. AYRES, M. et al. **Biostat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e biomédicas**. Versão 5.3, Sociedade Civil Mamirauá, MCT – Cnpq, 5ª Ed. 2007.
- 14.
15. GUIMARÃES, D.A. et al. Ovarian folliculogenesis in collared peccary, *Pecari tajacu* (Artiodactyla: Tayassuidae). **Revista Biologia Tropical**, v. 60 (1), p. 437-445, 2012.

16. SANTOS, E.C.S. et al. Avaliação de diferentes meios na maturação *in vitro* de oócitos suínos. In: XIII ENCONTRO NACIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO. Pelotas, 2011. **Anais...** Pelotas: XIII ENPOS, 2011.
17. SEONG-SUNG, K. et al. The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 78, p. 86-101. 2012.
18. SANTOS, S.S.D. et al. Cinética da maturação *in vitro* de oócitos bubalinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.39, nº5, p.266-270, 2002.
19. FUNAHASHI, H. et al. Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. **Theriogenology**, v.41, p.425-1 433, 1994.
20. VARGA, E. et al. Parthenogenetic development of in vitro matured porcine oocytes treated with chemical agents. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 226–233. 2008.
21. NANASSY, L.O. et al. Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.104, p. 264–274. 2008.
22. SERRET, C.G. et al. Produção *in vitro* de embriões suínos. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.13, nº.3, p. 285-289, 2007.
23. KHATIR, H.; ANOUASSI, A.; TIBARY, A. *In vitro* and *in vivo* developmental competence of dromedary (*Camelus dromedarius*) oocytes following *in vitro* fertilization or parthenogenetic activation. **Animal Reproduction Science**, v.113, p. 212–219, 2009.

5. ARTIGO 2: AÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM MEIOS DE RESFRIAMENTO E CONGELAÇÃO EM ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE *Pecari tajacu*.

O artigo foi submetido a revista *Theriogenology* conforme suas normas técnicas.

Ana Cássia Sarmiento Ferreira^{a*}, Agatha da Silva Botelho^a, Natalia Inagaki de Albuquerque^b, Otávio Mitio Ohashi^a, Diva Anelie de Araújo Guimarães^a

^a Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Reprodução Animal, PA, Brasil

^b Embrapa- Amazônia oriental - CPATU

*Correspondência: Universidade Federal do Pará; Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Reprodução Animal, Pa, Brasil. CEP. 66075-900. Fone +55 91 32017773

Endereço de email: ana.cassia76@gmail.com (A. Ferreira)

Resumo

A recuperação de espermatozoides viáveis do epidídimo e a sua criopreservação também pode ser utilizada para a preservação de germoplasma de espécies silvestres e domésticas de alto valor genético, como o *Pecari tajacu*. O presente trabalho teve como objetivo definir um protocolo de criopreservação de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de *Pecari tajacu*, utilizando diferentes diluidores e a ação da GSH na célula espermática durante a criopreservação. Foram utilizados 09 machos adultos, que foram sedados e sacrificados para a remoção da cauda do epidídimo, sob a aprovação do CEPAE/UFPA. A cauda do epidídimo foi aspirada para remoção dos espermatozoides os quais foram adicionados em Tris-frutose e ACP 120 contendo 20% de gema de ovo, que então distribuídos em 7 grupos (G1-controle, G2 – resfriado/4 h, G3-resfriado/24 h, G4 – resfriado com GSH/4 h, G5 – resfriado com GSH/24 h, G6-congelado em 5% de glicerol. G7- congelado em 5% de glicerol e GSH. Em todos os grupos foram analisados a motilidade, vigor e viabilidade. A concentração espermática após diluição foi de $22,1 \times 10^6$ mL, a motilidade obtida *a fresco* em tris-frutose e ACP-120 foi de 78% e 82%, respectivamente, o vigor 3 e a viabilidade média dos espermatozóides de $79 \pm 24,5$ no Tris-frutose e $82 \pm 4,5$ no ACP- 120. Na criopreservação dos espermatozoides foi observado queda nos parâmetros analisados nos dois diluidores em todos os grupos. No G2, G3, G4 e G5, as taxas de motilidade e viabilidade foram superiores no ACP-120 ($> 50\%$) e no G6 e G7 as melhores taxas foram no diluidor Tris-frutose, apesar do decréscimo acentuado na motilidade e viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento. A motilidade e viabilidade apresentaram correlações positivas nos grupos tratados com GSH tanto no tris-frutose G4 ($r= 0,86$), G5 ($r= 0,82$) e G7 ($r= 0,42$) quanto no ACP-120 G4 ($r= 0,69$), G5 ($r= 0,47$) e G7 ($r= 0,99$). Esses dados mostraram que espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de *Pecari tajacu* podem ser criopreservados e que a presença da glutatona não interferiu na preservação dos espermatozoides. .

Palavras-chaves: criopreservação, espermatozoides, epidídimo, *Pecary tajacu*, glutatona, glicerol.

5.1 Introdução

O processamento tecnológico do sêmen objetiva aumentar o número de fêmeas fertilizadas com um único ejaculado, além de conservar a capacidade fertilizante do espermatozoide, seja por um período determinado, através do resfriamento, ou por período indeterminado, pela técnica de congelamento de sêmen [1].

Em animais silvestres a colheita de sêmen por eletroejaculação tem sido amplamente empregada, principalmente em carnívoros, primatas e cervídeos [2]. Em caititus (*Pecari tajacu*), o método mais empregado é da eletroejaculação [3]. O volume total do ejaculado em caititus, colhido por essa técnica, foi $0,8 \pm 0,8$ mL, com concentração espermática de $138,1 \pm 154,1 \times 10^6$ spz/mL, motilidade de $52,8 \pm 29,1\%$, vigor médio de $2,1 \pm 0,8$ e a viabilidade de $63,7 \pm 34,3\%$ [4].

No entanto, a recuperação de espermatozoides viáveis do epidídimo e a sua criopreservação também pode ser utilizada para a preservação de germoplasma de espécies silvestres e domésticas de alto valor genético. Por meio dessa técnica o número total de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo é superior ao verificado com sêmen obtido por vagina artificial [5]. Diversos métodos de recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo têm sido descritos, tais como: aspiração [6], flutuação [7], fluxo retrógrado da cauda [8].

O método de recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo tem sido utilizado em algumas espécies, tais como: ratos [9]; suínos [10]; cães [11]; equinos [5]; bovinos [12]; primatas [13]; cutias [14].

Um fator limitante no processo de resfriamento, congelamento e descongelamento de espermatozoides é o estresse físico e químico na membrana celular, que reduz a sua viabilidade e capacidade de fertilização [15]. O choque frio nos espermatozoides está associado com a indução do estresse oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). A glutathione (GSH) é um tripeptídeo distribuído em células vivas com importante papel em mecanismos de defesa intracelular contra o estresse oxidativo [16]. A GSH é utilizada pela glutathione peroxidase (GPX) para reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água, formando a GSSH que posteriormente é reduzida a GSH [17]. Suas funções celulares são o transporte de aminoácidos, síntese proteica, redução da cadeia dissulfeto e proteção contra o estresse oxidativo [18].

Dessa forma, essa pesquisa objetivou definir um protocolo de criopreservação de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de *Pecari tajacu*, utilizando diferentes diluidores e a ação da GSH. Assim é proposto que tais substâncias minimizem os efeitos

causados pelo frio e aumentem o potencial fertilizante dos espermatozoides na espécie em estudo.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 *Coleta dos epidídimos*

Os epidídimos foram obtidos a partir de nove machos adultos, com idade entre um aos três anos, provenientes do criatório científico (IBAMA-PA 1501.5219/2011) da Embrapa Amazônia Oriental.

Os animais foram previamente anestesiados com ketamina¹ (5mg/kg) e xilazina² (1 mg/kg) e eutanasiados com cloreto de potássio (1 mL/kg). Este trabalho foi aprovado pelo CEPAE-UFPA (Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará) - protocolo 18413.

Após detectada a morte do animal, foi realizado a incisão na bolsa escrotal e exposição dos testículos e epidídimos. Após a remoção os epidídimos foram lavados em PBS e imediatamente transportados em caixas térmicas com gelo até o laboratório.

5.2.2 *Coleta de espermatozoides a partir da cauda do epidídimo*

Os epidídimos foram dissecados em capela de fluxo laminar para a remoção das túnicas que recobrem o testículo e epidídimo, e exposição da cauda (Figura 1). Para a obtenção dos espermatozoides, foi adotada a técnica de recuperação da cauda do epidídimo [5]. Nesse procedimento, a cauda foi colocada em placa de Petri e então perfurada com agulha 13 x 4,5 mm, acoplada a seringa de 3 mL, com PBS previamente aquecido a 37° C. As amostras foram pré-diluídas em 500 µl de PBS e então centrifugadas visando diminuir os detritos celulares.

5.2.3 *Análise dos parâmetros espermáticos*

Após a pré-diluição em PBS e centrifugação, foram adicionados 2 mL de diluidor no pellet contendo os espermatozoides, sendo em seguida homogeneizado e imediatamente avaliados

¹Dopalen-CEVA P002/13; ²Rompum-Bayer P001/12.

Figura 1: Testículo de *Pecari tajacu* dissecado para a remoção da cauda. Fonte: Arquivo pessoal, 2014.



Foram analisados a motilidade e o vigor, retirando 30 μ l do pellet contendo os espermatozoides e colocando sob lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C. Para análise da viabilidade, foram novamente retirados 30 μ l do pellet, adicionados em uma lâmina pré-aquecida com 30 μ l de corante supravital (eosina), e contadas 100 células em microscópio óptico com magnificação de 400X.

Para a determinação da concentração espermática, 30 μ l da solução foi adicionada à câmara de Neubauer, onde foram contados cinco quadrantes contendo espermatozoides e adicionados a fórmula para determinação da concentração. Os parâmetros espermáticos foram avaliados imediatamente após a diluição, após o processo de resfriamento e aquecimento e após o descongelamento das amostras armazenadas em nitrogênio líquido.

5.2.4 Adição de diluidores

Foram utilizados os diluidores Tris-Frutose (3,028g TRIS, 1,78g ácido cítrico monohidratado e 1,25g de frutose) e ACP 120 - (meio de criopreservação de sêmen de *Pecari tajacu*²) nos quais foram acrescidos 20% de gema ovo e gentamicina.

Foram divididas 5 alíquotas de 2 mL para cada diluidor e então adicionados o pellet contendo os espermatozoides. Nos grupos submetidos ao resfriamento as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C por 4 e 24 horas respectivamente. Nas amostras submetidas ao congelamento foi adicionado 5% de glicerol e então envasados em palhetas de 0,25mL, mantidas sob refrigeração a 4°C, por um período de 4h. Após o tempo de equilíbrio, as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido por 15 minutos, submersas em nitrogênio a -196°

² Biotecnologia/ Fortaleza-Ce

C e armazenadas no contêiner, onde permaneceram pelo tempo mínimo de uma semana até o descongelamento.

5.2.5 *Delineamento experimental*

Diluidor 1: Tris-frutose

G1 (controle): Espermatozóides diluídos em Tris-frutose, acrescido de 20% de gema de ovo.

G2: Espermatozóides diluídos com Tris-frutose, acrescido de 20% de gema de ovo, refrigerado a 4°C por 4 horas.

G3: Espermatozóides diluídos com Tris-frutose, acrescido de 20% de gema de ovo, refrigerado a 4°C por 24 horas.

G4: Espermatozóides diluídos com Tris-frutose, acrescido de 20% de gema de ovo + 10 mM de glutatona³ (GSH), refrigerado a 4°C por 4 horas.

G5: Espermatozóides diluídos com Tris-frutose, acrescido de 20% de gema de ovo + 10 mM de glutatona (GSH), refrigerado a 4°C por 24 horas.

G6: Espermatozóides diluídos com Tris-frutose, acrescido de 20% de gema de ovo + 5% de glicerol, congelados em nitrogênio líquido.

G7: Espermatozóides diluídos com Tris-frutose, acrescido de 20% de gema de ovo + 5% de glicerol + 10 mM de glutatona (GSH), congelados em nitrogênio líquido.

Diluidor 2: ACP 120

G1 (controle): Espermatozóides diluídos em ACP-120 acrescido de 20% de gema de ovo.

G2: Espermatozóides diluídos em ACP-120 acrescido de 20% de gema de ovo, refrigerado a 4°C por 4 horas.

G3: Espermatozóides diluídos em ACP-120 acrescido de 20% de gema de ovo, refrigerado a 4°C por 24 horas.

G4: Espermatozóides diluídos em ACP-120 acrescido de 20% de gema de ovo + 10 mM de glutatona (GSH), refrigerado a 4°C por 4 horas.

G5: Espermatozóides diluídos em ACP-120 acrescido de 20% de gema de ovo + 10 mM de glutatona (GSH), refrigerado a 4°C por 24 horas.

³ Sigma G6013 5G

G6: Espermatozóides diluídos com ACP-120 acrescido de 20% de gema de ovo + 5% de glicerol, congelados em nitrogênio líquido.

G7: Espermatozóides diluídos com ACP- 120 acrescidos de 20% de gema de ovo + 5% de glicerol + 10 mM glutathiona (GSH), congelados em nitrogênio líquido.

5.2.6 Aquecimento e descongelamento e análise dos espermatozóides

Para os grupos submetidos ao resfriamento após o tempo de equilíbrio, as amostras foram retiradas do refrigerador e aquecidas por cinco minutos na estufa de CO₂. Para os grupos submetidos ao congelamento as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 30 segundos e então submetidas às análises microscópicas. Para análise da motilidade e vigor foram retirados com auxílio de pipeta 30 µl do conteúdo e colocado sob lâmina e lamínula previamente aquecidas e analisadas sob magnificação de 400X. Para análise da viabilidade, foi retirado 30 µl da amostra contendo os espermatozoides e corados com eosina sob lâmina e lamínula, foram contadas 100 células em microscópio com magnificação de 400 X.

5.2.7 Análise estatística

Os parâmetros seminais foram expressos em média e desvio padrão. Para análise dos parâmetros em cada diluidor e ação de antioxidantes no resfriamento e congelamento foi aplicado o teste ANOVA one-way, com nível de significância de 5% e 1%. Para os dados que apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$ ou $0,01$) foi aplicado o teste de Tukey. Para comparação dos parâmetros nos dois diluidores utilizou-se o teste *t* para amostras independentes. E a relação de dependência entre motilidade e viabilidade, nos grupos tratados com antioxidante, foi utilizada a regressão linear simples. O programa utilizado foi o Biostat 5.3 [19]

5.3 Resultados

A motilidade, o vigor e a viabilidade foram observados após a diluição a fresco e após a criopreservação. A concentração, após a diluição, foi de $22,1 \times 10^6$ mL. A média de motilidade obtida *a fresco* em tris-frutose e ACP-120 foi de 78% e 82%, respectivamente. Porém observou-se que a motilidade decresceu nos grupos submetidos a criopreservação, nos dois diluidores conforme exposto na tabela 01. O mesmo foi observado para os parâmetros vigor e viabilidade.

Nas amostras diluídas em Tris-frutose, o G1 não apresentou diferença significativa para a motilidade em relação ao G2 ($P > 0,05$). No entanto, para todos os outros grupos os dados comprovaram diferença significativa em nível de 5 e 1%, G3 ($P < 0,05$), G4, G5, G6 e G7 ($p < 0,01$). Entre os grupos G2, G3, G4, G5, G6 e G7 os dados não evidenciaram diferenças significativas ($p > 0,05$), mesmo aqueles que foram tratados com o antioxidante GSH. No G6 e G7, após o descongelamento, a motilidade reduziu consideravelmente em comparação ao G1 (controle) e aos grupos G3, G4 e G5, especificamente no grupo tratado com a glutathione (G7).

Foi possível observar que os espermatozoides encontravam-se vivos, alguns apresentando movimento progressivo (G1 a G5) e poucos sem movimento progressivo (G6 e G7).

Nas amostras diluídas em ACP-120, o G1 apresentou diferença significativa para a motilidade em relação ao G2 e G3 ($p < 0,01$), no G4 e G5 ($p < 0,05$), e nos grupos do congelamento G6 e G7 ($p < 0,01$). Entre o G2 e G3, onde os espermatozoides foram resfriados sem o antioxidante GSH, e no G4 e G5 que continham GSH foi observado diferença altamente significativa ($p < 0,01$). Vale ressaltar que o G2 e G4, resfriados por 4 horas, não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$), ou seja, a presença da glutathione não interferiu na motilidade dos espermatozoides.

Em relação aos grupos G6 e G7, os espermatozoides recuperados ou não apresentavam motilidade (G6) ou apresentavam motilidade muito baixa (G7). Porém, nesse último grupo foi possível observar espermatozoides vivos, mas sem movimento progressivo (vigor), após o descongelamento. Esses dados mostram que a presença da glutathione nos grupos de congelamento não interferiu na preservação dos espermatozoides.

Tabela 01: Parâmetros microscópicos de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de *Pecari tajacu*, diluídos em Tris-Frutose e ACP-120 e submetidos à criopreservação.

		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
		Fresco	Resfriado 4h	Resfriado 24 h	Resfriado 4h + GSH	Resfriado 24 h + GSH	Congelado 5% Gli	Congelado 5% Gli + GSH
Tris-Frutose	Motilidade (%)	78 ± 5,0 ^{A,a}	43 ± 20,6 ^{A,a,b}	33 ± 23,6 ^{A,b,c}	28 ± 25 ^{A,b,c}	15 ± 19,1 ^{A,b,c}	15 ± 5,8 ^{A,b,c}	4 ± 5 ^{A,b,c}
	Vigor	3 ± 0 ^a	2 ± 1,3 ^{a,b}	2 ± 1,0 ^{a,b}	2 ± 1,5 ^{a,b}	2 ± 1,5 ^{a,b}	0 ^b	0 ^b
	Vivos	79 ± 24,5 ^{A,a}	56 ± 12, ^{A,a,c}	41 ± 27,5 ^{A,a,c}	45 ± 11,2 ^{A,a,c}	33 ± 29, ^{1A,b,c}	33 ± 9,2 ^{A,b,c}	29 ± 4,0 ^{A,b,c}
ACP-120	Motilidade (%)	82 ± 4,5 ^{A,a}	50 ± 18,7 ^{A,b}	12 ± 13 ^{A,c}	54 ± 16,7 ^{A,b}	18 ± 13 ^{A,c}	0 ^{A,c}	3 ± 5,8 ^{A,c}
	Vigor	3 ± 0,4 ^a	2 ± 0,8 ^a	0 ± 0,9 ^b	2 ± 0,5 ^a	1 ± 0,8 ^{b,c}	0 ^{b,c}	0 ^{b,c}
	Vivos	66 ± 9,5 ^{A,a}	53 ± 17,8 ^{A,a}	36 ± 15,7 ^{A,a,b}	56 ± 12 ^{A,a}	37 ± 17,8 ^{A,a,c}	18 ± 14,7 ^{A,b,c}	14 ± 24 ^{A,b,c}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), pelo teste anova e pós-teste de Tukey. Gli: glicerol; GSH: glutatona.
Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para as amostras independentes (teste-T).

A viabilidade espermática também foi analisada, e conforme exposto na tabela 01, no diluidor tris-frutose, no G1, de 100 células contadas em cada animal, uma média de $79 \pm 24,5$ espermatozoides encontravam-se viáveis. Após a criopreservação, tanto nos grupos submetidos ao resfriamento e congelamento, observou-se um decréscimo de espermatozoides vivos, sendo esse decréscimo na viabilidade significativo em alguns grupos. No G1 observou-se diferença significativa em relação ao G5 ($p < 0,05$), e nos grupos do congelamento, G6 e G7 ($p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente). Entre o G6 e G7 não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$), e o número de espermatozoides mortos foi superior ao de vivos, incluindo o grupo tratado com glutathione, o que comprova lesão na membrana dos espermatozoides submetidos a criopreservação.

No que diz respeito à viabilidade dos espermatozoides submetidos ao ACP-120, apesar do decréscimo no número de espermatozoides vivos entre o G1 e os grupos submetidos a criopreservação, foi observado diferença altamente significativa apenas com o G6 e G7 ($p < 0,01$). Da mesma forma, ao se analisar os grupos submetidos ao resfriamento (G2 ao G5), não se observou diferenças significativas ($p > 0,05$). Entre o G2, G3, G4, G6 e G7 as diferenças foram altamente significativas ($p < 0,01$). O G5 nos quais os espermatozoides foram resfriados na presença de glutathione em tempo de equilíbrio de 24 horas, não diferiu significativamente para os grupos submetidos ao congelamento (G6 e G7). Observou-se que a viabilidade dos espermatozoides diluídos em ACP-120 decai a partir de 4 horas de resfriamento e após o congelamento a -196°C , não sendo o ACP-120 apropriado para a criopreservação de espermatozoides epididimários.

Os parâmetros espermáticos também foram comparados entre os dois diluidores e em todos os grupos analisados não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$), inclusive nos grupos tratados com GSH, conforme observado na tabela 01.

A motilidade tanto no G1 quanto no G2 e G4 nas primeiras 4 horas foi superior no ACP-120. No G4 tratado com antioxidante (GSH) a motilidade foi superior, porém, não significativa. Nos dois tratamentos (G3 e G5) independente do diluidor, a motilidade diminuiu após 24 horas de equilíbrio, apesar de não significativa ($p > 0,05$). Para os grupos do congelamento (G6 e G7), ao se comparar os dois diluidores, observou-se que os melhores percentuais foram aqueles congelados com diluidor tris-frutose acrescido de 5% de glicerol e sem o tratamento com GSH, porém não foi observado diferença significativa entre os diluidores para a motilidade.

Na análise da viabilidade também não foi observado diferença significativa ($P > 0,05$) entre os diluidores. A viabilidade diminuiu à medida que os espermatozoides foram submetidos aos diferentes tratamentos.

Os resultados sugerem que os dois diluidores conseguiram manter um percentual considerável na motilidade e na viabilidade dos espermatozoides nas primeiras 4 horas de resfriamento, independente do tratamento com antioxidante. Esses parâmetros diminuem com o tempo de exposição em temperatura de 4°C. Da mesma forma para aqueles espermatozoides expostos ao congelamento em nitrogênio líquido.

A motilidade e viabilidade dos espermatozoides dos grupos tratados com GSH, submetidos ao resfriamento e congelamento, nos dois diluidores, foram submetidos aos testes de correlação (Pearson) e a regressão linear, para verificar o grau de dependência entre a motilidade e viabilidade. Foram observadas correlações positivas entre os parâmetros dos espermatozoides diluídos em tris-frutose no G4 ($r=0,86$, $p=0,14$; $r^2=0,74$), no G5 ($r=0,82$; $p=0,17$; $r^2=0,68$) e no G7 ($r=0,42$; $p=0,58$; $r^2=0,24$). No ACP-120, as correlações também foram positivas G4 ($r=0,69$; $p=0,19$; $r^2=0,47$), no G5 ($r=0,47$; $p=0,57$; $r^2=0,22$) e no G7 ($r=0,99$ e $p<0,001$; $r^2=0,99$).

5.4 Discussão

Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que é possível criopreservar espermatozoides epididimários de *Pecari tajacu*, porém o decréscimo nos parâmetros observados após o resfriamento e congelamento, independente do tratamento com antioxidante, evidenciou a necessidade de novos tratamentos para definir um protocolo eficiente de criopreservação e consolidar os programas de reprodução assistida.

Estudos referentes a criopreservação de espermatozoides de caítiu, obtidos por eletroejaculação, também mostraram decréscimo nos parâmetros seminais após refrigerarem sêmen em BTS a 17°C, e obtiveram queda de mais de 50% na motilidade nas primeiras 24 horas (55% para 22,5%) e acréscimo nas patologias espermáticas[3]. Utilizando-se ACP-116 e 5% de glicerol em diferentes curvas de congelamento em sêmen de caítiu observaram queda significativa na motilidade após o descongelamento (91,3% para 35, 8%) [20]. Os valores obtidos para a motilidade e viabilidade do sêmen diluído em ACP-116 e congelados em diferentes percentuais de glicerol e gema de ovo foram superiores aqueles observados no TRIS (controle), indicando o diluidor ACP pode ser eficientemente usado como alternativa no congelamento de sêmen em *Pecari tajacu*. No presente trabalho essas taxas foram superiores no Tris-frutose para os grupos do congelamento.

Após 24 horas, conforme o observado no presente estudo, os espermatozoides de *Pecari tajacu* apresentaram sensibilidade ao frio, fato este também observado em sêmen obtido por eletroejaculação [3]. A queda na motilidade também foi observada no resfriamento de sêmen

em suínos, sendo os espermatozoides dessa espécie considerados os mais sensíveis entre os animais domésticos [21,3].

Em caprinos, ao utilizar a ACP-101, em diferentes tempos de resfriamento, observou-se queda na motilidade a partir de 24 horas de resfriamento (59,5% fresco para 48,8%) [22]. Diluidores como BTS®, Zorlesco® modificado (ZOR) e BTZOR (Faculdade de Maringá, Paraná-Brasil), tem sido utilizado na refrigeração de sêmen suíno, o período de conservação foi maior no BTZOR ($4,94 \pm 0,30$ dias), seguido pelos ZOR ($4,62 \pm 0,29$ dias) e BTS ($3,27 \pm 0,30$ dias), mantendo os espermatozoides viáveis quanto à motilidade progressiva e ao vigor [23]. No presente trabalho, utilizando o Tris-frutose e o ACP-120 o melhor tempo de conservação desses parâmetros foi de 4 horas, decaindo consideravelmente após esse período.

A necessidade de utilização de substâncias protetoras em espermatozoides submetidos a resfriamento e/ou congelamento, tem sido amplamente utilizado em diferentes espécies domésticas para evitar danos devido ao choque térmico [24, 25]. Durante o congelamento dois importantes processos têm sido reportados, a produção de ROS que podem induzir mudanças estruturais e funcionais na membrana, já que modificações pos-transducionais de proteínas são um dos maiores mecanismos de regulação redox, sendo este afetado durante o congelamento [26, 16] e a alteração no sistema de defesa antioxidante, com a redução de GSH intracelular [27].

Estudos tem demonstrado que a adição exógena de GSH nos meios de criopreservação de espermatozoides, reduzem esses danos, melhorando a qualidade e habilidade de fecundação, mantem a motilidade dos espermatozoides protegem os espermatozoides contra o estresse oxidativo [28]. No presente estudo, a adição de glutathiona reduzida nos meios de resfriamento e congelamento, não contribuiu para manter ou melhorar a motilidade e viabilidade dos espermatozoides de caititu, sendo similar ao observado em suínos, o qual tiveram queda na motilidade de 74% para 50%, após o congelamento [27].

A presença da GSH no meio de descongelamento não contribuiu significativamente para a manutenção da motilidade de espermatozoides suínos (26,3% controle para 30,8% com GSH). Ao analisar pelo CASA, os autores observaram um aumento não significativo na motilidade (33% para 37,8%) [16]. A GSH também foi utilizada em meios de criopreservação (tris-gemacitrato e glicerol 7%) em diferentes concentrações no sêmen ovino [29]. Os resultados também não mostraram diferenças significativas nos grupos tratados com GSH, 38,4% para 36,5% com 10 mM GSH para a motilidade e 2,97 a 2,94 para o vigor. Da mesma forma em cães, a adição de 10 mM de GSH ao meio de criopreservação não contribuiu para a manutenção da motilidade

88,2% fresco, 58,6% refrigerado e 28,6% após descongelamento, apresentando queda significativa para os grupos submetidos ao congelamento [30].

A inseminação artificial e criopreservação de sêmen é amplamente realizada com sêmen obtido por vagina artificial e por eletroejaculação tanto em animais domésticos como em animais silvestres. Atualmente, cada vez mais são utilizados espermatozoides recuperados do epidídimo devido o interesse em obter doses a partir de animais domésticos de alto valor e em programas de conservação de animais silvestres ameaçados [31]. Segundo esses autores os parâmetros espermáticos observados em veados (*Cervus elaphus hipanicus*), não diferiram significativamente em relação aos dois métodos de coleta. Ao criopreservar espermatozoides obtidos do epidídimo desse cervídeo, em diferentes diluidores [32] observaram diferenças significativas para a motilidade entre os grupos do resfriamento (61,5%) e congelamento (39,2%) e na viabilidade (92,5% para 64,9%).

Em animais domésticos, a criopreservação de espermatozoides da cauda do epidídimo tem sido realizada em bovinos [12] e equinos [33]. Em bovinos, não se observou uma diminuição significativa na motilidade, porém defeitos morfológicos nos espermatozoides recuperados do epidídimo foram mais acentuados quando comparados com espermatozoides de ejaculados. Em relação a produção de blastocisto a partir desses espermatozoides as taxas foram entre 33 a 54%. Já em garanhões, houve queda na motilidade para as amostras refrigeradas após 24 horas, porém a motilidade melhorou após a centrifugação e adição em Botucurio®/Botupharma utilizado para o resfriamento [33].

A recuperação de espermatozoides epididimários sua criopreservação e subsequente utilização em programas de fertilização *in vitro* tem sido uma ferramenta útil no resgate de material genético perdido, principalmente de espécies ameaçadas [12]. É possível obter espermatozoides viáveis e com alta motilidade em animais silvestres, conforme observado em cutias (*Dasyprocta agouti*) o qual obtiveram taxas de motilidade superior ao obtido por eletroejaculação (86,5% vs 50,3%) [14]. Em *Pecari tajacu* a taxas de motilidade por esta técnica também foram superiores ao comparar coma eletroejaculação 78% vs 52,8% [3].

Na espécie *Pecari tajacu* foi possível obter espermatozoides epididimários *pos-mortem*, e estabelecer protocolos de criopreservação. Os resultados evidenciaram ser possível preservar esses espermatozoides apesar das baixas taxas de recuperação. Há necessidade de ajustes nos protocolos no que diz respeito aos tipos de diluidores empregados, a concentração de antioxidantes e do crioprotetor utilizado. Nos dois diluidores utilizados, Tris-frutose e ACP-120, foi possível preservar a célula espermática até o tempo de 4 horas. Após esse período, as taxas decaíram consideravelmente. Da mesma forma, nos espermatozoides submetidos ao

congelamento, nesse caso, as taxas foram inferiores a 10%, porém foi observado que os mesmos sobreviviam após o descongelamento, o que comprova ser possível a criação de um banco de sêmen nessa espécie e o seu emprego na reprodução assistida.

Referências Bibliográficas

1. OHASHI, O.M.; BARUSELLI, P.S. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas a bubalinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª Ed. São Paulo, Roca, 2008.
2. 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**. 2ª ED – São Paulo – Roca, 2008.
3. GARCIA, A.R.; KAHWAGE, P.R.; GUIMARÃES, D.A.A.; OHASHI, O.M. Chilled Semen of Captive Collared Peccaries (*Pecari tajacu*): effects of Preservation at 17 °C on Semen Quality. **Journal of Agricultural Science and Technology**, p 921-929. 2012.
4. KAHWAGE, P.R. et al. Eletroejaculação e características seminais de caíto (*Tayassu tajacu*). In: III REUNIÃO REGIONAL DA FESBE, 2008, Fortaleza-Ce. **Anais...** Fortaleza: FESBE, 2008.
5. MONTEIRO, G.A; GUASTI, P.N.; PAPA, F.O.; Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperados da cauda do epidídimo. **Veterinaria e Zootecnia**, v.16, nº3, p. 448-458, 2009.
6. SHARMA, R.K.; PADRON, O.F.; THOMAS, A.J; AGARWAL, A. Factors associated with the quality before freezing and after thawing of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. **Fertility and Sterility**, v. 68, 1997.
7. HEWITT, D.A.; LEAHY, R.; SHELDON, I.M.; ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of epididymal dog sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 67, 2001.
8. GARDE, J. et al. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. **Theriogenology**, v. 41, 203. 1994.
9. SARIOZKAN, S. et al. The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4°C. **Cryobiology**, v. 65, p. 93–97. 2012
10. MATÁS, C. et al. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, p. 1327–1340, 2010.
11. HISHINUMA, M. ; SEKINE, J. Separation of canine epididymal spermatozoa by Percoll gradient centrifugation. **Theriogenology**, v.61 p.365–372. 2004.
12. MARTINS, C.F. et al. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326–331. 2007.
13. PING, S. et al. Cryopreservation of epididymal sperm in tree shrews (*Tupaia belangeri*). **Theriogenology**, 76. p. 39–46. 2011

14. FERRAZ, M.S. et al. Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dasyprocta aguti*). **Theriogenology**, v.75. p. 459–462. 2011.
15. CHATTERJEE, S.; de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p.498–506, 2001.
16. GADEA, J. et al. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.26, n° 6. 2005.
17. GADEA, J. et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Cryobiology**, v. 62, p.40-46, 2011.
18. VALENÇA, R.M.B; GUERRA, M.M.P. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n° 1, p. 47-53, 2007.
19. AYRES, M. et al. **Biostat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e biomédicas**. Versão 5.3, Sociedade Civil Mamirauá, MCT – Cnpq, 5ª Ed. 2007.
20. SILVA, M.A. et al. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. **Cryobiology**, v. 67, p. 50–55. 2013.
21. WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492. 2000.
22. AGUIAR, G.V. et al. Adição de *Aloe vera* ao diluente a base de água de coco em pó (ACP-101®) como crioprotetor do sêmen caprino resfriado a 4° C. In: Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, VI, Fortaleza - Ce, 2012, **Ciência Animal, Suplemento**, p.292-295, 2012.
23. VASCONCELOS, A.M.M.A et al. Características Espermiáticas de Sêmen Resfriado de Suíno e Conservado em Diferentes Diluentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.394-401, 2001.
24. RONDON, R.M.M. et al. Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluidor de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, p.848-854, 2008.
25. RONDON, R.M.M. et al. Perspectivas sobre o uso de antioxidantes na conservação do sêmen de suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.3, p.141-147. 2012.
26. BALL BA, VO AT, BAUMBER J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.508–515. 2001.
27. GADEA, J. et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v. 62. 2004

28. BILODEAU, J.F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p. 282–288. 2000.
29. PEREZ, E.G.A. et al. Efeito da adição de glutatona na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 262-268, 2012.
30. LUCIO, C.F. **Efeito da glutatona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozoides da espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo***. 2012.115f. tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnina. USP.São Paulo 2012.
31. MARTINEZ, A.F. et al. Sperm parameters on Iberian red deer: Electroejaculation and post-mortem collection. **Theriogenology**, v. 70, p. 216–226. 2008.
32. FERNANDEZ-SANTOS, M.R. et al. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. **Theriogenology**, v.66. 2006.
33. MONTEIRO, G.A. et al. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 197– 201. 2011.

6. ARTIGO 3: PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE CAITITU (*Pecari tajacu*).

O artigo segue as normas da revista *Theriogenology* o qual será submetido.

Ana Cássia Sarmiento Ferreira^{a*}, Alessandra Ximenes Santos^a, Nathalia Nogueira da Costa^a, Marcela da Silva Cordeiro^b, Thiago Velasco Guimarães Silva^a, Priscila Di Paula Bessa Santana^a, Otávio Mitio Ohashi^a, Natalia Inagachi de Albuquerque^c, Diva Anelie de Araújo Guimarães^a

^a *Instituto de Ciências Biológicas, Laboratorio de Reprodução Animal, PA, Brasil*

^b *Instituto Federal do Pará – Campus Abaetetuba*

^c *Embrapa- Amazônia oriental - CPATU*

*Correspondência: Universidade Federal do Pará; Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Reprodução Animal, Pa, Brasil. CEP. 66075-900. Fone +55 91 32017773

Endereço de email: ana.cassia76@gmail.com (A. Ferreira)

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer a produção de embriões *in vitro* para a espécie *Pecari tajacu*, por meio do uso da FIV e injeção intracitoplasmática de espermatozoides obtidos a partir da cauda do epidídimo, com intuito de aumentar o potencial de produção da espécie e contribuir para a sua preservação. Foram utilizados 10 fêmeas os quais foram previamente sedadas e sacrificadas para obtenção dos ovários. Após a aspiração 97 COC foram selecionados e maturados *in vitro* por 36 horas, após a MIV foram divididos em três grupos, G1 (ativação partenogenética), G2 (FIV) e G3 (ICSI). No G1 os oócitos foram ativados em Ionomicina e 6-DMAP e para a FIV e ICSI foram utilizados espermatozoides epididimários. Em todos os grupos observou-se clivagens a partir do segundo dia de desenvolvimento. O início da produção de embriões *in vitro* foi bem sucedida na ativação partenogenética (62,9%) e na ICSI (52,6%), na FIV as taxas foram baixas (7%). No G1 dos 35 oócitos ativados, 22 sofreram clivagens no 2º dia apresentando 2-4 blastômeros, no 7º dia dos 22 zigotos apenas um progrediu até o estágio de blastocisto, três embriões encontravam-se com oito blastômeros e o restante dos embriões permaneceram no estágio de 2-4 células. No G2, só foram observadas clivagens com formação de embriões com até 4 blastômeros e no G3 os embriões progrediram até o estágio de oito blastômeros. Os resultados observados servirão de base para outras pesquisas que tenham por objetivo aperfeiçoar essa biotecnologia na região Amazônica uma vez que a espécie em estudo apresenta elevado poder econômico.

Palavras chaves: FIV, ICSI, embrião, *Pecari tajacu*, partenogênese, oócito

6.1. Introdução

O caititu (*Pecari tajacu*) é um dos animais mais caçados na Amazônia [1] e nos demais biomas brasileiros é encontrado em diferentes níveis de conservação. Sendo que a viabilidade das suas populações em vida livre está ameaçada pela constante destruição e a fragmentação do habitat e pelo aumento da densidade humana [2]. O domínio do conhecimento reprodutivo dessa espécie é fundamental para o manejo conservacionista, sendo que alguns trabalhos sobre o assunto já foram realizados nos últimos anos [3,4]. No entanto, é necessário entender outros aspectos relacionados a sua reprodução, que possam contribuir para a sua conservação [5].

Programas de conservação *in situ* e *ex situ* para algumas espécies mamíferos podem ser beneficiados com o uso de biotecnologias reprodutivas, incluindo a inseminação artificial, transferência de embriões, fertilização *in vitro*, micromanipulação de gametas e embriões, sexagem de sêmen e embriões, e bancos de genoma [6].

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) trouxe algumas vantagens em programas de reprodução, uma vez que o desenvolvimento da técnica promoveu avanço na otimização e multiplicação de fêmeas de interesse para a produção animal e conservação de espécies em perigo de extinção [7].

A PIVE é mais uma alternativa para aumentar a capacidade de multiplicação do material genético da fêmea, tendo em vista a possibilidade de a colheita ser realizada semanalmente e por um longo período, mesmo em animais gestantes e impúberes, apresentando grande vantagem sobre o programa de transferência de embriões (TE) convencional [8].

A técnica convencional de fertilização *in vitro* (FIV) para os animais domésticos é a que vem sendo empregada para as espécies silvestres, com sucesso restrito a poucas. Foram relatados alguns resultados satisfatórios utilizando-se a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) em primatas e felinos silvestres. Para o sucesso dessas técnicas é necessário, no entanto, um grande número de oócitos, o que muitas vezes é um fator limitante, principalmente para as espécies ameaçadas de extinção [9].

Esse trabalho objetiva estabelecer um protocolo de produção de embriões *in vitro* para a espécie *Pecari tajacu*, por meio do uso da FIV e injeção intracitoplasmática de espermatozoides obtidos a partir da cauda do epidídimo evidenciando o potencial de desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro*, o que contribuirá para programas de produção e conservação dessa espécie.

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 Animais

Foram utilizadas 10 fêmeas adultas de *Pecari tajacu*, caetituis, na faixa etária entre 1 à 3 anos, provenientes do criatório científico, legalizado junto ao IBAMA (1501.5219/2011-PA), localizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Amazônia Oriental, em Belém-Pará, Brasil.

Esse trabalho foi submetido ao CEPAE-UFPA (Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará) e aprovado sob número de protocolo 18413. Sendo os animais utilizados para outros fins de pesquisa científica, o presente trabalho coletou somente as gônadas femininas.

As fêmeas foram previamente anestesiadas com ketamina¹ (5mg/kg) e xilazina² (1 mg/kg) e então eutanasiadas com cloreto de potássio (1mg/kg). Após o óbito do animal, os ovários foram retirados e então conduzidos em meio PBS ao Laboratório de Fertilização *in vitro* do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

6.2.2 Seleção dos complexos cumulus oócitos (COCs)

Os complexos *cumulus*-oócito foram obtidos a partir da aspiração dos folículos de 2mm a 5mm de diâmetro com agulha de 25 x 8 mm acoplada a seringa de 5ml e posteriormente, transferidos para uma placa de Petri estéril de poliestireno³. O rastreamento e seleção dos COCs foi realizado com auxílio de estereomicroscópio⁴ sob fluxo laminar, em Meio 199⁵ (tampão Hepes) acrescido 10% de soro fetal bovino⁶ (v/v), 0,22mM piruvato⁷, 50µg/mL gentamicina⁸. Foram selecionados os COCs que apresentaram células do *cumulus oophorus* compactas e refringentes.

6.2.3 Maturação *in vitro*

Os COCs foram incubados (10 a 15/gota) em Meio 199⁹ (tampão bicarbonato de sódio) suplementados com 10% SFB (v/v), 0,5µg/mL FSH¹⁰, 50µg/mL LH¹¹, 22µg/mL de piruvato e 50µg/mL de gentamicina [10], sob óleo mineral¹² por um período de 22 horas.

¹Dopalen-CEVA P002/13; ²Rompum-Bayer P001/12, ³Corning 430165, ⁴Olympus S261, ⁵Gibco-12340-030; ⁶Gibco 12657-029; ⁷Sigma P-5280; ⁸Sigma G-1264, ⁹Gibco 11150-059; ¹⁰folltropin V Bioniche, ¹¹Lutropin V Bioniche, ¹²Sigma-Aldrich M8410

Após esse período, os COCs foram transferidos para o meio 199 sem adição de hormônios, por 14 horas até o período final da maturação de 36 horas, conforme o descrito por Seong-Sung kwak *et al.* (2012).

Durante o período de maturação os CCOs foram mantidos em estufa de cultivo com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂, sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5°C.

6.2.4 Produção de embriões.

6.2.4.1. Fecundação *in vitro*

Após o tempo de maturação, os COCs expandidos (20 a 25 por gota) foram transferidos para gotas de 80 µL com meio de fecundação (TALP acrescido com 10µg/mL de heparina¹³, 2µM de penicilamina¹⁴, 1µM de hipotaurina¹⁵, 0,25µM de epinefrina¹⁶, 6mg/mL BSA¹⁷, piruvato e gentamicina), sob óleo mineral estéril, em estufa de cultivo com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂, sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5 °C.

Os espermatozoides foram obtidos a partir da técnica de aspiração da cauda do epidídimo, com auxílio de seringa de 3 ml acopladas em agulhas 25 x 8mm. Foram aspirados aproximadamente 200 µL do conteúdo do epidídimo e então adicionados em 500 µL de PBS mantidos em placa aquecedora, os quais foram centrifugados por três minutos para obtenção do pellet contendo os espermatozoides.

Após a primeira lavagem foram analisados os parâmetros seminais, enfocando a motilidade e a concentração espermática. Em seguida, o *pellet* foi resuspendido em 800 µl de gradiente de densidade descontínuo de percoll (45 e 90%) e centrifugado (200G) por sete minutos, para separação dos espermatozoides viáveis. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* resuspendido em 800 µl de meio TALP, e novamente centrifugado a 200G por três minutos, para remoção dos resíduos de Percoll.

Após a lavagem foi determinada a concentração que foi ajustada para 2 x10⁶ spz/ml, e então foram adicionados 7 µL de meio com espermatozoides no meio de FIV, e então co-cultivados com os oócitos, por 18 horas.

¹³ Sigma H-3149, ¹⁴ Sigma P-4875, ¹⁵ Sigma H-1364, ¹⁶ Sigma E-4250, ¹⁷ Sigma A-6003.

6.2.4.2 Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

As soluções preparadas para ICSI foram as seguintes: (1) meio de CIV para os oócitos; (2) meio de FIV para os espermatozoides; (3) Polyvinilpyrrolidona (PVP)¹⁷ estéril liofilizada para ICSI.

Após 36 horas da MIV, os COCs expandidos foram desnudados, nos quais as células do *cumulus* aderidas aos oócitos foram removidas usando hialuronidase¹⁸ 0,1% e transferidos para o meio de FIV.

Os espermatozoides foram obtidos através da aspiração da cauda do epidídimo conforme descrito no item anterior, transferidos para o meio de FIV e selecionados sob magnificação de 200x para 400x, os quais foram injetados nos oócitos previamente desnudados. Foi utilizada para injeção a micropipeta¹⁹ para ICSI 30° Ângulos D.I 8-10 UM D.E 5-6 UM.

A placa para o procedimento da ICSI foi composta por uma gota central com 20 µl de solução de PVP coberta com óleo mineral utilizada para injeção, e ao redor 5 a 6 gotas de 80 µl com meio de TALP-FIV contendo os oócitos e espermatozoides.

Os espermatozoides foram transferidos para a gota de PVP e então tiveram a cauda imobilizada com a pipeta de microinjeção. Os espermatozoides foram aspirados pela cauda e então injetados nos oócitos que apresentavam o corpúsculo polar na posição 12 ou 6 horas, afim de evitar danos nos cromossomos metafásicos durante a injeção. Dessa forma, a zona pelúcida e o oolema foram perfurados com a micropipeta de injeção e então os espermatozoides foram injetados no centro dos oócitos (Figura 1).

Os espermatozoides foram injetados com a micropipeta para ICSI 30° ângulo acopladas em microscópio invertido²⁰ equipado com um manipulador²¹.

Após a ICSI os oócitos injetados foram ativados com Ionomicina e 6 - DMAP e então co-cultivados com as células da granulosa provenientes da MIV, para observação do desenvolvimento embrionário.

¹⁷ Irvine Scientific, Santa Ana, CA, ¹⁸Sigma H3757, ¹⁹Humagen MIC 5030, ²⁰ Nikon eclipse TE300, ²¹ Narishige

Figura 1: Micromanipulação do oócito de caititu para injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Aumento 400X. Fonte: Arquivo pessoal



6.2.4.3. Ativação partenogenética.

A ativação partenogenética foi realizada em oócitos de caititus maturados *in vitro*, a fim de observar o seu potencial de desenvolvimento embrionário (G1-controle), e nos oócitos maturados *in vitro*, submetidos a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (G3).

Após o tempo de maturação, os COCs foram retirados da placa de MIV e desnudados em hialuronidase²² até a remoção total do complexo *cumulus oophorus*. Após a remoção, foi realizada a seleção dos oócitos quanto à presença ou não do corpúsculo polar, os oócitos foram lavados em HEPES (100 µl) e colocados por cinco minutos em meio H-Ionicina. Para a remoção da Ionicina²³, os oócitos foram lavados em meio H-saturado por 10 minutos, e então transferidos para a placa de 6-DMAP²⁴, onde permaneceram por três horas em estufa de cultivo com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂, sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5 °C.

6.2.4.4. Cultivo *in vitro* dos embriões e avaliação morfológica do desenvolvimento *in vitro*

Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões com monocamada de células do *cumulus oophorus* que aderiram à placa durante a MIV. As gotas de MIV contendo as células do *cumulus oophorus* foram aspiradas e então substituídas por 100 µL meio de cultivo embrionário (SOF) e as placas foram colocadas na estufa até o momento da transferência dos embriões.

²²Sigma H3757, ²³Sigma I0634, ²⁴Sigma D2629

Após 24 horas da FIV, os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens, para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes, e dos espermatozoides aderidos à zona pelúcida, e então transferidos para gotas com meio de cultivo, meio SOF suplementado com 10% de SFB, 1mM de glicose, 10µg/mL de insulina, 6mg/mL de BSA²⁵, 80µg/mL piruvato e gentamicina.

Os zigotos provenientes da ICSI foram transferidos para o meio de cultivo após ativação partenogénica, após três horas da gota de 6-DMAP, lavados e transferidos para o meio de cultivo descrito acima.

O desenvolvimento embrionário foi avaliado com auxílio de estereomicroscópio, de acordo com taxa de clivagem (nº de divisão celular) no 2º dia de cultivo (D2) e a taxa de blastocisto no 7º dia de cultivo (D7), segundo o critério estabelecido pelo manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.

6.2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental consistiu em três grupos, nos quais os oócitos, após a maturação, foram submetidos para a produção de embriões conforme a seguir:

G1 (controle): 35 COCs submetidos à ativação partenogénica.

G2: 43 COCs submetidos à fecundação *in vitro*.

G3: 19 COCs submetidos à injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

Foram realizadas duas repetições por grupo, com exceção do G3 que foi realizado apenas um experimento em virtude da quantidade e qualidade dos oócitos obtidos durante o experimento.

6.2.6. Análise estatística

Os dados paramétricos referentes as clivagens nos três tratamentos foram analisados pelo teste de ANOVA one-way e teste *t*, e as suas diferenças comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o nível de significância 5%. O programa utilizado foi o Biostat 5.3 [11]

²⁵ Sigma A-6003 (Fração V)

6.3 Resultados

No presente trabalho foi possível observar clivagem e desenvolvimento inicial de embriões em *Pecari tajacu*, por ativação partenogenética ou utilizando espermatozoides epididimários através da FIV e ICSI.

Foram submetidos 97 oócitos maturados *in vitro* nos três tratamentos, dos quais 35 sofreram clivagens o que comprova o potencial de desenvolvimento dos oócitos dessa espécie. Porém, foi observado elevada taxa de embriões que não sofreram clivagens, o que ressalta a necessidade do aperfeiçoamento das técnicas de produção *in vitro* de embriões, assim como melhorar as condições do cultivo *in vitro*. Os resultados estão detalhados na tabela 01.

Tabela 01: Percentual de clivagens e desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos a ativação partenogenética (controle) fecundação *in vitro* (FIV) e injeção injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Grupos	Nº oócitos	Clivagens (%)	Blastocisto (%)	Não clivados (%)	Degenerados (%)
G1(controle)	35	22 (62,9%) ^{A,a}	1 (4,5%) ^{A,b}	9 (25,7%) ^{A,a}	4 (11,4%) ^{A,b}
G2 (FIV)	43	3 (7,0%) ^{B,a}	0 ^{A,a}	38 (88,3%) ^{B,b}	2 (4,67%) ^{A,a}
G3 (ICSI)	19	10 (52,6%) ^{A,a}	0 ^{Ab}	6 (31,8%) ^{A,a}	3 (15,8%) ^{A,b}

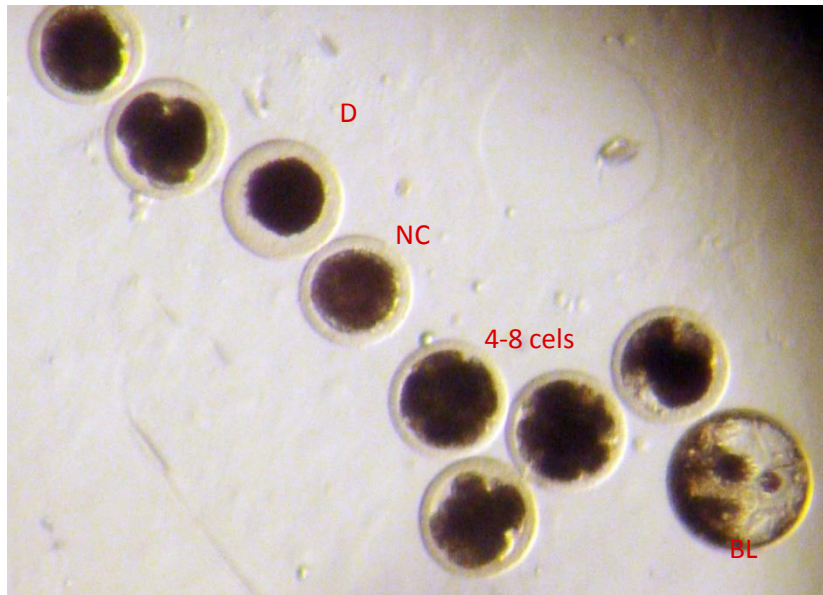
^{a, b}: letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05, P<0,01)

^{A,B} letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,01)

Conforme observado na Tabela 01, nos três grupos observou-se clivagens a partir do 2º dia do desenvolvimento embrionário. O percentual de clivagens não foi significativo quando comparado o número de oócitos ativados no G1 e G3, porém no G2 foi altamente significativo (P<0,01). Porém os dados mostraram-se significativo (p<0,05) ao se analisar o número de oócitos clivados no G1 para aqueles que progrediram até o estágio de blastocisto. Conforme exposto na tabela somente no grupo submetido a ativação partenogenética foi possível observar no 7º dia um único embrião em estágio de blastocisto (Figura 2).

O maior percentual de clivagens foi observado nos oócitos submetidos a ativação partenogenética (62,9%) e na ICSI (52,6%). No grupo 2 (FIV), dos 43 oócitos maturados, somente 3 (7%) clivaram. Em virtude da baixa taxa de clivagem, os oócitos submetidos a FIV foram corados em Hoesch e analisados em imunofluorescência. Após a análise observou-se que os mesmos permaneciam em metáfase II.

Figura 2: Embriões partenogenotos, blastocisto (BL), embriões em estágio de 4-8 células; não clivados (NC), degenerados (D), observados no 7º dia do desenvolvimento embrionário. Aumento 400X. Fonte: Acervo pessoal, 2013.



As figuras 3 e 4 evidenciam a progressão das clivagens nos três grupos. No grupo 1 (controle) dos 35 oócitos ativados, 22 sofreram clivagens no 2º dia apresentando 2-4 blastômeros, no 7º dia dos 22 zigotos apenas um progrediu até o estágio de blastocisto, três embriões encontravam-se com oito blastômeros e o restante dos embriões permaneceram no estágio de 2-4 células, o que evidenciou parada no desenvolvimento embrionário.

No grupo 2 (FIV), dos 43 oócitos fertilizados, somente três clivaram progredindo até o estágio de quatro blastômeros. No grupo 03 (ICSI), dos 19 oócitos, 10 (52,6%) sofreram clivagens, porém nem todas foram observadas no D2. Somente três zigotos sofreram clivagens incipientes no 2º dia, com início de formação de blastômeros. No 3º dia observou-se um aumento no padrão de clivagens de três para nove zigotos os quais apresentavam-se com 2 - 4 blastômeros bem visualizados. No 7º dia totalizaram-se 10 clivagens, dos quais seis embriões apresentavam acima de oito blastômeros, dois embriões apresentavam 2-4 blastômeros e dois embriões com dois blastômeros (Figura 5).

Figura 3: Progressão das clivagens nos 03 grupos ao longo do desenvolvimento embrionário.

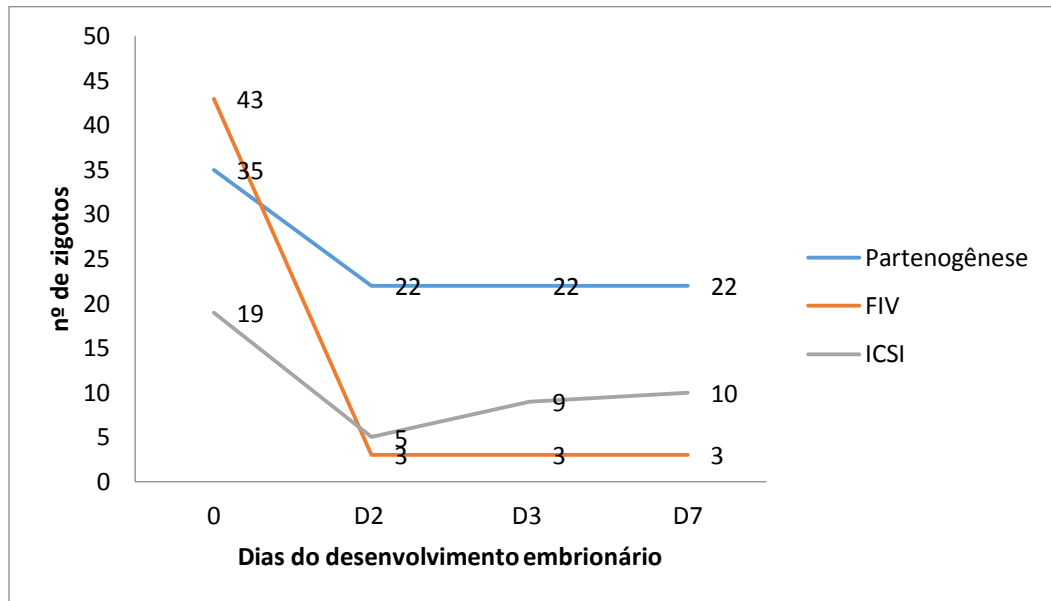


Figura 4: Observação das clivagens e número de células observadas durante o desenvolvimento embrionário, nos três experimentos, sendo possível observar aumento progressivo na ICSI.

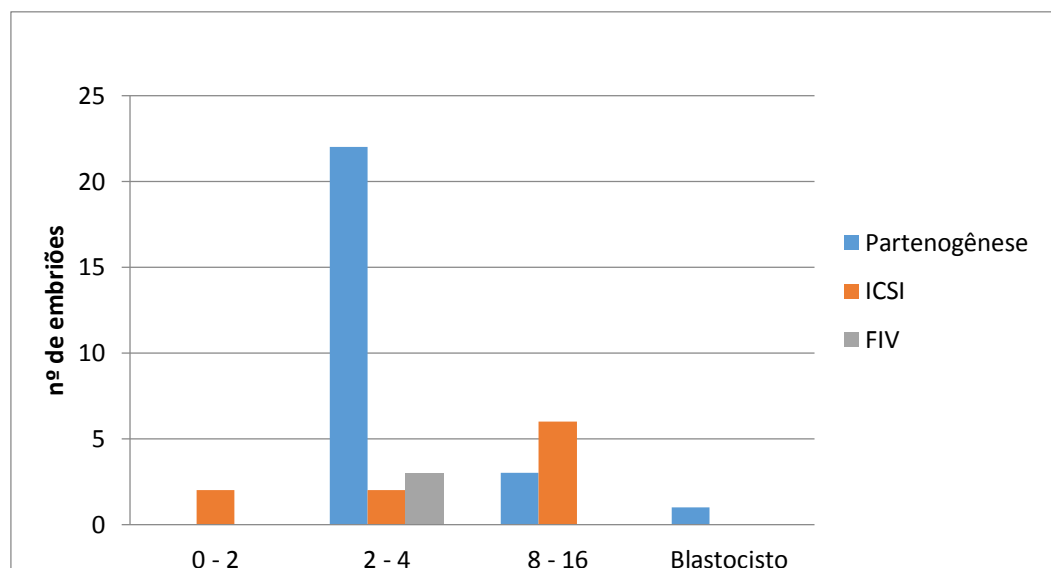
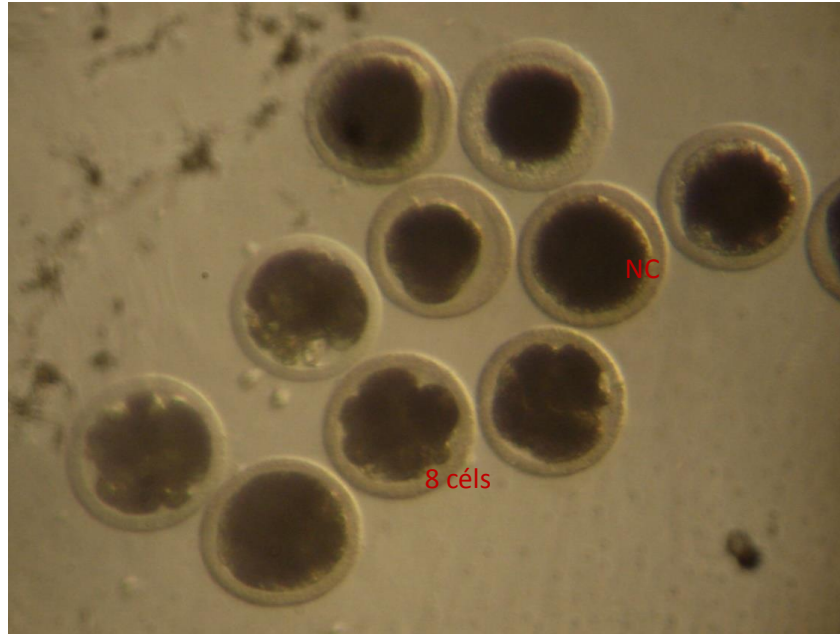


Figura 5: Embriões de ICSI no 7º dia, mostrando embriões com 8 células, embriões não clivados (NC).



6.5 Discussão

A fecundação do oócito pelo espermatozoide induz ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Esse aumento serve para ativação do oócito com a retomada da meiose e o início do desenvolvimento embrionário pela inativação do fator de promoção da mitose, através da destruição da ciclina B, dependente de Ca^{2+} [12]. Esse processo tem sido obtido pela ativação partenogenética de oócitos em suínos, através de diversos métodos como injeção intracelular de cálcio, eletrochoque e vários reagentes químicos, incluindo o etanol e estrôncio [13], Ionoforo A23187 [14], ciclohexamida [15], estrôncio [16], 6-dimethylaminopurina [17, 18] e cloreto de cálcio [19].

No presente trabalho, a ativação partenogenética dos oócitos de caititus foi realizada através da combinação de dois agentes, a Ionomicina e 6 DMAP, obtendo-se taxas de 62,9% de clivagens e 4,2% de blastocisto, que foram inferiores em comparação a obtidas em suínos (77% e 39,4%, respectivamente) cultivados em NCSU-23 [12]. Apesar da elevada taxa de clivagem, a maioria dos embriões desenvolveu até o estágio de 2-4 células, ocorrendo a parada no desenvolvimento [20], esses autores ativaram os oócitos utilizando cloreto de estrôncio (53%), 6-DMAP + estrôncio (49%) e ciclohexamina + estrôncio (54,3%), entretanto a maioria dos embriões também pararam o desenvolvimento em estágio de 2 -4 células.

Na FIV foram realizadas duas repetições e observou-se que dos 43 oócitos somente três sofreram clivagens, não prosseguindo ao longo dos dias do desenvolvimento embrionário, fato

esse que pode estar relacionado a capacitação dos espermatozoides, evidenciando a necessidade de aperfeiçoar o procedimento na espécie.

Em suínos, a capacitação *in vitro* é induzida pela cafeína [21], proporcionando a desestabilização da membrana plasmática e hiperativação espermática, que são eventos essenciais para que ocorra a reação acrossômica e penetração dos espermatozoides no oócito [22].

No presente estudo, os espermatozoides utilizados na FIV foram capacitados em meio contendo o glicosaminoglicano heparina, utilizada em bovinos [23], o que pode ter sido o fator determinante da não capacitação dos espermatozoides do caititu. Em virtude de terem sido utilizados espermatozoides epididimários, não haveria a necessidade de remover os fatores decapacitantes, os quais são adicionados ao plasma seminal. Dessa forma, não foram testados os agentes químicos responsáveis pela capacitação espermática *in vitro*. Porém a necessidade de tais testes tornou-se evidente a partir dos resultados obtidos na fecundação *in vitro* de caititus, principalmente se forem utilizados espermatozoides epididimários.

Os resultados encontrados em suínos [24] foram contrários ao observado em caititus. Os referidos autores obtiveram taxas de fertilização com a observação dos dois pronúcleos (23%) e clivagens (>50%) utilizando espermatozoides epididimários em protocolos de FIV, resultados esses superiores ao observados em sêmen obtidos de ejaculados. Os mesmos autores sugeriram que a ausência de contato com o plasma seminal pode ter contribuído para os resultados obtidos, afirmando que a remoção dos fatores decapacitantes deve ser evitado até o estabelecimento da FIV na espécie, já que a estrutura bioquímica desses fatores ainda é desconhecida.

Na superfície de espermatozoides de suínos estão presentes proteínas de baixo peso molecular, as quais são essenciais para o reconhecimento do gameta [25, 24]. Tais proteínas são adicionadas no espermatozoide ainda no epidídimo e são ativadas pelos componentes do plasma seminal. A sua desativação ocorre durante a migração do espermatozoide no sistema reprodutor feminino, sendo novamente ativada quando o mesmo encontra o oócito. Em geral, os espermatozoides epididimários precisam ser capacitados, sendo esse evento um pré-requisito para a reação acrossômica, uma vez que induz a fluidez e permeabilidade da membrana do espermatozoide [24].

Outros fatores que podem ter bloqueado o desenvolvimento embrionário são as condições de cultivo *in vitro*, uma vez que em suínos a capacidade de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto é baixa, condições de maturação citoplasmática dos oócitos, alta taxa de polispermia [26], as condições de cultivo embrionário não foram avaliados

no presente trabalho. Um fator limitante para o cultivo dos embriões suínos, é o desenvolvimento até o estágio de quatro células. Esse fato pode ocorrer por condições inadequadas de cultivo, e que coincida com o tempo das primeiras ativações do genoma embrionário [27]. Existem critérios para a avaliação dos embriões suínos após a fecundação *in vitro*, tais como: estado de desenvolvimento, integridade da zona pelúcida, presença de espermatozoides aderidos à zona pelúcida, delimitação e uniformidade dos blastômeros, e presença do espaço perivitelinio [26]. Nos embriões de caaitu foram observados espermatozoides aderidos a zona pelúcida e blastômeros não uniformes.

Os resultados obtidos na ICSI em caaitus foram superiores aos observados na FIV, ou seja 10/19 (52%) oócitos sofreram clivagens embrionárias, produzindo embriões até o estágio de 8-16 células. Esse potencial também foi demonstrado na mesma espécie, com elevada taxa de embriões produzidos por ICSI com duas células (75%) e quatro células (37,5%). [28]

Em suínos domésticos as taxas de clivagens e blastocistos são variáveis [29] obtiveram 26% de clivagens com zigotos apresentando duas células em 40 horas de cultivo, que foram transferidos para receptoras e registraram um único nascimento. [30] ao utilizarem condições e meios de cultivo apropriados (meio de cultivo NCSU-23 suplementado com BSA, SFB ou EPS), obtiveram taxas de clivagens (37,6%; 37,5% e 53,8%) e blastocisto (34,1%; 16,6% e 14,3%), respectivamente.

Além da utilização de espermatozoides obtidos de ejaculados, a ICSI pode ser realizada utilizando espermatozoides epididimários. Em suínos a injeção de espermatozoides epididimários criopreservados são mais adequados para fertilização *in vitro*, uma vez que não há a necessidade da capacitação *in vitro*, e que espermatozoides epididimários não apresentam fatores decapacitantes a serem removidos durante a capacitação [29]. Esse fato pode ou não ser significativo no contexto da ICSI. Ao injetarem espermatozoides epididimários de suínos criopreservados em oócitos maturados *in vitro e in vivo*, os autores supracitados obtiveram taxas de clivagens baixas 16% e 8%, respectivamente, taxas inferiores ao encontrado no presente trabalho (52%).

Os resultados encontrados em outras espécies domésticas mostraram o potencial de desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos a ICSI, em ovelhas, 76% de clivagens e 14,3% blastocisto [31]. Assim como utilização de oócitos vitrificados de ovelhas o qual obteve-se 29% de blastocistos [32]. Em cabras, utilizando espermatozoides congelados, obteve-se 84% de clivagens e 29,5% de blastocisto [33].

Os resultados apresentados na ativação partenogénica e na ICSI mostraram ser possível obter embriões na espécie *Pecari tajacu*, Há necessidade de adequação do protocolo

de produção de embriões para espécie, uma vez esse tipo de pesquisa em animais silvestres não tem sido registrado, especificamente na espécie em estudo. A produção de embriões *in vitro* de *Pecari tajacu* contribuirá efetivamente para implantação de programas de produção e conservação em cativeiro, uma vez que poderá aumentar o número de crias através da transferência de embriões para várias fêmeas simultaneamente, do ponto de vista conservação *in situ* e *ex situ*, a manutenção dos recursos genéticos. Tais resultados servirão de base para outras pesquisas que tenham por objetivo aperfeiçoar essa biotecnologia na região Amazônica uma vez que a espécie em estudo apresenta elevado potencial econômico.

Referências Bibliográficas

1. BONAUDO, T., Y. LE PENDU, J. F. FAURE, QUANZ, D. The effects of deforestation on wildlife along the transamazon highway. **European Journal of Wildlife Research**, v.51, p.199-206. 2005.
2. DESBIEZ, A.L.J. et al. Avaliação do risco de extinção do cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v.3, 74–83. 2012.
3. MAYOR, P. et al. Reproductive performance of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Animal Reproduction Science**, v.102, p. 88-97. 2007a
4. COSTA, G.M.J. et al. Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (collared peccary, *Tayassu tajacu*). **Journal of Andrology**, v.31, p. 221-230. 2010
5. GARCIA, A.R. et al. Chilled Semen of Captive Collared Peccaries (*Pecari tajacu*): effects of Preservation at 17 °C on Semen Quality. **Journal of Agricultural Science and Technology**, p 921-929. 2012.
6. ANDRABI, S.M.H; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction science**, v.99, 2007.
7. RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento, p.229-233, 2007.
8. OHASHI, O.M.; BARUSELLI, P.S. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas a bubalinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª Ed. São Paulo, Roca, 2008.
9. GUIMARÃES, M.A.B.V. Reprodução de animais silvestres. In: GONÇALVEZ, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ED – São Paulo – Roca, 2008.
10. LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular. Reproduction and. Development**, v.37, p.48-53, 1994.
11. AYRES, M. et al. **Biostat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e biomédicas**. Versão 5.3, Sociedade Civil Mamirauá, MCT – Cnpq, 5ª Ed. 2007.
12. NANASSY, L.O.; KIHU, L.E.E.; JAVOR, A.; MACHATY, Z. Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.104, p. 264–274. 2008.
13. MEO, S.C.; LEAL, C.L.; GARCIA, J.M. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p.35–46. 2004.

14. FUNAHASHI, H. et al. In vitro development of in vitro matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 50, p.1072–1077. 1994.
15. CHA, S.K. et al. Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and in vitro development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. **Reproduction Fertility and Development**, v. 9, 441–446. 1997.
16. OKADA, K.; MIYANO, T.; MIYAKE, M. Activation of pig oocytes by intracytoplasmic injection of strontium and barium. **Zygote**, v.11, p.159–165. 2003.
17. GRUPEN, C.G. et al. Effect of 6-dimethylaminopurine on electrically activated in vitro matured porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p. 387–396. 2002
18. MACHATY, Z.; PRATHER, R.S. Strategies for activating nuclear transfer oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v.10, p. 599–613. 1998
19. MACHATY, Z. et al. Effects of injecting calcium chloride into in vitro matured porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 316–322. 1996.
20. VARGA, E. et al. Parthenogenetic development of in vitro matured porcine oocytes treated with chemical agents. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 226–233. 2008.
21. MARTINEZ, E. et al. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, v. 40, p. 547-557, 1993.
22. SERRET, C.G. et al. Produção *in vitro* de embriões suínos. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.13, nº.3, p. 285-289, 2007.
23. ANDERSON, G.B. Fertilization, early development and embryo transfer. In: CUPPS, P. **Reproduction in Domestic Animals**, 4.ed. San Diego: Academic Press, p.279-313. 1991.
24. RATH, D.; NIEMANN, H. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. **Theriogenology**, v. 47, p.785-793, 1997.
25. Topfer-Petersen, E. Molecular mechanism of sperm-oocyte interactions in the pig. **Reproduction in Domestic Animals**. V.31 (suppl 4), p.93-100, 1996.
26. RATH, D. Producción *in vitro* de embriones porcinos. In: PALMA, G.A. **Biotecnología de la reproducción**. Argentina, 2001. p. 651 –652.
27. GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª Ed. São Paulo, Roca, 2008.

28. CAMPOS-JUNIOR, P.H.A. et al. Derivation of sperm from xenografted testis cells and tissues of the peccary (*Tayassu tajacu*). **Reproduction**, v.147, 291–299. 2014
29. KOLBE, T.; HOLTZ, W. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. **Theriogenology**, v.52, p.671-682, 1999.
30. GRAD-MANDRYK, I.; KOSENIUK, J.; GAJDA, B. Developmental competence of pig embryos obtained from ICSI: the effect of source of protein in culture médium, **Reproductive biology**, v.13, p. 11 – 13. 2013.
31. CATALÁ, M.G. et al. Effect of oocyte quality on blastocyst development after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. **Fertility and Sterility**, v. 97, n°. 4, 2012.
32. HOSSEINI, S.M. et al. Potential applications of sheep oocytes as affected by vitrification and in vitro aging. **Theriogenology**, v.77, p.1741–1753. 2012.
33. SHADANLOO, F. et al. Sperm status and DNA dose play key roles in sperm/ICSI-mediated gene transfer in caprine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, p. 868–875. 2010

7. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados demonstraram que o melhor tempo de maturação *in vitro* dos oócitos de *Pecari tajacu* foi de 36 horas, e que após a ativação partenogenética foi possível observar o desenvolvimento competente do oócito. O que torna viável a aplicação de programas de produção de embriões *in vitro* na espécie *Pecari tajacu*.

A respeito da criopreservação de espermatozoides, obteve-se taxa de sobrevivência após aquecimento e descongelamento utilizando-se espermatozoides epididimários, sendo esse tipo de coleta uma alternativa viável na formação de bancos de sêmen na espécie. Há necessidade de ajustes nos protocolos no que diz respeito aos tipos de diluidores empregados, a concentração de antioxidantes e do crioprotetor utilizado. Nos dois diluidores utilizados, Tris-frutose e ACP-120, foi possível preservar a célula espermática até o tempo de 4 horas de resfriamento. Para aqueles que foram congelados, após o descongelamento aos parâmetros espermáticos não foram superiores a 10%.

Na produção de embriões o emprego da ICSI foi bem sucedido uma vez que as taxas de clivagens foram superiores a 50%. Porém verificou-se a necessidade de adequação do protocolo de produção de embriões para espécie, uma vez esse tipo de pesquisa em animais silvestres não tem sido registrado, especificamente na espécie em estudo, principalmente na fertilização *in vitro*, nos quais as taxas de clivagens foram significativamente baixas. A produção de embriões *in vitro* de *Pecari tajacu* contribuirá efetivamente para implantação de programas de produção e conservação em cativeiro, uma vez que poderá aumentar o número de crias através da transferência de embriões para várias fêmeas simultaneamente, do ponto de vista conservação *in situ* e *ex situ*, a manutenção dos recursos genéticos. Espera-se que os resultados obtidos nesse trabalho sirvam de base para outras pesquisas que tenham por objetivo aperfeiçoar essa biotecnologia na região Amazônica uma vez que a espécie em estudo apresenta elevado poder econômico seja na comercialização da carne e subprodutos, como o couro, podendo a espécie ser considerada como pecuária alternativa especificamente para as comunidades rurais.

