



Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

KÁTIA REGINA FREIRE LOPES

**Caracterização e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de jumentas da
raça nordestina**

Mossoró/RN - UFERSA

Junho de 2017

KÁTIA REGINA FREIRE LOPES

**Caracterização e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de jumentas da
raça nordestina**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-Árido de
Mossoró, para a obtenção do título de Doutora
em Ciência Animal.**

Centro de Ciências Agrárias

Área de Concentração:
Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientador:
Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva

Co-orientadora:
Dra. Gabriela Liberalino Lima

**Mossoró/RN
Junho de 2017**

Folha de Avaliação

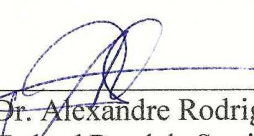
Nome do Autora: *Kátia Regina Freire Lopes*

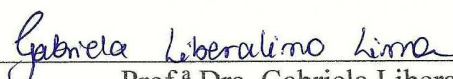
Título: *Caracterização e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de jumentas da raça nordestina*

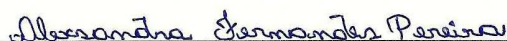
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido de Mossoró, para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Data: 30/06/2017

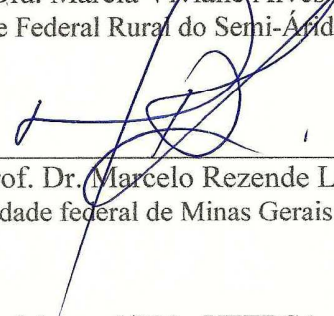
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA


Prof.ª Dra. Gabriela Liberalino Lima
Universidade Federal de Roraima - UFRR


Prof.ª Dra. Alexsandra Fernandes Pereira
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA


Prof.ª Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA


Prof. Dr. Marcelo Rezende Luz
Universidade federal de Minas Gerais - UFMG

Mossoró/RN - UFERSA
Junho de 2017

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos

L864c Lopes, Katia Regina Freire.

Caracterização e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de jumentas da raça nordestina / Katia Regina Freire Lopes. - 2017.
150 f. : il.

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva.

Coorientadora: Gabriela Liberalino Lima.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2017.

1. Asininos. 2. Foliculogênese. 3. Oócito. 4. Ovário. 5. Células da granulosa. I. Silva, Alexandre Rodrigues, orient. II. Lima, Gabriela Liberalino, co-orient. III. Título.

***Compreendi a embriogênese feminina:
o que sentimos “com” e “por” um filho
é concebido junto à nossa essência,
e erigido por todos os dias da nossa vida!!!***

*À Kleber Jacinto, meu “ponto de apoio” e
À Kivia Freire Jacinto, minha “alavanca”.*

Dê-me uma alavanca e um ponto de apoio,
e eu serei capaz de mover o mundo!
(*Arquimedes*)

...e ao Meu PAI
Antônio Freire Lopes
Dedico.

Agradecimentos

*Àquelas que se privaram do maior dom de ser uma fêmea, para contribuírem para sua espécie, meu respeito e gratidão: **Alice, Aninha, Ariana, Belinha, Carminha, Cleopatra, Elza, Glaucia, Jake, Joaquina, Judite, Juliana, Larissa, Melissa, Morgana, Roci, Samanta, Tata, Tereza, Ursula.***

*À **minha Mãe**, Etiene Soares Freie Lopes, pelo amparo nessa fase tão conturbada de emoções distintas, seu suporte foi fundamental para poder executar qualquer ação nestes dois últimos anos, com a garantia de que o meu maior bem estivesse em segurança.*

*Ao Dr. **Alexandre Rodrigues Silva**, pela coragem, credibilidade, confiança, compreensão... Ao orientador fica o reconhecimento e exemplo de dedicação à profissão e determinação em sempre buscar a excelência. Ao Amigo, impossível simplesmente agradecer, reconheço que “bagunçou” sua zona de conforto. Apesar de todo montante que aprendi, meu maior legado desta experiência, continuará sendo o modelo de caráter e ética e a honra da amizade.*

*Aos membros da **banca avaliadora**, Prof.^a Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva e o prof. Dr. Raimundo Alves Barrêto Júnior (I banca de qualificação); às professoras Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva e Dra. Alexsandra Fernandes Pereira (II banca de qualificação e Banca final), ao prof. Dr. Marcelo Rezende Luz e à prof.^a Dra. Gabriela Liberalino Lima, e a disponibilidade em suplência ao prof. Dr. Moacir Franco Oliveira e Dra. Ana Liza Paz Souza Batista, que tão atenciosamente doaram um pouco de seu tempo e seu conhecimento para o aperfeiçoamento deste trabalho e, conseqüentemente, para o meu engrandecimento profissional.*

*Aos Mestres: José **Domingues** Fontenele, **Jean Berg** Alves da Silva, **Michael Hrcir**, **Vitor de Oliveira Lunard**, **Darius** Pukenis **Tubelis**, **Felipe** de Azevedo Silva **Ribeiro** Mestres corresponsáveis pela formação de mais esta etapa da minha profissionalização.*

*À Dra. **Gabriela** Liberalino Lima pela paciência e disponibilidade, sempre em me atender plenamente, sanando minhas dúvidas, guiando meus passos, mais uma vez... em alguns momentos atuando como mentora nessa jornada, grata por todo direcionando ao conhecimento.*

*À equipe do **Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal – LCGA**: Ana Liza Paz Souza, Andreia Maria Silva; Arthur Emanuel de Araújo Lago, Caio Sérgio Santos, Carlos Alexandre Apolinario de Carvalho, Erica Camila Gurgel Praxedes, Gislaynne Peixoto, Marina Crisley Gondim Rebouças, Keila Moreira Maia, Livia Batista Campos, Luana Grasielle Pereira Bezerra, Samara Sandy Jerônimo Moreira e Lizziane Constância Nunes de Oliveira Fernandes pelo período de convivência e o imenso aprendizado, ..., cada dia foi*

um exercício para o meu autoconhecimento. Individualmente pela participação, seja direta ou indireta, agradeço a disponibilidade, não mensurando a atuação e sim a relevância do auxílio na elaboração desta Tese: durante todo esse período, dos mais diversos modos e direções, cada ação foi fundamental para minha evolução, principalmente pessoal.

A todos do **Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada – LABMORFA**. Ao prof. Dr. Moacir Franco Oliveira pela confiança e disponibilidade; ao colega Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra: o tempo de convívio é incapaz de mensurar a valiosa contribuição para a construção do meu conhecimento, grata por toda disponibilidade e presteza.

À toda equipe do **Laboratório de Medicina Interna Veterinária – LABMIV**: ao coordenador prof. Dr. Raimundo Alves Barrêto Junior e todos da equipe, que foram o ponto inicial de todo experimento: lidar com os jumentos não é tarefa de todo fácil! Por me acolher tão bem, apesar do “segredo”, o que mostra o quanto vocês são solidários: Enrico Lippi Ortolani; Antônio Humberto Hamad Minervino; Francisco Jocelmo Alexandre de Souza; Rejane dos Santos Sousa; Jerson Marques Cavalcante; Nayanna Brunna Silva Fonseca; Joseney Maia Lima; Luis Cláudio Lopes Correia da Silva; Flávio Ribeiro Alves; Aline Cavalcante da Costa; Jucélio Lopes Correia de Paiva; Clara Satsuki Mori. Aos prof. Dr. Luís Cláudio Lopes Correia da Silva e ao Médico Veterinário Júlio Spagnolo, em especial à Dra. **Isabella** de Oliveira Barros, por dividir comigo as emoções do início do experimento e sempre demonstrar o verdadeiro espírito pesquisador, constantemente compartilhando dados e conhecimentos.

Ao **Laboratório de transplantes Gonadais e Produção In vitro de Embriões - LTG-PIVE**, nosso “vizinho do açúcar” sempre nos socorrendo: como não destacar sua relevância. Ao Prof. Dr. **Marcelo** Barbosa Bezerra reconhecimento a presteza de sempre me atender. Ao amigo Marcelo gratidão imensamente por seu zelo a mim e a minha bruguela, as vezes uma briga é a forma mais delicada de carinho :-). Às colegas **Fernanda** Araújo dos Santos, por socorrer-me sempre que solicitada, e **Muriel** Magda Lustosa Pimentel, por mais que tenha sido curto o tempo de convivência, a ajuda foi significativa.

À toda Equipe de Anestesiologia: à prof.^a Dra. **Valeria** Veras Paula e às colegas: **Talyta** Lins Nunes, **Ariana** Lopes, Maria **Alice** Pires Moreira, Maria **Gláucia** Carlos de Oliveira, pelo suporte anestésico e o comprometimento com a manutenção do bem-estar dos animais.

À todos da “**Peleja do Jumento**” que abraçaram a luta em prol da defesa dos nossos irmãos, participando em conjunto dessa jornada paralela, impossível agradecer a todos, mas em destaque, **Patrícia** Alecrim Moraes por ter abraçado a causa, **Marcelo** Buainain pelo registro fantástico, **Geuza** Leitão, **Kidelmir** Dantas, **Valdir** Fonseca, **Crispiniano** Neto, **Aliathar** Gibson, Deputado **Ricardo Izar**, ... à todos que se propuseram a serem racionais e humanos!!!

Ao prof. **Fernando Viana** Nobre, que provavelmente está em lugar privilegiado, diretamente intervindo por nossos irmãos, os jumentos. Que toda sua força, paixão e serenidade permaneça nos fortalecendo e guiando para um desfecho com final feliz e seguro

para eles. Foi uma imensa honra trabalhar com o senhor e um orgulho imensurável quando o senhor me chamava de “professora”.

À minha terceira casa... quantos tem esse privilégio?!?! Não há como agradecer todo apoio e compreensão por parte dos amigos/colegas da UnP - Universidade Potiguar. À Todos os Coordenadores, colegas, APAs (assistente de processos administrativos), assistentes, bedéis,... Em destaque os chefes, parceiros mais sensacionais que alguém podia desejar Francisco **Adalberto** Pessoa de C Segundo, **Brenny** Dantas de Senna e **Felipe** Lira Formiga Andrade, grata por me auxiliar a “desenrolar” nessa fase; às “Patroas”/amigas **Wendy** Karla Medeiros de S Bezerra, **Hannah** Lerissa Hydaradaya M Santos. E como não destacara profª **Catarina** Pinheiro, a super-chefe, que com grande generosidade assimilou toda a minha condição, não só compreendendo, mas apoiando, servindo de exemplo pela força, determinação e competência. À todos vocês: minha eterna gratidão e reconhecimento.

À equipe de Gerência de Pesquisa e Extensão/UnP que seguraram minha barra... e foram mais que colegas nessa trajetória final **Everkley** Magno e **Camila** Oliveira, vocês foram um grande suporte.

Aos amarelinhos, minions, minions maus, cacho de uva, roxinhos, gasparzinhos.... nesses últimos anos, de miniatura (**Kamilla** Katinllyn dos Santos) à braços extras (**Simone** Reinaldo), ganhei mais que apoio, e tenho certeza que alguns alunos cruzam nosso caminho para nos ensinar mais do que nós como professores conseguimos ensiná-los, obrigado a todos: o suporte de vocês foi imprescindível.

Aos quase 8mil alunos distribuídos nos cursos de Engenharia agrônômica, Zootecnia, Medicina Veterinária (por despertarem em mim o desejo de lecionar) e aos alunos de graduação em CST em Segurança no trabalho, CST em Gestão Ambiental, CST em Petróleo e Gás, Arquitetura e Urbanismo, Engenharia Mecânica, Engenharia Civil, Engenharia de Produção, Educação Física, CST em Marketing, Ciências Contábeis Direito, Farmácia e os da pós graduação em Engenharia de Segurança do Trabalho, Energias Renováveis, Mba Executivo em Estratégias de Negócios, Executivo em Gestão de Pessoas, Executivo em Gestão Financeira, Esp em energias renováveis: citar todos os seus nomes seria impossível, mas a todos que conviveram comigo durante este período de aluna/professora, grata pela compreensão e colaboração para me tornar uma docente/discente melhor.

A **Karisa** Lorena Pinheiro, minha ex e futura chefe, colega, amiga, prima, comadre... tenho certeza que se não fosse por tudo que aprendi com você, não teria conseguido transpor muitos obstáculos durante esse processo... uma certa “quiromântica” falou que eu tinha um anjo protetor muito forte, creio muito nela, por que conseguir uma amiga igual a você só pode ser obra de alguém que gosta muito de mim lá em cima...o convívio com “Madre Tereza Poliana Gautama Gandhi” preparou-me para o melhor e para o pior.

... aproveitando a deixa da “quiromântica”, a maturidade, experiência, ... ou porradas da vida mesmo, mostraram me que às vezes ocorrem coisas para as quais não há explicação mais lógica do que ter ocorrido única e exclusivamente para me ajudar (pretensão eu sei, mas...). Acredito mesmo nisso, e não tenho dúvida que alguém lá em cima vendo meu

momento de desespero enviou você para me “salvar”. Muito, muito, muito... obrigada, **Dra. Viviane** Saraiva, foi até difícil no início conseguir chamar assim a Vivi, mas impossível não a ver assim diante de tamanho comprometimento e profissionalismo. Você é a personificação de todos os contos e poemas do que é ser uma verdadeira mestre. Grata, não por segurar, mas agarrar na minha mão. Se não fosse você e Kleber minha serenidade teria se perdido.

À **Regina** Valéria da Cunha Dias, PARTE DOIS pelo apoio, muitas vezes servindo de muro das lamentações, conseguido estar sempre presente, dividindo com Kleber a função de “**Divã**”, mesmo muitas vezes virtualmente: obrigada por sempre estar ao meu lado.

À Raimundo Alves **Barrêto** Júnior ... não se agradece amizade, nem existe como, quem sabe uma outra tese...sempre falo que amizades verdadeiras é para a vida toda, e a nossa e bem comprovação disso, mesmo com os anos, a distância, ... saber que em todos os momentos, com uma simples ligação você estaria ali, sempre prestativo a me ajudar, ouvindo, aconselhando e até mesmo brigando...nestes agradecimentos seu nome está em quase todas as fases do processo e teria sido muito mais difícil se não tivesse a segurança que sempre poderia contar com você. Eternamente grata e recíproca ao apoio, Sr Leôncio!!!

À todos aqueles que fizeram parte desta história de vinte e três anos de Esam/Ufersa, principalmente aos meus “irmãos” amigos incondicionais, **Flavia Moura, Oscar Bezerra, Ylanna Burgos, Polyanna Dantas**, ... a todos os de “sangue verde” da DNA (Defesa da Natureza e dos animais), por estarem comigo sempre.

E como não agradecer a Oleg Kuzukov, Andrei Dobrunov, Dmitry Loveiko por “Masha e Misha” e ao Jan Koum pelo whatsapp: vocês são os criadores das melhores ferramentas de salvação que existem!

À todos os meus “**amigos de infância e que estarão comigo por toda vida**” pois me ensinaram a amar cada animal e me deram as primeiras lições veterinárias: **Totó, Lessie, Jabuti, Jack, Jobel, Jaqueline, Pelé, Tauros, Bob, Niki, Nikita**, as “**Nigra**”, os “**Popó**”, **Hulk, Bob Coco, Yanka, Kate, Tof, Nix, Rock, Adna, Mist, Mel, Nagan, Judy, Sophia, Brighth, Lilo e Stitch, Yang** ... e a que convive comigo hoje **Kira**.

...e à todas as pessoas que foram capazes de me desejar ao menos um “**Bom dia**” com sinceridade.

Resumo

Os jumentos (*Equus asinus*) são animais historicamente relevantes para a ocupação de áreas inóspitas em todo o mundo, mas tem perdido espaço devido à modernização dos centros urbanos e a mecanização agrícola e transporte motorizado. Assim, muitas raças de jumentos já foram extintas ou encontram-se em rápido processo de queda populacional, e dentre elas está a raça Nordestina, endêmica do Brasil. Uma das estratégias de conservação é o uso de biotecnologias que favoreçam a reprodução assistida, como a manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) que maximiza a disponibilidade de oócitos para outras biotécnicas. O ponto de partida para o uso desta e outras biotécnicas é conhecer detalhes da fisiologia reprodutiva e dos gametas da espécie ou raça que se deseja manipular. O objetivo desta tese é caracterizar e conservar por meio da vitrificação a população de folículos ovarianos pré-antrais (FP) em fêmeas asininas da raça Nordestina. No primeiro experimento, dez fêmeas com idade média de $5,1 \pm 3,2$ anos e peso médio de $105,2 \pm 18,6$ kg, constituíram o grupo de estudo. As mesmas foram submetidas a procedimento de ovariectomia guiada por laparoscopia para coleta dos ovários. Assim como nos demais equídeos, os ovários das jumentas apresentam formato reniforme e suas zonas parenquimatosa, incluindo a fossa ovariana, foram extraídas. Fragmentos do ovário foram fixados com carnoy, desidratados com etanol em concentrações crescentes (70 a 99%), clarificados usando xilol e finalmente inclusos em blocos de parafina histológica. Estes blocos foram sequencialmente seccionados em micrótomo em frações de 7µm. Uma a cada 120 frações foi montada em lâminas de vidro e corada com hematoxilina-eosina e lida em microscópio ótico. Os FPs que apresentaram núcleo visível foram fotografados, mensurados com uso de software e classificados como primordiais, primários e secundários. Os FPs classificados e contados foram identificados como normais ou degenerados. A população de FPs foi estimada usando a fórmula: (número de PF observados $\times$ número total de secções $\times$ espessura das secções) dividido pelo (número de secções observadas $\times$ diâmetro médio do núcleo dos oócitos). A população média estimada foi de $21.135,3 \pm 10.646,1$ FPs por animal. Destes, 91,3% foram identificados como primordiais, 8,2% como folículos primários e 0,4% como secundários. Folículos com múltiplos oócitos foram observados em todos os animais, todos classificados como primordiais, representando 0,99% do total de folículos. A população de PF estimada estava distribuída entre os ovários direito e esquerdo, em 54,6% e 45,4% respectivamente. A maior parte dos PFs foi considerada morfolologicamente normal (90,2%) e a menor parcela, degenerados (9,8%). Foi identificada uma relação inversamente proporcional entre a idade e a população folicular, semelhante à relação entre peso e população folicular. No segundo experimento, o tecido ovariano de jumentas foram submetidos a procedimento de vitrificação em superfície sólida usando dimetil sulfóxido (DMSO) e etileno glicol (EG), isoladamente em diferentes concentrações (3M e 6M) e associados, como agentes crioprotetores. Quando comparados aos tratamentos o uso do DMSO 3M ($81,7 \pm 37,5\%$), EG 3M ($83,7 \pm 27,4\%$) e a combinação de DMSO 3M + EG 3M ($81,8 \pm 46,8\%$) apresentaram um grande percentual de folículos morfolologicamente normais. O uso do DMSO 3M + EG 3M, apresentou o maior percentual ($62,5 \pm 29,1\%$) de folículos viáveis em relação aos demais tratamentos ($P < 0,05$). Pela técnica TUNEL, todos os tratamentos apresentaram fragmentação de DNA nas células foliculares, exceto no caso do DMSO 3M + EG 3M. Quando avaliada a presença de NORs, não foi verificada diferenças significativas entre o número de NORs no grupo controle e no tratamento DMSO 3M + EG 3M ($P < 0,05$). A combinação DMSO 3M e EG 3M mostrou-se mais eficiente para a vitrificação de tecido ovariano de jumentas, apresentando-se de forma adequada para a preservação da morfologia e viabilidade de folículos pré antrais, bem como a integridade do DNA e a capacidade de proliferação celular. Este trabalho apresentou de forma inédita a estimativa de folículos pré-antrais ovarianos em jumentas da raça nordestina bem como uma estratégia de criopreservação com resultados positivos.

Palavras-chave: Asininos, Foliculogênese, Ovário, Oócito, Células da granulosa.

Abstract

LOPES, K.R.F. **Characterization and cryopreservation of the population of preantral ovarian follicles in donkeys (*Equus asinus*) of the Northeastern Brazilian breed.** Federal Rural University of the Semi-arid. Mossoró/RN, Brazil. 2017.

The donkeys (*Equus asinus*) are individuals historically relevant for the occupation of inhospitable areas around the world, but they have been losing importance due to the modernization of urban centers and the creation of traction and cultivation technologies. Due to this fact, many donkey breeds are already extinct or passing through a rapid process of population decrease. Among these breeds, the Northeast donkey, an endemic breed in Brazil, is highlighted. One of the strategies for conservation is the use of biotechnologies that facilitate reproduction, such as the manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles (MOEPF) that maximize the availability of oocytes for *in vitro* fertilization. The starting point for the use of this and other techniques are known reproductive physiology details of this breed as the characteristics of their gametes. The objective of this study was to estimate and to characterize the population of ovarian PFs derived from Northeast breed donkeys. Twenty females aging 5.1 ± 3.2 years and weighing 105.2 ± 18.6 kg were used. Animals were subjected to an ovariectomy procedure guided by laparoscopy for ovary collection. As the equines, donkey ovaries presented a kidney form and their parenchymal zone were extracted, taking the ovulation fossa as basis. Fragments of ovary were fixed in Carnoy, dehydrated in increasing Ethanol concentrations (70 to 99%), clarified using xylene and finally included in histological paraffin wax blocks. These blocks were serially sectioned on 7 μm slices at using a microtome. Every 120th slice was mounted on glass slides, stained with hematoxylin–eosin and read in inverted optical microscope. PFs presenting visible oocyte nuclei were measured at using an ocular micrometer and classified as primordial, primary or secondary. PFs were also classified and counted as morphologically normal, when containing an oocyte with regular shape and uniform cytoplasm, and organized layers of granulosa cells; or as degenerated, when the oocyte exhibited pycnotic nucleus and/or ooplasm shrinkage, and occasionally, granulosa cell layers became disorganized, detached from the basement membrane and/or included enlarged cells. The PF population was estimated by using the formula: $(\text{number of follicles} \times \text{number of sections} \times \text{thickness of sections})/(\text{number of sections observed} \times \text{range of oocyte nuclei diameter})$. The results allowed us to estimate a total population of $21,135.3 \pm 10,646.1$ PFs per animal. From this population, 91.3% PFs were classified as primordial, 8.2% PFs as primary, and 0.3% as secondary. multioocyte PFs were observed in all animals, and they were more frequently present in primordial follicles, representing 0.99% of total PFs counted. The estimated population was distributed between the right and left ovaries, at 54.6% and 45.4%, respectively. Most PFs were considered morphologically normal (90.2%) and the smallest, degenerate (9.8%). An inversely proportional relationship between age and follicular population was identified, similarly to the relation between weight and follicular population. In the second experiment, the ovarian tissue of animals from the same group was subjected to a vitrification procedure using dimethylsulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG) as cryoprotectants in separate and associated. When comparing treatments, the use of DMSO 3M ($81.7 \pm 37.5\%$), EG 3M ($83.7 \pm 27.4\%$) and the combination of both DMSO 3M + EG 3M ($81.8 \pm 46.8\%$) allowed a greater percentage of follicular survival. When vitrified using the DMSO + EG combination, a higher percentage ($62.5 \pm 29.1\%$) of viable follicles was observed in relation to the other vitrification treatments ($P < 0.05$). The TUNEL technique identified that all treatments tested showed DNA fragmentation in the follicular cells, except in the case of the DMSO 3M plus EG 3M treatment. When evaluating the presence of NORs, no significant differences were observed in the amount of NORs between the fresh and vitrified groups using DMSO 3M plus EG 3M ($P > 0.05$). Thus, we concluded that the combination DMSO 3M plus EG was more efficient for the vitrification of ovarian tissue taken from *Equus asinus*, allowing adequate preservation of PAFS morphology, viability, DNA integrity and cell proliferative capacity. This work presented for the first time the estimate of ovarian preantral follicles in donkeys of the Northeastern breed and successful vitrification.

Key-words: Asinines, Folliculogenesis, Ovary, Oocyte, Granulosa cells.

Lista de Figuras

Figura 01 – Exemplos das 3 raças de jumentos predominantes e endêmicas do Brasil: (A) Jumento Brasileiro macho (Melo, 2014); (B) Jumento Pêga macho (Pashoal, 2014); (C) Jumento Nordestino macho.	27
Figura 02 – Estimativa da população de asininos no Brasil e no Nordeste desde o início da série histórica do IBGE (IBGE, 2016)	28
Figura 03 – Diagrama esquemático do ovário do equídeo. Fonte: (Deafenbaugh, 2012)...	30
Figura 04 – Foliculogênese e influência hormonal. Adaptado de (ANSH Labs, 2015).....	35
Figura 05 – Diagrama esquemático comparativo dos métodos de criopreservação tradicional e a vitrificação	39

Figuras do Artigo 02

Figure 01 - A) Ovary of jennies of the Northeastern Brazilian breed with reniform shape; B) Ovary of jennies of the Northeastern Brazilian breed with a discoid format;.....	85
Figure 02 - Preantral follicles and the different thicknesses of the granulosa cell layers: A) primordial follicle; B) Multioocyte primordial follicle; C) primary follicle; D) secondary follicle. Optical microscopy with 40x magnification.	87
Figure 03 - Correlation between ages and estimated ovarian follicular population of donkeys of the Northeastern Brazilian breed.	90

Figuras do Artigo 03

Figure 01 – Experimental design.....	113
Figure 02 – Morphology of Preantral follicles: Control group (A: normal and A': degenerate); vitrified groups containing DMSO 3M (B: normal and B': degenerate) and DMSO 3M plus EG 3M (C: normal and C': degenerate). Scale bar: 50µm (A and A'); 25µm (B,B',C and C').	118
Figure 03 – Analysis of apoptosis in sections of ovarian donkey tissue (<i>Equus asinus</i>) using the TUNEL apoptosis detection kit: Negative control (A); Positive control marked with DAPI (A'); Negative control of kit (B); Positive control of kit (B'); Group vitrified with DMSO 6M (C and C' - positive reaction); Group vitrified with DMSO 3M + EG 3M (D and D' - positive reaction). Arrow: follicles. Scale bar: 50µm	120

Figure 04 - Nucleolus-organizing regions (Ag-NORs) in asinine ovarian preantral follicles. Fresh control (A); vitrified using the combination DMSO 3M + EG 3M (B). Scale bar: 10µm. 121

Lista de Tabelas

Tabelas do Artigo 02

Table 1 - Estimated age (EA - years), Weight (kg), morphometry of ovaries (Length x Mean Width [LxW - mm] and Weight of ovary [Wo-grams]) and gonadosomatic index (GSI; %) of Northeast Brazilian donkeys.....	86
Table 2 - Morphometry (μm) of the oocyte nucleus, oocyte and ovarian follicles by category, as well as the size of the granulosa layer in the follicles of the Northeastern donkeys.....	88
Table 3 - Estimate of the population (Mean $\pm$ Standard Deviation) of preantral follicles in the ovarian pair of Northeastern breed donkeys.....	88
Table 4 - Morphological integrity of preantral ovarian follicles of Northeastern donkeys, distributed by follicular category and presence of multioocyte follicles (MOF).	89
Table 05 - Correlations between weight and age with morphometry and ovarian follicular population variables in Northeastern Brazilian jennies.	89

Tabelas do Artigo 03

Table 01 – Analysis of morphology and viability of asinine preantral ovarian follicles before (control) and after solid surface vitrification (SSV) using dimethyl sulfoxide (DMSO) or ethylene glycol (EG) isolate at different concentrations or in combination (DMSO or EG).	118
--	-----

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMH:	Anti-Müllerian Hormone. Português: hormônio anti-Mülleriano;
ART:	Assisted reproductive technique. Português: técnica de reprodução assistida
BMP:	Bone morphogenetic proteins. Português: Proteína Óssea Morfogenética;
CENARGEN:	Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos e Biotecnologia;
CEUA:	Comitê de Ética de Uso de Animais. Inglês: Ethics Committee on Animal Use;
CGP:	Células germinativas primordiais;
CIV:	Cultivo <i>in vitro</i> ;
CPA:	cryoprotectants agents. Português: Agentes crioprotetores;
DMSO:	Dimetil sulfoxido;
DNA:	Deoxyribonucleic acid. Português: ácido desoxirribonucleico;
EG:	Etilenoglicol;
EGF:	Epidermal growth factor. Português: fator de crescimento epidermal;
FCS:	Fetal calf serum. Português: Soro fetal bovino;
FIV:	Fertilização <i>in vitro</i> ;
FOPA:	Folículos pré-antrais;
FSH:	Follicle stimulating hormone. Português: hormônio folículo estimulante;
GDF:	Growth differentiation factor. Português: Fator de Crescimento e Diferenciação;
GLI:	Glicerol;
GnRH:	Gonadotropin-Releasing Hormone. Português: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas;
GSI:	Gonadosomatic index. Português: índice gonadosomático;
hCG:	Human chorionic gonadotropin. Português: gonadotrofina coriônica humana;
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

IA:	Inseminação Artificial;
ICSI:	Intracitoplasmatic Sperm Injection. Português: injeção intracitoplasmática de espermatozoide;
LCGA:	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal. Inglês: Animal Germplasm Conservation Laboratory;
LH:	Luteinizing hormone. Português: hormônio luteinizante;
LMVI:	Laboratório de Medicina Veterinária Interna. Inglês: Laboratory of Internal Veterinary Medicine;
MEM:	Minimum Essential Medium. Português: meio essencial mínimo;
MIV:	Maturação <i>in vitro</i> ;
MOIFOPA:	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais;
MOF:	Multioocyte follicle. Português: folículos multioócitos;
NOR:	Nucleolar Organizing Regions. Português: região organizadora do nucléolo;
PAF:	Preantral follicles. Português: folículos Pré-antrais;
PBS:	Phosphate Buffer Saline. Português: Tampão fosfato-salino;
PROH:	Propanodiol;
RIISPOA:	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal;
RNA:	Ribonucleic acid. Português: ácido ribonucleico;
SSV:	Solid Surface Vitrification. Português: Vitrificação em superfície Sólida;
TE:	Transferência de embriões;
TNCS:	Transferência nuclear de células somáticas;
TUNEL:	Terminal Deoxyribonucleotide Transferase-mediated dUTP Nick-end Labeling.
UFERSA:	Universidade Federal Rural do Semi-Árido;

Lista de Símbolos

Ag:	prata
cm:	centímetro
g:	grama
h:	hora
kg:	quilograma
M:	molar
mg:	miligrama
min:	minuto
mL:	mililitro
mm:	milímetro
N ₂ :	nitrogênio líquido
ng:	nanograma
s:	segundo
μL:	microlitro
μm:	micrômetro
%:	Percentual
°C:	grau Celsius
UI	unidade internacional

Sumário

1. Introdução	21
2. Revisão de Literatura.....	24
2.1 Os Asininos.....	24
2.2 Aspectos anátomo-fisiológicos do aparelho reprodutor feminino de asininos	29
2.3 Oogênese e foliculogênese.....	32
2.2 Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais	35
2.3 População folicular ovariana.....	37
2.4 Conservação de tecido ovariano	38
2.5 Crioprotetores	40
3. Justificativa.....	43
4. Hipóteses científicas	44
5. Objetivos.....	45
5.1 Geral.....	45
5.2 Específicos	45
6. Referências Bibliográficas.....	46
7. Capítulo I.....	59
Perspectivas de aplicação de biotécnicas reprodutivas para a conservação e multiplicação de fêmeas asininas	59
8. Capítulo II.....	76
Characterization of the ovarian preantral follicles population and its correlation with weight and age in Brazilian Northeastern donkeys (Equus asinus).....	76
9. Capítulo III	108
Vitrification of ovarian tissue of Brazilian Northeastern donkey breed (Equus asinus) using different cryoprotectants	108
10. Conclusões.....	132

Considerações e perspectivas	133
Anexos – Produções adicionais	134
Anexo 01 – Castração química de mamíferos machos: revisão in Revista Brasileira de Reprodução Animal	135
Anexo 2 –Asininos: associação com assentamentos humanos in Anais XXXII Encontro anual de Etologia & V Simpósio Latino-americano de Etologia.....	141
Anexo 3 –Estimativa da população de folículos ovarianos pré-antrais da raça de Jumento Nordestino Brasileiro in Anais do XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal	145
Anexo 4 – Vitrificação do tecido ovariano de jumento nordestino (Equus asinus) utilizando diferentes crioprotetores. Resumo submetido ao RENORBIO 2017: Encontro de Biotecnologia do Nordeste	147
Anexo 5 - Comunicado da Submissão do 2º Artigo/Capítulo II.....	149
Anexo 6 - Comunicado da Submissão do 3º Artigo/Capítulo III	150

1. Introdução

O fenômeno do abandono dos animais domésticos e de produção cuja utilidade é questionada, está se tornando frequente nos aglomerados humanos de todos os portes. Estes animais, uma vez vivendo sem a supervisão humana, adaptam-se bem aos ambientes, mas não sem causar transtornos, desde acidentes à prevalência de zoonoses (Carneiro *et al.*, 2014; Rogoski *et al.*, 2016). No nordeste do Brasil, vem se destacando a presença de asininos que vivem livres por seus próprios esforços, ou que são submetidos a manejo inadequado, permanecendo a maior parte do tempo soltos. Sendo animais de grande porte, ao permanecerem no entorno das estradas em busca de alimento ou água, frequentemente envolvem-se em incidentes rodoviários (Lima e Lopes, 2014). Embora esta presença enseje a percepção de que há superpopulação destes animais, muito contrariamente, a população decai a cada levantamento (IBGE, 2016), o que representa uma perda inestimável de patrimônio genético e cultural.

Sendo restritos os estudos sobre a espécie, ainda mais sobre a raça Nordestina, faltam subsídios para a criação de políticas públicas acerca do seu controle populacional, bem como o desenvolvimento de estratégias de conservação desta raça endêmica da região Nordeste do Brasil. O passo inicial para sanar este déficit deve ser, portanto, conhecer de forma profunda a raça, estendendo o que pesquisadores pioneiros iniciaram nos anos 80 (Nobre, 1980; Azevedo *et al.*, 1984). Conhecer detalhes da reprodução destes animais possibilitará o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas e permitirá melhor gestão da população, da conservação do patrimônio genético e, potencialmente, abrir um leque de opções do emprego racional e ético da raça.

As estratégias de estudo das células reprodutivas em asininos concentram-se nos machos, dada a sua relevância na produção de mulas. Assim, técnicas de colheita de sêmen (Moraes *et al.*, 1994), criopreservação de sêmen (Canisso, 2008; Fernandes, 2012) e inseminação artificial (Guedes, 2014) foram descritas em diversos estudos; entretanto, para os gametas femininos, os estudos são escassos e não abrangem toda a foliculogênese (Ker, 2013).

Neste contexto, tem sido ressaltada a aplicação da biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais (MOIFOPA), atualmente também chamada

Tecnologia do Ovário Artificial, a qual consiste em capturar e manipular *in vitro* os folículos em suas etapas iniciais de desenvolvimento, e realizar em ambiente controlado o que naturalmente ocorreria no interior dos ovários (Figueiredo *et al.*, 2007). A referida técnica tem sido utilizada em equinos (Búfalo *et al.*, 2016), bovinos (Silva-Santos *et al.*, 2011) e outras espécies, para auxiliar no conhecimento de detalhes da população folicular ou para realizar a criopreservação (Gomes e Seneda, 2015) e o cultivo destes folículos, a fim de se obter células reprodutivas maturadas (Green e Shikanov, 2016).

Em asininos a MOIFOPA poderá viabilizar o estudo e recuperação de uma grande quantidade de oócitos para serem utilizados em outras biotécnicas, podendo incrementar o potencial reprodutivo deste grupo de animais. Além das etapas de caracterização, isolamento, cultivo *in vitro* (CIV) e maturação *in vitro* (MIV), a MOIFOPA compreende ainda a preservação do material genético durante curtos (resfriamento) ou longos períodos (criopreservação) de tempo, permitindo a criação de bancos de germoplasma. O sucesso na recuperação de oócitos íntegros após o processo de preservação depende de diversos fatores, além dos inerentes de cada espécie, como a escolha da estratégia de resfriamento e descongelação bem como a aplicação dos crioprotetores adequados (Moussa *et al.*, 2014; Keros e Fuller, 2015; Argyle, Harper e Davies, 2016). Foi detectado que o etilenoglicol é mais permeável em blastocistos equinos que o glicerol e os crioprotetores altamente permeáveis podem ser mais apropriados para o congelamento de oócitos equinos do que os embriões, uma vez que os oócitos exigem um período de exposição mais longo para se tornar totalmente permeado. Os ovócitos equinos imaturos puderam ser amadurecidos ao estágio MII *in vitro* após congelamento e descongelamento em etilenoglicol ou 1,2 propanodiol, mas não em glicerol, e os espermatozoides puderam penetrar oócitos imaturos e maduros após congelação e descongelação em etileno glicol e foram pronúcleos morfologicamente normais (Hochi *et al.*, 1994).

Dentre as técnicas de criopreservação, a vitrificação como uma eficiente biotécnica de criopreservação (Kagawa *et al.*, 2015; Wakchaure *et al.*, 2015), tanto por ser um procedimento de fácil condução, sem equipamentos complexos, como por ter uma execução rápida. Além disso, esta técnica tem apresentado resultados promissores em espécies similares aos asininos, como os equinos (Canesin *et al.*, 2016), em que foram usados diferentes tempos de congelação e concentrações de dimetilsulfoxido (DMSO) e etilenoglicol (EG) como crioprotetores, com sucesso no posterior cultivo dos oócitos. Estudo

com oócitos equinos imaturos apontam que um menor tempo de exposição aos crioprotetores (que na vitrificação, dentre outras ações, assumem papel de desidratar e minimizar a formação de cristais de gelo) determina uma maior taxa de recuperação de oócitos passíveis de maturação (Curcio, 2006). Desse modo, o estabelecimento de protocolos para a vitrificação de tecido ovariano em asininos tem potencial de conduzir a uma nova fronteira na conservação das diversas raças desta espécie que estejam em risco de extinção no mundo, ao levar o foco das pesquisas futuras para os gametas femininos, uma área pouco explorada em se tratando de equídeos.

2. Revisão de Literatura

2.1 Os Asininos

Os Equídeos são animais que tiveram, e têm, participação ativa no desenvolvimento socioeconômico da humanidade: guiando povos nômades a fontes de água; como fonte proteica, através da carne e/ou leite; como transporte para materiais e pessoas; sendo personagem principal em algumas grandes conquistas e influenciando o destino de reinos e nações (Brereton, 1976; Greenwood, 2008; Stanley, 2011). Foram essenciais para o desenvolvimento tecnológico da agricultura que culminou com o incremento da produção para abastecer a crescente população humana (Clutton-Brock, 1992; Langdon, 2002). Além disso, são reconhecidamente animais versáteis que firmaram ao longo da história laços, inclusive afetivos, com a espécie humana. Nenhum outro animal doméstico ocupou um lugar tão importante no processo de desenvolvimento social e político (Bowling e Ruvinsky, 2000).

Dentre os equídeos, o subgênero *Asinus*, que compreende os jumentos (Beja-Pereira *et al.*, 2004), tem importância histórica, que remete ao início da agricultura, entre 7 a 10 milênios atrás, quando provavelmente foram domesticados (Blench, 2000). Estudos genéticos com DNA mitocondrial apontam a origem dos jumentos modernos como sendo a África, mais especificamente de dois troncos, o Núbio e o Somali (Beja-Pereira *et al.*, 2004). Por outro lado, estudos de similaridade genética apontam três grandes centros ou áreas onde provavelmente ocorreu a domesticação dos jumentos: Nordeste da África, Península Arábica e Ásia ocidental (Zeder, 2006).

A existência nas Américas não ocorreu por correntes migratórias ou outros mecanismos de disseminação de populações, mas sob ação humana. Os registros históricos apontam a inexistência de animais de interesse zootécnico quando da chegada dos Europeus. Embora não haja consenso sobre o ingresso dos primeiros asininos, há evidências documentais da introdução de cavalos e asnos através de várias expedições portuguesas e espanholas nas primeiras décadas do século XVI (Vieira, 1964). Além disso, evidências genéticas de jumentos das Américas apontam suas origens para linhagens oriundas das raças Andaluz e Catalã, ambas da península ibérica (Jordana *et al.*, 2016).

Animais extremamente resistentes, os asininos toleram uma ampla gama de condições climáticas, do árido ao frio intenso, e se distribuem geograficamente em todo o mundo (Starkey e Starkey, 2000). Para tanto, possuem várias adaptações corporais, como as orelhas para auxiliar a termorregulação (Jones, 2009). Seu sistema digestivo resistente pode digerir qualquer tipo de vegetação, inclusive xerófitas, e extrair nutrientes dos alimentos de forma eficiente (Izraely *et al.*, 1989; Pugh, 2002).

Os jumentos são animais dóceis, amigáveis, calmos, pacientes e fáceis de se manusear, inteligentes e até brincalhões; cautelosos, mas ágeis em locais acidentados e de topografia irregular. São ansiosos para aprender e desfrutar da companhia dos humanos (Beja-Pereira *et al.*, 2004). Devido a estas características, foram elencados para trabalho em áreas difíceis, tornando-se ferramentas essenciais na labuta, inclusive no nordeste brasileiro onde por vezes foram a única alternativa de transporte entre regiões pobres, principalmente no transporte de água em períodos de estiagem (Almeida, 2011).

A adaptação contínua dos animais aos diversos climas e geografia do Brasil fez com que surgissem três raças distintas: a Brasileira (ou Paulista), a Pêga e a Nordestina.

A raça Brasileira (Figura 01A), desenvolveu-se de cruzamentos de linhagens sicilianas e portuguesas, especialmente na região de São Paulo, motivo pelo qual também são denominados de Paulistas. São considerados bons animais para monta com sela, e possuem constituição física forte, com pescoço grosso e reforçado, orelhas eretas e focinho reto, cernelha de pelo menos 1,20m e pelagem quase sempre ruã (ou ruão), caracterizada por uma mistura de pelos brancos e coloridos no corpo, enquanto a cabeça e as extremidades do animal tem cores uniformes e sólidas (Torres e Jardim, 1992).

A raça Pêga (Figura 01B) surgiu no interior do Brasil, predominantemente em Minas Gerais onde teve importante papel no ciclo da Mineração, assim como no desbravamento do interior do país. São os maiores jumentos dentre as raças brasileiras, tendo altura de cernelha superior a 1,30m, com pernas longas, corpo compacto e forte, traseiro cheio e pelagem quase sempre branca, sugerindo cruzas com a raça egípcia com a qual mantém relação genética, além da forte origem Ibérica (Pugh, 2002). Na contramão das demais raças do Brasil, a raça Pêga encontra-se em plena valorização pelo enorme potencial genético na geração de mulas (Souza, 2007).

O jumento Nordestino (Figura 01C) é a menor das três raças e começou a ser descrito como raça em meados do século XX (Mello, 1953; Vieira, 1964), tendo sempre como destaque a sua pequena estatura, pelos curtos, pouco acúmulo de gordura e agilidade. Todas estas características são consideradas como adaptações ideais para a região semi-árida do Brasil, decorrentes de séculos de cruzamentos entre os mais aptos, adaptações confirmadas quando os primeiros estudos zootécnicos foram realizados nos anos 80 (Nobre, 1980; Azevedo *et al.*, 1984). São animais com altura média de 1,0m em uma cernelha definida, suave (não proeminente), musculosa e, de preferência, em nível com a garupa; costelas fortes e separadas, conferindo boa amplitude torácica; tronco relativamente longo, mais ou menos proporcional à altura na cernelha. A ossatura é seca e resistente, com tendões delicados, pele de pigmentação escura e pelos finos. A cabeça tem tamanho médio, seca, de comprimento proporcional ao pescoço e despontada para o focinho, com perfil retilíneo ou ligeiramente sub-convexo; possui orelhas grandes, firmes, bem implantadas, bem dirigidas e de largura média; a boca de abertura média, lábios finos, móveis, firmes e justapostos; as narinas são grandes, largas e flexíveis. O pescoço é médio, proporcional à cabeça com crinas ralas e finas. A cauda é curta com pelos reduzidos. Os membros posteriores são médios, com ligeira cobertura muscular e bem articulados; os antebraços médios, retilíneos e com cobertura muscular delgada; joelhos grandes, resistentes, secos e na mesma direção do antebraço. As coxas e pernas são medianas e musculosas (Azevedo *et al.*, 1984). São animais adaptados a regiões secas, à alimentação pobre em nutrientes e a longas jornadas de trabalho.



Figura 01 – Exemplos das 3 raças de jumentos predominantes e endêmicas do Brasil: (A) Jumento Brasileiro macho (Melo, 2014); (B) Jumento Pêga macho (Pashoal, 2014); (C) Jumento Nordeste macho.

Os jumentos exercem ainda hoje um outro papel econômico que é o de gerar descendentes híbridos com cavalos, os muares. Sendo híbridos, são estéreis, possuindo 63 cromossomos (equinos tem 62 e asininos 64). Os machos provenientes do cruzamento de jumento com égua são denominados burros e as fêmeas, mulas. O filhote do cruzamento de um cavalo com jumenta recebe o nome de bardoto, seja macho ou fêmea. Os burros e mulas são mais desejados pois herdam a rusticidade do pai (jumento) e o porte físico da mãe (égua) (Burnham, 2002; Brenner e Miller, 2013).

Entretanto, a partir da modernização e a chegada da tecnologia em alguns setores, seu valor, assim como seu manejo, começou a sofrer graves alterações. Acredita-se que já em 1954, a crise dos jumentos tenha iniciado com o advento do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), que passou por modificações técnicas ao longo do tempo (Brasil, 1997) e que determina regras para o manejo de produtos de origem animal, dentre eles, aqueles oriundos de equídeos, incluindo a necessidade de Inspeção Federal de locais e técnicas de abate específicos para os equídeos no Brasil.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) estima que de 1967 a 1979, ocorreu um decréscimo do rebanho de 17 para 2 milhões de animais. A base da argumentação foi que, mantido esse ritmo os animais seriam extintos (Nobre, 1980). Dados históricos do Censo Agropecuário, cuja última edição ocorreu em 2006 (IBGE, 2016) consolidam o pensamento de que a população de asininos no Brasil e especialmente no Nordeste decaiu em média 1,5% ao ano desde o início da década de 70, chegando a menos e 600mil (Figura 02).

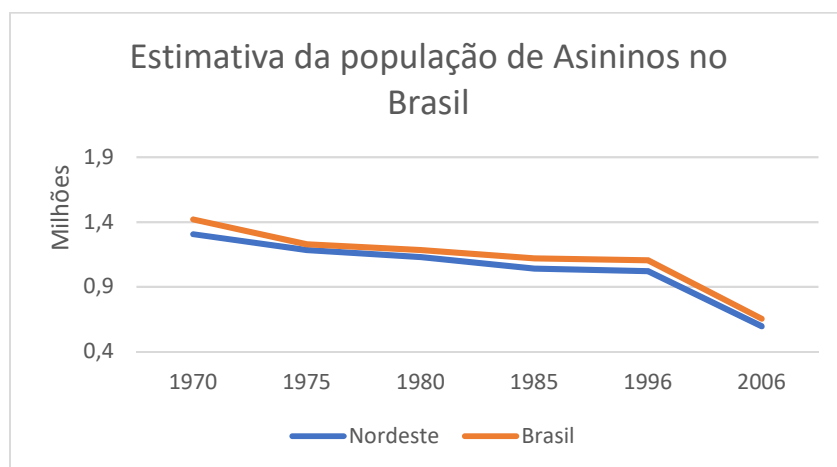


Figura 02 – Estimativa da população de asininos no Brasil e no Nordeste desde o início da série histórica do IBGE (IBGE, 2016)

Sabendo da redução populacional da raça Nordestina e reconhecendo a importância da preservação de espécies e raças de interesse zootécnico e econômico, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa criou um projeto de pesquisa denominado “Conservação e Uso de Recursos Genéticos Animais”, sob coordenação do Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen, que tem por finalidade a construção de Bancos de Germoplasma de espécies em ameaça de extinção, dentre elas, o jumento Nordestino (Mariante *et al.*, 2005).

2.2 Aspectos anatomo-fisiológicos do aparelho reprodutor feminino de asininos

As funções primárias do aparelho reprodutor feminino são garantir as estruturas físicas para que a gestação venha a termo e, antes disso, que hajam células reprodutivas viáveis e aptas. Dentre as estruturas que compõe o aparelho, os ovários desempenham esta última função, por meio da formação das células germinativas como também da produção dos hormônios que dão suporte à maturação destas células e da gestação, sendo considerados os órgãos reprodutivos primários da fêmea (McEntee, 2012). No caso dos asininos, apesar da anatomia ser bem conhecida há muitos anos, tendo sido primeiramente descrita em 1822, por Ernst Friedrich Gurlt (Veterinário alemão, em seu “*Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haussäugetiere*”, ou “Manual Gurlts de anatomia comparada de animais domésticos”, numa tradução livre, publicado até 1943) (Renner-Martin *et al.*, 2009), os estudos morfológicos e fisiológicos mais apurados não são comuns, especialmente quando comparados a outras espécies de maior importância zootécnica, como bovinos (King, 1979; Hammond, 2014; Bova *et al.*, 2014), caprinos (Greyling, 1988; Amoah e Gelaye, 1997; Gallego-Calvo *et al.*, 2015) e equinos (Morley e Murray, 2014; Dascanio e McCue, 2014; Morel, 2015).

Os ovários dos asininos, assim como dos equinos (Aarde *et al.*, 1988; Kainer, 1993), possuem um formato reniforme (forma de rim ou feijão), com uma área côncava, claramente definida, em sua borda livre (oposta àquela borda onde conectam-se vasos, nervos e ligamentos), chamada de fossa de ovulação (Figura 03). Esta forma característica é diferente dos demais mamíferos, cujos formatos mais comuns são o de cachos de uva entre as múltiparas (ou politócica) e ovóide ou de amêndoa, dentre as uníparas (ou monotócicas)

(Getty *et al.*, 1986). É na região cortical na qual os folículos e oócitos são encontrados, consequentemente, a ovulação ocorre somente na fossa de ovulação (Walt *et al.*, 1979).

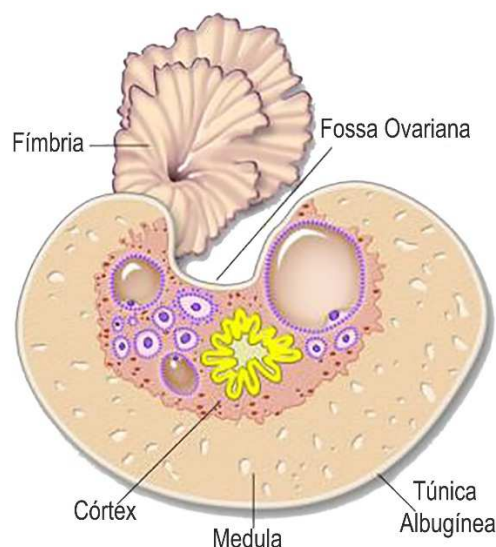


Figura 03 – Diagrama esquemtico do ovrio do equdeo. Fonte: (Deafenbaugh, 2012)

Nos equdeos recém-nascidos, o ovrio é ovide mas adquire a forma de rim à medida em que atinge a idade frtil (Getty *et al.*, 1986), tornando-se a fossa de ovulaço o nico ponto da superfcie de liberaço de ovocitos, por ruptura de folculos maduros (Renner-Martin *et al.*, 2009). Contrariamente à maior parte dos mamferos, os folculos so liberados nas estruturas mais internas, e a medula ocupa o volume externo do ovrio. Paralelamente à maturao folicular, os ovrios passam a ocupar uma posio mais dorsal no abdmen (Dyce, 2010), estando quase sempre em contato com as paredes abdominais, mas com grandes variaes de animal para animal (Getty *et al.*, 1986).

As fmeas asininas tornam-se frteis entre 24 e 36 meses de vida, variando de acordo com diversos fatores, nem todos mensurados, mas fortemente influenciados pelas condies ambientais, como estaes do ano ou mesmo a latitude, e a maturidade sexual ocorre em torno dos 5 anos (Blanchard *et al.* 1999; Pugh, 2002).

Os asininos formam grupos matriarcais errantes e os machos fixam-se em territrios (Moehlman, 1998). Um territrio pode ter dezenas de hectares de extenso, inclusive com reas no contguas, escolhidos pelo macho pelas condies favorveis de alimento e gua. A demarcao das reas feita atravs da micao e defecaço nas fronteiras e est constantemente remarcada e monitorada. Os grupos de fmeas e filhotes, que podem chegar a 15 indivduos, por outro lado, no se fixam num territrio especfico. Eles

transitam entre os territórios dos machos, ou em áreas não dominadas, buscando sempre as melhores condições de vida para o grupo. Não há padrões específicos de tempo de permanência num território (McDonnell, 1998).

O ciclo reprodutivo da fêmea asinina é muito similar aos demais equídeos, distinguindo-se quanto à duração do estro e da gestação. O ciclo estral varia entre 22 e 28 dias dos quais 5 a 9 dias compreendem o estro (Fielding, 1988). A ovulação geralmente ocorre no quinto a sexto dia após o início das manifestações do estro (Vandeplassche *et al.*, 1981).

Quando em estro, a fêmea adota posturas típicas: cabeça baixa com o pescoço estendido à mesma altura do dorso; orelhas para trás, paralelas ao pescoço, abrir e fechar constante da boca, passa a urinar com mais frequência, mantém as pernas traseiras abertas e cauda levantada numa atitude clara de exibição do períneo (McCort, 1980). Além da mudança comportamental, as fêmeas em estro num grupo, destacam-se de forma muito evidente por vocalizar com maior frequência e por executar movimentos de forma mais rápida e exagerada (McDonnell, 1998).

Uma vez que fêmeas em período fértil transitem pelos territórios constituídos pelos machos, estes tornam-se defensores ávidos destas áreas. Na busca pela exclusividade no cortejo e monta, expulsam outros machos em embates, por vezes, violentos. Se por um lado as fêmeas no cio exalam feromônios e exibem-se, os machos vocalizam intensamente o que auxilia a demarcar o território e atrair as fêmeas disponíveis para seu harém (Henry, Lago e Mendonça, 2009). É possível perceber grande ocorrência do chamado reflexo de Flehmen, que corresponde à elevação do lábio superior, acompanhada da elevação da cabeça e respiração profunda para ampla absorção de ar e captação de feromônios, tanto emanados das fêmeas como de seus dejetos (Marinier *et al.*, 1988; Weeks *et al.*, 2002).

Após a ovulação, aumentam os níveis de progesterona e quando chegam a uma concentração sanguínea superior. Durante o diestro as concentrações de progesterona crescem por cerca de 14 dias, e decaem drasticamente em dois dias para que se inicie o novo estro. O diestro tem uma duração de $18,2 \pm 2,4$ dias e a duração não aparenta ser fortemente impactada ao longo do ano. Por outro, lado os níveis máximos de progesterona durante o diestro afeta o número máximo de ovulações durante o estro, onde níveis mais altos potencializavam a ocorrência de múltiplas ovulações (CASAS & LLASAC, 2014).

Estudos que acompanharam as fases iniciais da gestação, desde a cobertura, mostraram que a vesícula embrionária passa a ser detectada por via ultrassonográfica entre os 10º e 11º dias após a ovulação, permanecendo móvel dentro do útero até o 16º dia, quando alcança o diâmetro de $21,8 \pm 1,5$ mm. A vesícula embrionária implantada, já foi localizada no corno esquerdo, corno direito e corpo uterino em 49,2%, 41,8% e 9% dos exames realizados, respectivamente. O embrião foi detectado aos $19,9 \pm 0,2$ dias, os batimentos cardíacos aos $21,8 \pm 0,3$ e o saco alantoideano entre 19 e 23 dias (Gastal *et al.*, 1993). O crescimento intra-uterino na segunda metade da gestação, as tendências da espessura combinada da unidade útero-placentária e da ecogenicidade dos fluidos amniótico e alantóide, são muito similares àqueles observados na gestação de éguas. Os diâmetros de tórax fetal, a órbita ocular e aumento da aorta durante a gestação foram $40,6 \pm 2,9$ mm, $8,7 \pm 1,5$ mm, e $3,5 \pm 0,7$ mm, respectivamente, na semana 13, e $190,9 \pm 12,0$ mm, $21,4 \pm 1,5$ mm, e $30,6 \pm 1,8$ mm na semana que antecedeu o parto. A frequência cardíaca diminui com a progressão da gestação (Crisci *et al.*, 2014).

A duração da gestação entre os asininos é de cerca de 370 dias, mas foram detectadas grandes variações entre diversos estudos que já observaram este período como entre 339 e 370 (Crisci *et al.*, 2014), 360 e 375 (Weaver, 2012) e 362 a 375 dias (Barros *et al.*, 2012).

2.3 Oogênese e foliculogênese

Na fase embrionária da fêmea, células germinativas primordiais diferenciam-se em oócitos. Ao nascer, as fêmeas mamíferas já possuem todos os oócitos que durante a vida fértil poderão participar de uma fertilização (Bukovsky *et al.*, 2005). A visão mais tradicional da oogênese, em essência, pode ser mapeada em 7 passos: 1) geração das células germinativas primordiais (CGP) por mitoses; 2) migração das CGPs para as gônadas ainda não totalmente diferenciadas; 3) colonização das gônadas pelas CGP; 4) diferenciação das CGP em oogônias; 5) proliferação de oogônias; 6) iniciação da meiose das oogônias; 7) formação do oócito primitivo; nesta ocasião ocorre a primeira parada da meiose, na fase diplóteno da prófase I da meiose, formando a vesícula germinativa, que permanecerá assim até o início do período fértil (Hurk, van den e Zhao, 2005). Contudo, nem todas as CGP

findam em vesículas germinativas disponíveis, isto porque ainda no útero inicia-se a atresia das vesículas, que pode chegar em algumas espécies à 25% dos quantitativos das CGPs quando do nascimento do indivíduo, de modo que a fêmea nasce com todos os oócitos disponíveis em seus ovários (Medeiros e Yamamoto, 1998; Bessa e Dode, 2013). Somente durante a puberdade, sob influência de picos de hormônio luteinizante (LH) a meiose das células germinativas são retomadas, prosseguindo até a metáfase II da meiose, com a formação do oócito secundário, permanecendo assim até uma possível fecundação (Chohan e Hunter, 2004).

Por outro lado, contrapondo-se à doutrina tradicional, consolidada e inquestionada desde meados do século XX, pesquisadores tem demonstrado que não só a atresia ou degeneração continua após o nascimento e até o fim dos oócitos, como novos oócitos podem ser diferenciados, sob circunstâncias específicas, o que se demonstrou em ratos (Johnson *et al.*, 2004). Entretanto, este pensamento não é amplamente aceito, faltando mais estudos que corroborem com a teoria (Greenfeld e Flaws, 2004).

Na maior parte dos casos, cada um dos óocitos, na prófase I da meiose, está contido em um folículo primordial que o isola do restante do ovário (Knight e Glister, 2006); contudo é comum que os folículos contenham dois ou mais oócitos, sendo chamados então de folículos multioócitos (Payan-Carreira e Pires, 2008; Silva-Santos e Seneda, 2011). Durante a vida fértil, os folículos armazenados nos ovários na vida fetal, passam por uma sequência complexa de transformações, coordenadas por um equilíbrio tênue entre hormônios, deixando a reserva e levando à ovulação ou à atresia (Fortune, 1994).

A foliculogênese ovariana, como é chamado o processo de desenvolvimento dos folículos, é marcada pela proliferação e diferenciação de componentes e células que permitirão a ovulação (Fair, 2003). Em mamíferos como os equídeos, vários folículos iniciam a foliculogênese mas apenas um deles segue caminho até a ovulação (Jacob, 2007). Ao mesmo tempo em que se torna mais complexo, o folículo cresce em volume, adquire uma cavidade denominada antro folicular, e este crescimento é o fator mais expressivo na definição de qual folículo tem maior aptidão à ser conduzido à ovulação (Bartlewski *et al.*, 1999).

No folículo há um conjunto de células que envolvem o óocito chamadas de células da granulosa. No folículo primordial são achatadas numa única camada, às vezes descontínua, que ao longo da foliculogênese multiplicam-se em diversas camadas. As células

da granulosa são a principal fonte de estrógenos, inibina e proteínas correlatas, que possuem importante papel na regulação endócrina do sistema reprodutivo durante o ciclo estral, atuando como sinalizadores químicos para a hipófise sobre o número de folículos em crescimento no ovário (Hsueh *et al.*, 1984).

O aumento do número de células da granulosa e o consequente aumento de camadas ao redor do oócito marcam fortemente a evolução do folículo de primordial para primário e de primário para secundário. Estes folículos são denominados de pré-antrais (FOPA). Continuada a maturação os folículos tornar-se-ão folículos antrais, dado que as células da granulosa abrem espaço para a formação do antro que será ocupado por fluido folicular composto essencialmente de moléculas produzidas pelas células da granulosa, dentre elas proteoglicanos, glicosaminoglicanos e ácido hialurônico (estruturas que possuem um dos açúcares aminos e normalmente sulfatados) e sulfato de condroitina, moléculas grandes e incapazes de transitarem livres fora do folículo e que produzem um diferencial osmótico que favorece a entrada e manutenção de fluidos, eletrólitos e moléculas sanguíneas do estroma vascularizado para o interior do antro (Clarke *et al.*, 2006).

Este processo de maturação folicular não ocorre com um único folículo de cada vez, mas com um grande volume de folículos simultaneamente, processo denominado de onda folicular, tal processo é normalmente composto por 3 fases: recrutamento, seleção e dominância (Driancourt, 2001), cuja sucessão e relação com os hormônios encontra-se na figura 04. O recrutamento inicia-se após um pico de concentração de hormônio folículo estimulante (FSH). Neste momento, um certo número de folículos primordiais passa a ser englobado por células da granulosa, iniciando a composição de uma camada uniforme (Fortune, 1994).

A etapa de recrutamento tem duração variável, que pode chegar a dias em cavalos, e o número de folículos recrutados também varia entre espécies. Na etapa da seleção, um ou mais folículos são selecionados através de um processo complexo que depende de caracteres intra e extra-ovarianos, bastante estudados mas ainda incompreendidos em sua plenitude (Rocha, 2014). Estes selecionados evoluem até tornarem-se folículos secundários e aguardam a última etapa, a dominância. Nesta, um ou alguns folículos serão tratados como dominantes e os demais, os subordinados, entram em atresia. São os dominantes que evoluirão e mais tarde estarão disponíveis à fecundação (Driancourt,

2001). Em espécies monoovulares, como os equídeos, apenas um será dominante e continuará a crescer até a ovulação (Ginther, 1993).

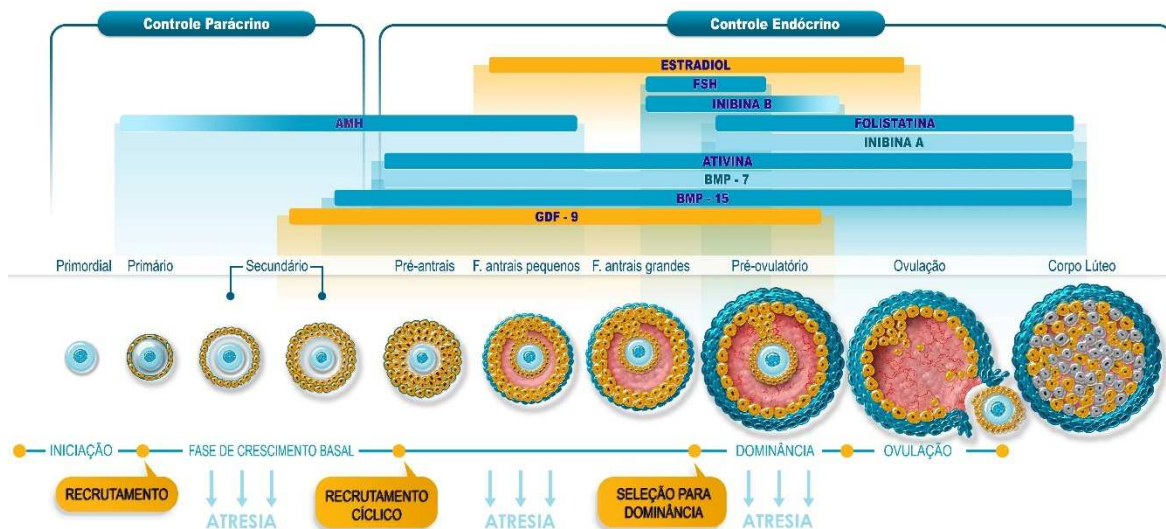


Figura 04 – Foliculogênese e influência hormonal. Adaptado de (ANSHLabs, 2015)

2.2 Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais

A reprodução assistida, em suas diversas técnicas, é uma importante ferramenta na construção de rebanhos com maior qualidade genética, na facilitação de reprodução de espécimes que apresentam dificuldades em reproduzir-se de forma natural, aumentando o número de indivíduos numa população (Lopes, 2001). Com o ritmo de consumo de produtos de origem animal, a pecuária tradicional, mesmo em regime intensivo, dificilmente conseguiria atender a demanda de consumo, portanto procedimentos de inseminação artificial ou fecundação *in vitro* são essenciais para atender a estas demandas de mercado (Nicolau *et al.*, 2001; Portugal, 2002).

Uma parte das estratégias de reprodução assistida, especialmente a fertilização *in vitro* (FIV), ou outras técnicas de biotecnologia envolvem a captura de folículos antrais, visíveis com o uso de tecnologias como a ultrassonografia (Lemma *et al.*, 2006) ou a ressonância magnética (Warren *et al.*, 2015). Contudo, estes folículos visíveis são minoria no processo da foliculogênese, dado que a maioria, superior a 99% (Nuttinck *et al.*, 1993),

entra em atresia antes de tornarem-se visíveis ao uso de ferramentas de diagnósticos (Carroll *et al.*, 1990).

A MOIFOPA é uma biotécnica que vem sendo desenvolvida desde os anos 90 do século XX, e que atua como uma alternativa para se recuperar esta parcela de oócitos que naturalmente perder-se-iam na foliculogênese. Em essência, ela consiste no resgate de FOPA, sua conservação por resfriamento ou congelamento e no cultivo *in vitro* dos oócitos inclusos nos FOPA, a fim de levá-los à maturação e à fecundação (Figueiredo *et al.*, 2007). Com estas características, a MOIFOPA tem potencial para atender a pelo menos três áreas de interesse na reprodução: o estudo de base da fisiologia reprodutiva de espécies, melhoria da produção dos rebanhos ao favorecer a fertilização assistida e recuperação de populações de mamíferos em risco de extinção.

A foliculogênese é amplamente estudada, porém mais profundamente conhecida ao se tratar dos folículos antrais (Bao e Garverick, 1998; Baerwald *et al.*, 2012), dentre outros motivos pela facilidade de estudos não invasivos (Garcia *et al.*, 1999). Quanto aos folículos pré-antrais, os complexos mecanismos internos e externos que controlam o crescimento e a maturação dos FOPA ainda são incertos ou pouco conhecidos, sendo portanto, um campo de pesquisas a ser explorado (Figueiredo *et al.*, 2007; Thomson *et al.*, 2016).

A aplicação da MOIFOPA aumenta decisivamente o número de células reprodutivas disponíveis às técnicas de reprodução assistida, fato que já permitiu ser aplicada a diversas espécies como humanos (Roy e Treacy, 1993), bovinos (Gutierrez *et al.*, 2000), ratos (Nayudu e Osborn, 1992), caprinos (Matos *et al.*, 2007), búfalos (Gupta *et al.*, 2008), dentre outros. Em equinos, a inseminação artificial, a transferência de embriões e até mesmo a clonagem são uma realidade, mas a fertilização *in vitro* e maturação *in vitro*, são pouco estudados (Gomes e Seneda, 2015),

Há uma grande possibilidade de que as atividades humanas estejam causando uma extinção em massa de espécies em todo o mundo. A taxa média de perda de espécies de vertebrados ao longo do século passado é até 100 vezes maior do que a taxa estimada ao longo de toda a história (Ceballos *et al.*, 2015). Seguindo-se o mesmo raciocínio da aplicação em humanos e espécies de interesse zootécnico, favorecer a reprodução de espécies silvestres ou domésticas em risco de extinção é um importante papel para a MOIFOPA, auxiliando a concretizar o conceito de bancos de recursos genéticos (Leibo e Songsasen, 2002; Comizzoli *et al.*, 2010) ou na reprodução assistida de espécies selvagens cujas atuais biotécnicas são

complexas ou pouco efetivas (Andrabi e Maxwell, 2007). Contudo, o sucesso da aplicação de MOIFOPA, bem como de outras técnicas, depende da taxa de recuperação de folículos, ou seja, que se obtenha ao final do processamento um grande número de folículos sem danos estruturais, efetivamente disponíveis (Rossetto *et al.*, 2011). Neste sentido, iniciar as técnicas conhecendo a estimativa da população folicular, permite compreender os números máximos desta taxa de recuperação.

2.3 População folicular ovariana

Muitas biotécnicas reprodutivas aplicadas a folículos antrais ou pré-antrais, são mais efetivas quando há conhecimento do maior número de variáveis possíveis dos próprios folículos, dos parâmetros quantitativos e qualitativos dos folículos, dado que estes parâmetros são proporcionais ao potencial reprodutivo (Comizzoli *et al.*, 2010). Assim, determinar a população folicular é uma das atividades básicas para iniciar ou concluir o uso de biotécnicas reprodutivas, em especial porque vários aspectos podem influenciar no tamanho desta população como o escore corporal (Domínguez, 1995) ou distúrbios alimentares (Boland *et al.*, 2001), a etapa do ciclo estral em que se observam ou se coletam os folículos antrais (Baruselli *et al.*, 1997; Abdoon, 2001), o equilíbrio hormonal durante a vida do animal (Hunter *et al.*, 2004), enfermidades, como a mastite crônica (Rahman *et al.*, 2012) ou mesmo a idade, dado que, com o avançar da idade, ocorre naturalmente o decréscimo no número de folículos ovarianos (Picton, 2001).

Para os folículos antrais, as avaliações comumente são realizadas com o uso de ferramentas de diagnóstico por imagem, em especial a ultrassonografia, como no caso dos estudos com bovinos (Batista *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2014), caprinos (Souza *et al.*, 2016), asininos (Contri *et al.*, 2014) e equinos (Claes *et al.*, 2015).

Para a população de folículos ovarianos pré-antrais, as técnicas de captura comumente envolvem a ovariectomia ou a retirada *post mortem* dos ovários. Experimentos já foram conduzidos em diversas espécies de interesse zootécnico, como: bovinos (*Bos taurus*), sendo estimadaa uma população de 19.777 ± 25.412 primordiais, 11.337 ± 11.568 primários e 4.174 ± 2.893 folículos secundários (Driancourt *et al.*, 1982); caprinos os números foram de 20.779 ± 4.116 folículos primordiais, 9.702 ± 1.226 folículos primários e 1.722 ± 480 folículos secundários (Lucci *et al.*, 1999); para suínos foram encontrados cerca

420.000 folículos primordiais por ovário (Gosden e Telfer, 1987); em equinos uma grande variação foi relatada entre estudos indo de 5.600 a 75.000 folículos por fêmea (Alves, 2014). Entretanto, até o momento, não há registros do estudo da população de folículos pré-antrais em asininos.

2.4 Conservação de tecido ovariano

Para a maior parte das espécies os estudos são conduzidas para estratégias de criopreservação dos gametas masculinos, como no caso de equinos e asininos (Chaves, 2015; Osório *et al.*, 2015), caprinos (Silveira *et al.*, 2015) e bovinos (Leite *et al.*, 2015). Em se tratando de fêmeas, os estudos focam principalmente na criopreservação de oócitos oriundos de folículos antrais (Lima, 2016; Polenz, 2016).

Contudo, com o estabelecimento das técnicas de manipulação dos folículos pré-antrais, diferentes estratégias de captura dos folículos foram aplicadas, como punções foliculares (Rua *et al.*, 2015; Barros, 2016), biópsias do tecido ovariano (Lunardi *et al.*, 2013), ovariectomia uni ou bilateral (Leonel, 2014) ou colheita do ovário imediatamente após a morte do animal (Mattos, 2016). Tais estratégias permitem a criopreservação de tecidos em temperaturas abaixo de zero, resultando em uma queda radical da atividade metabólica com possibilidade de armazenamento por longos prazos. Para tanto, é necessária a utilização de metodologias apropriadas para minimizar danos decorrentes do processo de congelação, como o uso de agentes crioprotetores que, de forma geral, alteram as condições de congelação ou substituem líquido intracelular minimizando a formação de cristais que danificam fisicamente as células (Mandawala *et al.*, 2016).

Além disso, o agente crioprotetor, deve apresentar características que permitam sua retirada do meio celular (Santos *et al.*, 2008), deve ter baixa toxicidade e suportar as temperaturas de manutenção da preservação, dentre estas substâncias estão o glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG), propanodiol (PROH), dentre outras. Entretanto, o uso dos crioprotetores não garante o sucesso da operação pois cada tipo de célula responde de forma diferente às mudanças físicas e físico-químicas durante o processo, especialmente quanto ao ritmo de resfriamento e aquecimento (Pegg, 2002). Uma vantagem no uso dos folículos pré-antrais é que eles vem se apresentando mais resistentes ao

resfriamento, dentre outros fatores por conter um menor número de gotas lipídicas, se comparados a oócitos maturados e menor taxa metabólica (Hovatta, 2005).

O processo mais comum de congelação ocorre com um resfriamento lento e gradativo, controlado por equipamentos, nem sempre acessíveis do ponto de vista financeiro ou logístico, dificultando o uso da técnica a campo, e o uso de baixas concentrações de crioprotetores (Moussa *et al.*, 2005). É um processo vulnerável quanto à formação de cristais de gelo que rompem estruturas celulares (Zhmakin, 2008). Alternativamente, vem se tornando mais comum o emprego de protocolos de vitrificação. Este elimina danos causados devido à formação de cristais de gelo durante o processo de resfriamento. O método envolve o resfriamento ultra-rápido e o uso de crioprotetores em grandes concentrações, quando comparadas aos métodos tradicionais, que aumentam de forma substancial a viscosidade do meio, o que resulta na formação de um estado vítreo, de altíssima viscosidade. Esta camada é amorfa e ajusta-se às células, permitindo que sua estrutura permaneça intacta, sem a formação de cristais de gelo (Mandawala *et al.*, 2016). A figura 05 mostra de forma simplificada as diferenças mais significativas entre os processos tradicionais de congelação e a vitrificação.

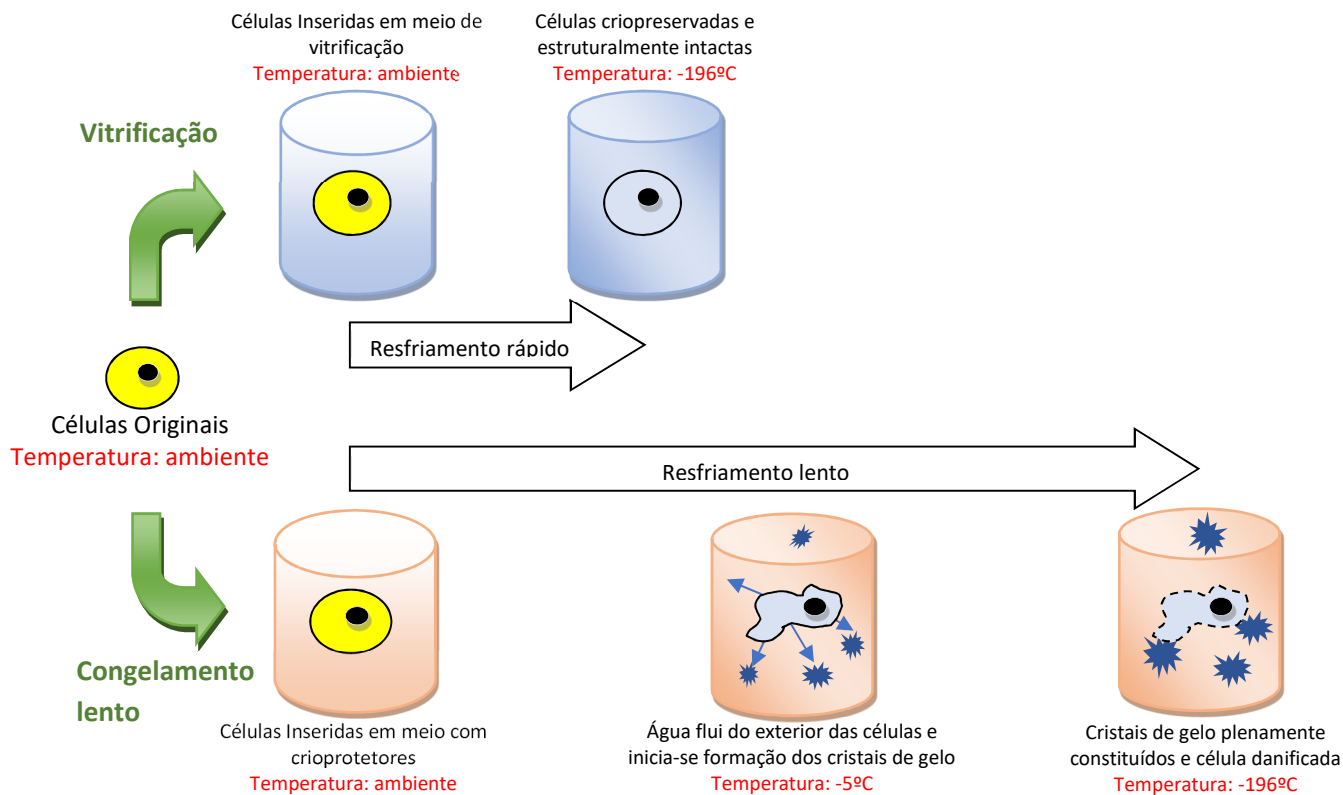


Figura 05 – Diagrama esquemático comparativo dos métodos de criopreservação tradicional e a vitrificação

O uso da criopreservação de tecido ovariano permite que, após a descongelação, possam ser submetidos a protocolos de maturação dos oócitos *in vitro*, havendo estudos sobre diferentes estratégias aplicadas em roedores, bovinos e mesmo humanos. A maioria dos métodos emprega uma abordagem onde os folículos pré-antrais são selecionados e desenvolvidos em um ambiente similar aos utilizados em cultura de órgãos; após desenvolver-se e adquirir um diâmetro maior, são capturados e cultivados até a maturidade plena em um segundo ambiente (Fatehi *et al.*, 2014; Green e Shikanov, 2016) ou reimplantados para continuidade de funções reprodutivas, técnica que possibilita contornar danos aos ovários após tratamentos que degradam a função reprodutiva como radioterapia ou quimioterapia, por exemplo (Donnez *et al.*, 2013).

Folículos contendo oócitos imaturos de éguas coletados via transvaginal por punção guiada por ultrassom foram vitrificados e maturados pós-descongelamento, com uma taxa de sucesso baixa, inferior a 20% (Canesin *et al.*, 2016). Mas estudos com oócitos de éguas, 10 delas submetidas a tratamento de superestimulação hormonal (com administração de hCG) e 23 sem tratamento, após vitrificação não só chegaram à maturação no cultivo *in vitro*, como uma vez reimplantados e fecundados geraram potros sadios (Maclellan *et al.*, 2002).

Os estudos sobre preservação de gametas de asininos são concentrados nos machos, para fins de criação de mulas (Davies *et al.*, 1985; González *et al.*, 2015), mas pouco se tem estudado sobre a criopreservação de gametas femininos e ainda menos como forma de favorecer raças cujo risco de extinção é real. Num cenário onde o número de indivíduos decai drasticamente, possuir uma reserva controlada de gametas que possam participar de processos de maturação e fertilização *in vitro*, dentre outras técnicas, permitirá o controle sobre a população e a garantia da preservação do potencial genético da espécie.

2.5 Crioprotetores

Nas biotécnicas de criopreservação, seja por procedimentos lentos, seja por ultrarrápidos como a vitrificação, o sucesso na obtenção de células ou tecidos viáveis ao final do processo, depende drasticamente do uso de substâncias que favoreçam a manutenção

da integridade estrutural e, portanto, a viabilidade, diante das mudanças físico-químicas decorrentes das mudanças extremas de temperatura. Estas substâncias possuem a denominação geral de crioprotetores, e, se por um lado atuam na integridade física das células, por outro, estas podem apresentar toxicidade às células em determinadas concentrações. Buscar o equilíbrio entre a proteção e a toxicidade é um dos desafios dos protocolos de criopreservação (Fahy, 1986).

Um dos fatores que mais impactam negativamente na integridade celular é a formação de cristais de gelo durante o resfriamento tanto no meio intra como no extracelular. Desse modo, limitar a formação destes cristais é uma meta importante. Na vitrificação, ou formação do estado vítreo, onde a mudança de temperatura é drástica, a formação de cristais de gelo é eliminada (Vajta, 2000), ao custo de potencializar a toxicidade em virtude da alta concentração de crioprotetores (Kasai e Mukaida, 2004).

Nestes casos, é comum a utilização de um crioprotetor não capaz de ultrapassar a membrana celular, atuando no meio extracelular. Comumente utilizada, a sacarose, um açúcar neutro capaz de minimizar os efeitos termodinâmicos da criopreservação, fortalece a estrutura de proteínas que compõem a membrana plasmática (Carpenter e Crowe, 1988), favorece a permanência da água no meio extracelular (Gosden, 2000) e forma uma estrutura amorfa, vítrea, que comporta-se como um fluido altamente viscoso, a ponto de confundir-se com um sólido. Assim, com as distribuições molecular e iônica do estado líquido, a sacarose evita os efeitos prejudiciais da cristalização extra e intracelular (Arav *et al.*, 1993).

Por outro lado, os crioprotetores intracelulares são substâncias de baixo peso molecular, capazes de transpassar as membranas plasmáticas a fim de interagir e influenciar a dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos que compõem a estrutura proteica do citoesqueleto. O citoesqueleto é uma complexa estrutura que se estende pelo citoplasma, auxiliando na manutenção da estrutura celular, na organização das organelas e no transporte de substâncias dentro da célula (Dobrinsky, 1996). Os crioprotetores intracelulares mais comuns são o DMSO (Kim *et al.*, 2014; Brito *et al.*, 2017; Gastal *et al.*, 2017), EG (Sheikhi *et al.*, 2013; Nowak *et al.*, 2014; Kagawa *et al.* 2015), PROH (Sanfilippo *et al.*, 2015; Bandeira *et al.*, 2015), glicerol (GLI) (Ting *et al.*, 2013), metanol (Sampaio da Silva *et al.*, 2016) que podem ser utilizados sozinhos ou em associações.

Os estudos realizados em equinos (Gastal *et al.*, 2017) e outros mamíferos de interesse zootécnico (Ishimori *et al.*, 1993; Prentice e Anzar, 2010) tem apontado uma maior taxa de sucesso quando da utilização do DMSO, EG ou a associação dos dois.

3. Justificativa

Os jumentos Nordestinos nasceram de 500 anos de adaptação e manejo humano, e auxiliaram e ainda auxiliam o desenvolvimento do povo brasileiro, fomentando a permanência do homem no campo, mesmo nos grandes períodos de seca.

Do ponto de vista genético, o jumento nordestino é o ápice do que se deseja num equídeo no que tange à resistência a enfermidades, tolerância às condições climáticas extremas; aproveitamento dos componentes dos alimentos, mesmo quando de baixa qualidade, capacidade de longas jornadas de trabalho, dentre outros caracteres que estão sob risco de serem perdidos à medida em que a raça passa por um período de desinteresse econômico, especialmente por mudanças tecnológicas e da falência das políticas públicas de agricultura familiar.

Os estudos sobre a fisiologia reprodutiva dos jumentos, não apenas os da raça nordestina, são muito esparsos, e quase sempre focados nos machos. Para a caracterização dos folículos ovarianos pré-antrais não existe registro divulgado entre a comunidade científica.

O estudo aprofundado da fisiologia da reprodução desta raça, no que se refere ao conhecimento e caracterização folicular e a identificação de técnicas de conservação gonadal adequada para a espécie, potencializa a possibilidade de constituição de bancos genéticos para a raça, e favorece a execução de biotécnicas que auxiliam a conservar a mesma. A MOIFOPA, por exemplo, aumenta o potencial reprodutivo de fêmeas, dado que um grande número de folículos pré-antrais que jamais chegariam à fase ovulatória, podem ser capturados, permitindo seu uso em outras técnicas de reprodução assistida ou mesmo a criopreservação. Esta por sua vez, permite a conservação de gametas por um longo prazo, e a introdução de agentes crioprotetores permite um maior índice de sucesso nas técnicas. O uso destas técnicas e aditivos também nunca foram relatados na literatura quanto à aplicação em asininos.

Desta forma, a realização de estudos em fêmeas de jumento nordestino, vem preencher uma série de lacunas necessárias à preservação desta e de outras raças asininas ao redor do mundo em igual situação de abandono e risco de extinção.

4. Hipóteses científicas

- As características quantitativas da população de folículos pré-antrais de jumentas da raça nordestina são influenciadas pela idade e peso do espécime;
- A vitrificação em superfície sólida de tecido ovariano de jumentas da raça nordestina com o uso de diferentes concentrações e combinações de etileno glicol (EG) e dimetil sulfóxido (DMSO) permite a efetiva conservação de gametas femininos desta espécie;

5. Objetivos

5.1 Geral

Utilizar a MOIFOPA como ferramenta para o resgate e otimização do uso de gametas femininos oriundos de jumentas (*Equus asinus*) da raça nordestina.

5.2 Específicos

Descrever as características histológicas da população de folículos ovarianos pré-antrais de jumentas da raça Nordestina;

Avaliar a influência da idade e do peso da jumenta Nordestina sobre a reserva de folículos pré-antrais;

Avaliar o efeito dos crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO), e etilenoglicol (EG) nas concentrações de 3 e 6 M bem como a associação DMSO 3M e EG 3M, sobre a morfologia, viabilidade, fragmentação de DNA e taxa de apoptose em folículos ovarianos pré-antrais *in situ* vitrificados de jumentas da raça Nordestina.

6. Referências Bibliográficas

- AARDE, L. M. W.; AARDE, R. J. van; SKINNER, J. D. Reproduction in Female Hartmann's Zebra, *Equus Zebra Hartmannae*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 2, p. 505–511, 1 nov. 1988.
- ABDOON, A. S. S. Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedarius*) ovary with special reference to maturation time in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 1–2, p. 71–79, 30 abr. 2001.
- ALMEIDA, L. D. de. **Diversidade genética de raças asininas criadas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial**. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/7043>>. Acesso em: 18 jan. 2014.
- ALVES, K. A. Avaliação da densidade folicular e de estratégias para otimizar a obtenção de folículos pré-antrais equinos. 17 dez. 2014. Disponível em: <<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5118>>. Acesso em: 1 nov. 2016.
- AMOA, E. A.; GELAYE, S. Biotechnological Advances in Goat Reproduction. **Journal of animal science**, v. 75, n. 2, p. 578–585, fev. 1997.
- ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A Review on Reproductive Biotechnologies for Conservation of Endangered Mammalian Species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 3–4, p. 223–243, jun. 2007.
- ANSHLABS. **Folliculogenesis EduGraphic**, 2015. Disponível em: <http://www.anshlabs.com/wp-content/uploads/collateral/Folliculogenesis_Final.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2017.
- ARAV, A.; SHEHU, D.; MATTIOLI, M. Osmotic and Cytotoxic Study of Vitrification of Immature Bovine Oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 2, p. 353–358, 1 nov. 1993.
- AZEVEDO, C. F.; NOBRE, F. F.; LIMA, C. B. **Criação de Jumento Nordestino**. Natal, Brasil: Associação Brasileira de Criadores do Jumento Nordestino, 1984.
- BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. **Human Reproduction Update**, v. 18, n. 1, p. 73–91, 1 jan. 2012.
- BANDEIRA, F.; CARVALHO, A.; CASTRO, S.; LIMA, L.; VIANA, D.; EVANGELISTA, J.; PEREIRA, M.; CAMPELLO, C.; FIGUEIREDO, J.; RODRIGUES, A. Two Methods of Vitrification Followed by In Vitro Culture of the Ovine Ovary: Evaluation of the Follicular Development and Ovarian Extracellular Matrix. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 2, p. 177–185, 1 abr. 2015.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of Steroidogenic Enzyme and Gonadotropin Receptor Genes in Bovine Follicles during Ovarian Follicular Waves: A Review. **Journal of animal science**, v. 76, n. 7, p. 1903–1921, jul. 1998.

BARROS, F. F. P. da C. [UNESP. Aspiração folicular por videolaparoscopia e maturação oocitária in vitro em pacas (*Cuniculus paca* – linnaeus, 1766) mantidas em cativeiro e submetidas a protocolos de superestimulação ovariana. 17 fev. 2016. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/136251>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

BARROS, O.; VITORINO, P. V. V.; MAXIMO, V. T.; GALVÃO, R. B. B. FISILOGIA E BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ASININOS. **Ciência Animal**, v. 22, n. 2012, p. 207–218, 2012.

BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; CHANDOLIA, R. K.; HONARAMOOZ, A.; RAWLINGS, N. C. Ovarian Antral Follicular Dynamics and Their Relationships with Endocrine Variables throughout the Oestrous Cycle in Breeds of Sheep Differing in Prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 111–124, 1 jan. 1999.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1531–1547, 1 jun. 1997.

BATISTA, E.; MACEDO, G.; SALA, R.; ORTOLAN, M.; SÁ FILHO, M.; DEL VALLE, T.; JESUS, E.; LOPES, R.; RENNÓ, F.; BARUSELLI, P. Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos Indicus* (Nelore) and *Bos Taurus* (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 448–452, 1 jun. 2014.

BEJA-PEREIRA, A.; ENGLAND, P. R.; FERRAND, N.; JORDAN, S.; BAKHIET, A. O.; ABDALLA, M. A.; MASHKOUR, M.; JORDANA, J.; TABERLET, P.; LUIKART, G. African Origins of the Domestic Donkey. **Science**, v. 304, n. 5678, p. 1781–1781, 18 jun. 2004.

BESSA, I. R.; DODE, M. A. N. Ovogênese e modificações epigenéticas. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 37, n. 3, p. 241–248, 2013.

BLANCHARD, T. L.; TAYLOR, T. S.; LOVE, C. L. Estrous cycle characteristics and response to estrus synchronization in mammoth asses (*Equus asinus americanus*). **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 827–834, 1 out. 1999.

BLENCH, R. M. A history of donkeys, wild asses and mules in Africa. **The origins and development of African livestock** (eds Blench R., MacDonald K.), p. 339–354, 2000.

BOLAND, M. P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1323–1340, 1 abr. 2001.

BOVA, T. L.; CHIAVACCINI, L.; CLINE, G. F.; HART, C. G.; MATHENY, K.; MUTH, A. M.; VOELZ, B. E.; KESLER, D.; MEMILI, E. Environmental stressors influencing hormones and systems physiology in cattle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p. 58, 2014.

- BOWLING, T.; RUVINSKY, A. **The genetics of the horse**. [s.l.] CABI, 2000.
- BRASIL, M. D. A., PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 30.691. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. . 1997.
- BRENNER, S.; MILLER, J. H. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. [s.l.] Academic Press, 2013.
- BRERETON, J. M. **The horse in war**. [s.l.] Arco Publishing Company, 1976.
- BRITO, D. C. C.; LIMA, J. G.; LIMA, S. L. G.; DOMINGUES, S. F. S.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; PIECZARKA, J. C.; SANTOS, R. R. Vitrification and in vitro culture of domestic cat ovarian tissue: effect of open and closed systems on the follicular functioning and gene modulation. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 295–295, 1 jan. 2017.
- BUKOVSKY, A.; CAUDLE, M. R.; SVETLIKOVA, M.; WIMALASENA, J.; AYALA, M. E.; DOMINGUEZ, R. Oogenesis in Adult Mammals, Including Humans: A Review. **Endocrine**, v. 26, n. 3, p. 301–316, 2005.
- BURNHAM. Anatomical Differences of the Donkey and Mule. **AEP PROCEEDINGS**, v. 48, p. 102–109, 2002.
- CANESIN, H. S.; ORTIZ, I.; BROM-DE-LUNA, J. G.; CHOI, Y. H.; HINRICHS, K. 43 MASS VITRIFICATION OF GERMINAL-VESICLE STAGE EQUINE OOCYTES. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 151–151, 27 jan. 2016.
- CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. **Cryobiology**, v. 25, n. 3, p. 244–255, 1 jun. 1988.
- CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Extra-Ovarian Production of Mature Viable Mouse Oocytes from Frozen Primary Follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 1, p. 321–327, 1 set. 1990.
- CEBALLOS, G.; EHRLICH, P. R.; BARNOSKY, A. D.; GARCÍA, A.; PRINGLE, R. M.; PALMER, T. M. Accelerated Modern Human-induced Species Losses: Entering the Sixth Mass Extinction. **Science Advances**, v. 1, n. 5, p. e1400253, 1 jun. 2015.
- CHAVES, M. M. B. de C. [UNESP. Perfil lipídico da membrana citoplasmática de espermatozoides in natura e criopreservados de jumentos e cavalos. **Aleph**, p. 90 f., 26 ago. 2015.
- CHOHAN, K. R.; HUNTER, A. G. In Vitro Maturation, Fertilization and Early Cleavage Rates of Bovine Fetal Oocytes. **Theriogenology**, v. 61, n. 2–3, p. 373–380, jan. 2004.
- CLAES, A.; BALL, B. A.; SCOGGIN, K. E.; ESTELLER-VICO, A.; KALMAR, J. J.; CONLEY, A. J.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. The Interrelationship between Anti-Müllerian Hormone, Ovarian Follicular Populations and Age in Mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 5, p. 537–541, 1 set. 2015.

CLARKE, H. G.; HOPE, S. A.; BYERS, S.; RODGERS, R. J. Formation of Ovarian Follicular Fluid May Be due to the Osmotic Potential of Large Glycosaminoglycans and Proteoglycans. **Reproduction**, v. 132, n. 1, p. 119–131, 1 jul. 2006.

CLUTTON-BROCK, J. **Horse power: a history of the horse and the donkey in human societies**. [s.l.] Natural History Museum Publications, 1992.

COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; WILDT, D. E. Protecting and Extending Fertility for Females of Wild and Endangered Mammals. In: WOODRUFF, T. K.; ZOLOTH, L.; CAMPO-ENGELSTEIN, L.; RODRIGUEZ, S. (Ed.). **Oncofertility**. Cancer Treatment and Research. [s.l.] Springer US, 2010. p. 87–100.

CONTRI, A.; ROBBE, D.; GLORIA, A.; DE AMICIS, I.; VERONESI, M. C.; CARLUCCIO, A. Effect of the season on some aspects of the estrous cycle in Martina Franca donkey. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 657–661, 15 mar. 2014.

CRISCI, A.; ROTA, A.; PANZANI, D.; SGORBINI, M.; OUSEY, J. C.; CAMILLO, F. Clinical, Ultrasonographic, and Endocrinological Studies on Donkey Pregnancy. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 275–283, 15 jan. 2014.

DASCANIO, J.; MCCUE, P. **Equine Reproductive Procedures**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2014.

DAVIES, C. J.; ANTCZAK, D. F.; ALLEN, W. R. Reproduction in Mules: Embryo Transfer Using Sterile Recipients. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. S3, p. 63–67, 1 mar. 1985.

DEAFENBAUGH, S. **Mare Ovary**, 2012. Disponível em: <https://classconnection.s3.amazonaws.com/628/flashcards/972628/png/mare_ovary1331405239430.png>.

DOBRINSKY, J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. v. 45, n. 1, p. 17–26, 1 jan. 1996.

DOMÍNGUEZ, M. M. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v. 43, n. 8, p. 1405–1418, 1 jun. 1995.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.-M.; PELLICER, A.; DIAZ-GARCIA, C.; SANCHEZ SERRANO, M.; SCHMIDT, K. T.; ERNST, E.; LUYCKX, V.; ANDERSEN, C. Y. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1503–1513, maio 2013.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211–1239, 1 abr. 2001.

DRIANCOURT, M. A.; PARIS, A.; COLETTE, R.; MARIANA, J. C.; PALMER, E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. **Reproduction Nutrition Developpement**, v. 22, n. 6, p. 1035–1047, 1982.

DYCE, K. M. **Tratado de Anatomia Veterinária**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2010.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 1 fev. 1986.

FAIR, T. Follicular Oocyte Growth and Acquisition of Developmental Competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 203–216, out. 2003.

FATEHI, R.; EBRAHIMI, B.; SHAHHOSSEINI, M.; FARROKHI, A.; FATHI, R. Effect of ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 302–308, 15 jan. 2014.

FIELDING, D. Reproductive Characteristics of the Jenny donkey—Equus Asinus: A Review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 20, n. 3, p. 161–166, 1 set. 1988.

FIGUEIREDO, J. R. de; CELESTINO, J. J. de H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 2, p. 143–152, 2007.

FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225–232, 1 fev. 1994.

GALLEGO-CALVO, L.; GATICA, M. C.; CELI, I.; GUZMÁN, J. L.; ZARAZAGA, L. A. Body Condition Score Is a Critical Factor Determining the Onset of Puberty in Blanca Andaluza Female Goat Kids. **Animal Production Science**, v. 55, n. 9, p. 1179–1183, 20 ago. 2015.

GARCIA, A.; VAN DER WEIJDEN, G.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Monitoring Follicular Development in Cattle by Real-Time Ultrasonography: A Review. **The Veterinary record**, v. 145, n. 12, p. 334–340, set. 1999.

GASTAL, E. L.; SANTOS, G. F.; HENRY, M.; PIEDADE, H. M. Embryonic and Early Foetal Development in Donkeys. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. S15, p. 10–13, 1993.

GASTAL, G. D. A.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; PAIVA, S. O.; DE TARSO, S. G. S.; ISHAK, G. M.; BASHIR, S. T.; GASTAL, E. L. Effects of Cryoprotectant Agents on Equine Ovarian Biopsy Fragments in Preparation for Cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 53, p. 86–93, jun. 2017.

GETTY, R.; ROSENBAUM, C. E.; GHOSHAL, N. G.; HILLMANN, D. **Sisson [e] Grossman: anatomia dos animais domésticos**. [s.l.] Guanabara Koogan, 1986.

GINTHER, O. J. Major and Minor Follicular waves During the Equine Estrous Cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 18–25, jan. 1993.

GOMES, R. G.; SENEDA, M. M. Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 4, p. 318–322, 23 set. 2015.

GONZÁLEZ, S. M.; GOMES, R. G.; SOUZA, A. K.; SILVA, C. B.; SILVA-SANTOS, K. C.; SENEDA, M. M. Evidences of Regular Estrous Cycles in Mules and Successful Use of These Animals as Recipients for Donkey Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 10, p. 869–872, out. 2015.

GOSDEN, R. G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1–2, p. 125–129, 25 maio 2000.

GOSDEN, R. G.; TELFER, E. Numbers of Follicles and Oocytes in Mammalian Ovaries and Their Allometric Relationships. **Journal of Zoology**, v. 211, n. 1, p. 169–175, 1 jan. 1987.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, Proceedings of the 18th ICAR. v. 86, n. 1, p. 229–238, 1 jul. 2016.

GREENFELD, C.; FLAWS, J. A. Renewed Debate over Postnatal Oogenesis in the Mammalian Ovary. **BioEssays**, v. 26, n. 8, p. 829–832, 1 ago. 2004.

GREENWOOD, M. **The Donkey of Gallipoli: A True Story of Courage in World War I**. [s.l.] Candlewick Press, 2008.

GREYLING, J. P. C. **Certain aspects of reproductive physiology in the Boer goat doe**. 1988. Stellenbosch: Stellenbosch University, 1988. Disponível em: <<http://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/66096>>. Acesso em: 2 mar. 2017.

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, n. 1, p. 57–63, fev. 2008.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1322–1328, 1 maio 2000.

HAMMOND, J. **The Physiology of Reproduction in the Cow**. [s.l.] Cambridge University Press, 2014.

HENRY, M.; LAGO, L. A.; MENDONÇA, L. F. Donkeys: a specie with own social and reproductive characteristics. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 223–230, 2009.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 10, n. 6, p. 729–734, 1 jan. 2005.

HSUEH, A. J. W.; ADASHI, E. Y.; JONES, P. B. C.; WELSH, T. H. Hormonal Regulation of the Differentiation of Cultured Ovarian Granulosa Cells. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 76–127, 1 jan. 1984.

HUATAY CASAS, M.; CASTOPE LLASAC, N. Sincronización del estro e inseminación artificial en asnas (*Equus africanus asinus*) en el departamento de Cajamarca. **Universidad Nacional de Cajamarca**, 2014. Disponível em: <<http://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/432>>. Acesso em: 17 jul. 2017.

HUNTER, M. G.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal Reproduction Science**, Research and Practice III. 15th International Congress on Animal Reproduction. v. 82–83, p. 461–477, jul. 2004.

IBGE, I. B. de G. e E. **IBGE | Séries Estatísticas & Séries Históricas**. Disponível em: <<http://serieestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&vcodigo=AGRO120&t=efetivo-animais-estabelecimentos>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

ISHIMORI, H.; SAEKI, K.; INAI, M.; NAGAO, Y.; ITASAKA, J.; MIKI, Y.; SEIKE, N.; KAINUMA, H. Vitricification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 427–433, 1 ago. 1993.

IZRAELY, H.; CHOSHNIAC, I.; STEVENS, C. E.; DEMMENT, M. W.; SHKOLNIK, A. FACTORS DETERMINING THE DIGESTIVE EFFICIENCY OF THE DOMESTICATED DONKEY (*EQUUS ASINUS ASINUS*). **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, n. 74, p. 1–6, 1989.

JACOB, J. C. F. Dinâmica ovariana e endócrina de éguas em diferentes idades. 13 jul. 2007. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/1702>>. Acesso em: 31 maio. 2016.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J. L. Germline Stem Cells and Follicular Renewal in the Postnatal Mammalian Ovary. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 145–150, 11 mar. 2004.

JONES, P. A. Adaptation in donkeys. **Draught Animal News**, n. 47, p. 12–26, 2009.

JORDANA, J.; FERRANDO, A.; MIRÓ, J.; GOYACHE, F.; LOARCA, A.; MARTÍNEZ LÓPEZ, O. r.; CANELÓN, J. l.; STEMMER, A.; AGUIRRE, L.; LARA, M. a. c.; ÁLVAREZ, L. a.; LLAMBÍ, S.; GÓMEZ, N.; GAMA, L. t.; NÓVOA, M. f.; MARTÍNEZ, R. d.; PÉREZ, E.; SIERRA, A.; CONTRERAS, M. a.; GUASTELLA, A. m.; MARLETTA, D.; ARSENOS, G.; CURIK, I.; LANDI, V.; MARTÍNEZ, A.; DELGADO, J. v. Genetic Relationships among American Donkey Populations: Insights into the Process of Colonization. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 133, n. 2, p. 155–164, 1 abr. 2016.

KAGAWA, N.; KIKUCHI, I.; KUWAYAMA, M. Ovarian Tissue Vitricification for Fertility Preservation. In: ALLAHBADIA, G.; KUWAYAMA, M.; GANDHI, G. (Ed.). **Vitricification in Assisted Reproduction**. [s.l.] Springer India, 2015. p. 43–49.

KAINER, R. A. Reproductive organs of the mare. **Equine Reproduction**, p. 5–19, 1993.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitricification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 2, p. 164–170, 1 jan. 2004.

KIM, S. S.; OLSEN, R.; KIM, D. D.; ALBERTINI, D. F. The Impact of Vitrification on Immature Oocyte Cell Cycle and Cytoskeletal Integrity in a Rat Model. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 6, p. 739–747, 1 jun. 2014.

KING, G. J. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. Second Edition. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 20, n. 12, p. 360, dez. 1979.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- β Superfamily Members and Ovarian Follicle Development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 191–206, 1 ago. 2006.

LANGDON, J. **Horses, oxen and technological innovation: the use of draught animals in English farming from 1066-1500**. [s.l.] Cambridge University Press, 2002.

LEIBO, S. P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 303–326, 1 jan. 2002.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R. de; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. da C. e. Criopreservação do Sêmen Bovino. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 4, 3 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.pgsskroton.com.br/seer/index.php/JHealthSci/article/view/1147>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

LEMMA, A.; SCHWARTZ, H. J.; BEKANA, M. Application of Ultrasonography in the Study of the Reproductive System of Tropical Jennies (Shape Equus Asinus). **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, n. 4, p. 267–274, maio 2006.

LEONEL, E. C. R. **Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas**. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/15123>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

LIMA, F. T. R. de. **Avaliação da crioinjúria em ovócitos imaturos e maturados in vitro e produção de embriões a partir de ovócitos bovinos vitrificados em Open Pulled Straw (OPS) e Cryotop**. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/20754>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

LOPES, M. D. Técnicas de reprodução assistida em pequenos animais. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 1, p. 33–39, 2001.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. Study of Preantral Follicle Population in Situ and after Mechanical Isolation from Caprine Ovaries at Different Reproductive Stages. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 3–4, p. 223–236, 16 ago. 1999.

LUNARDI, F. O.; FERREIRA, I. S.; BERNUCI, M. P. Banco de Ovário: Uma Alternativa para Preservação de Fertilidade em Mulheres Diagnosticadas com Câncer. **Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 3, 18 dez. 2013. Disponível em: <<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/3222>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

MACLELLAN, L. J.; CARNEVALE, E. M.; SILVA, M. A. C. da; SCOGGIN, C. F.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Pregnancies from Vitrified Equine Oocytes Collected from Super-Stimulated and Non-Stimulated Mares. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 911–919, 1 set. 2002.

MANDAWALA, A. A.; HARVEY, S. C.; ROY, T. K.; FOWLER, K. E. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1637–1644, 15 out. 2016.

MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. ., M.; EGITO, A. A.; PAIVA, S. R.; CASTRO, S. T. R. Conservação De Raças Brasileiras Ameaçadas De Extinção E A Importância De Sua Inserção Em Sistemas De Produção. **Agrociência**, v. IX, n. 2 e 3, p. 459–464, 2005.

MARINIER, S. L.; ALEXANDER, A. J.; WARING, G. H. Flehmen behaviour in the domestic horse: discrimination of conspecific odours. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 19, n. 3, p. 227–237, 1988.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; JR, J. E. M.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; BÃO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, n. 2, p. 173–182, maio 2007.

MATTOS, L. M. **Recuperação e criopreservação de germoplasma de mamíferos silvestres mortos no bioma Cerrado do Distrito Federal: uma estratégia para conservação animal ex situ.** Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/21597>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

MCCORT, W. D. **The behavior and social organization of feral asses (*Equus asinus*) on Ossabaw Island, Georgia.** [s.l.] Pennsylvania State University, 1980.

MCDONNELL, S. M. Reproductive behavior of donkeys (*Equus asinus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, n. 2–3, p. 277–282, 15 nov. 1998.

MCENTEE, M. **Reproductive Pathology of Domestic Mammals.** [s.l.] Elsevier, 2012.

MEDEIROS, S. F.; YAMAMOTO, M. M. W. Mecanismos do consumo folicular ovariano. **Reprod. clim**, v. 13, n. 1, p. 18–27, 1998.

MELLO, A. da S. **Nordeste brasileiro: estudos e impressões.** 1. ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 1953.

MELO, T. C. **MODELO DA SERRINHA - JUMENTO BRASILEIRO** Ribeirão Preto/SP - Brasil, 17 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=ujGZKfCxYFQ>>.

MOEHLMAN, P. D. Feral asses (*Equus africanus*): intraspecific variation in social organization in arid and mesic habitats. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, n. 2–3, p. 171–195, 15 nov. 1998.

MOREL, M. C. G. D. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management, 4th Edition.** [s.l.] CABI, 2015.

MORLEY, S. A.; MURRAY, J.-A. Effects of Body Condition Score on the Reproductive Physiology of the Broodmare: A Review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 7, p. 842–853, jul. 2014.

MOUSSA, M.; BERSINGER, I.; DOLIGEZ, P.; GUIGNOT, F.; DUCHAMP, G.; VIDAMENT, M.; MERMILLOD, P.; BRUYAS, J.-F. In Vitro Comparisons of Two Cryopreservation Techniques for Equine Embryos: Slow-Cooling and Open Pulled Straw (OPS) Vitrification. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p. 1619–1632, 15 out. 2005.

NAYUDU, P. L.; OSBORN, S. M. Factors Influencing the Rate of Preantral and Antral Growth of Mouse Ovarian Follicles in Vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 2, p. 349–362, 1 jul. 1992.

NICOLAU, J. A.; VARGAS, G. T.; BALZON, D. R. A indústria brasileira de carnes de frango e de suínos: Principais mudanças nos anos 90. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 29, n. 2, p. 201–218, 2001.

NOBRE, F. V. Os eqüídeos no Brasil, especialmente no Nordeste. In: Anais, Fortaleza-CE. **Anais...** In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA. Fortaleza-CE: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1980.

NOWAK, A.; KOCHAN, J.; PAPIS, K.; OKÓLSKI, A. Studies on Survival of Horse Oocytes After Rapid-i Method Vitrification. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 5, p. 675–679, maio 2014.

NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: A preliminary study. **Theriogenology**, v. 39, n. 4, p. 811–821, 1 abr. 1993.

OSÓRIO, J. P.; CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; SILVA, E. C. da; LIMA, A. L. Princípios do Congelamento de Sêmen do Garanhão. **Journal of Health Sciences**, v. 10, n. 2, 6 jul. 2015. Disponível em: <<http://pgsskroton.com.br/seer/index.php/JHealthSci/article/view/1513>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

PASHOAL, H. **Pajero da Aliança**, 2014. Disponível em: <<http://harasdopaschoal.com.br/imagens/animais/1008.jpg>>.

PAYAN-CARREIRA, R.; PIRES, M. A. Multioocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 977–982, maio 2008.

PEGG, D. E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5–13, fev. 2002.

PICTON, H. M. Activation of Follicle Development: The Primordial Follicle. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1193–1210, 1 abr. 2001.

PINHEIRO, V.; BELAZ, K. R. A.; EBERLIN, M. N.; RAZZA, E. M.; BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Differences in the Lipid Profile of the Oviduct of Aberdeen Angus and Nelore Heifers with High and Low Follicular Population. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 331–331, 11 mar. 2014.

POLENZ, M. F. Expressão gênica de complexo cúmulus: ovócito equino antes e após a vitrificação. 2016. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/148318>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

PORTUGAL, A. V. Sistemas de Produção de alimentos de origem animal no futuro. **RPCV**, v. 97, 2002. Disponível em: <http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/edicao/6_2002/502_63_70.htm>. Acesso em: 28 fev. 2017.

PRENTICE, J. R.; ANZAR, M. Cryopreservation of Mammalian Oocyte for Conservation of Animal Genetics. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. e146405, 21 set. 2010.

PUGH, D. G. Donkey reproduction. In: Proc. Am. Assoc. Equine Pract, **Anais...**2002. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2002/910102000113.PDF>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

RAHMAN, M. M.; MAZZILLI, M.; PENNAROSSA, G.; BREVINI, T. A. L.; ZECCONI, A.; GANDOLFI, F. Chronic mastitis is associated with altered ovarian follicle development in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1885–1893, abr. 2012.

RENNER-MARTIN, T. F. P.; FORSTENPOINTNER, G.; WEISSENGRUBER, G. E.; EBERHARDT, L. Gross Anatomy of the Female Genital Organs of the Domestic Donkey (*Equus Asinus* Linné, 1758). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 38, n. 2, p. 133–138, 1 abr. 2009.

ROCHA, B. do P. L. P. Perfil proteico do fluido folicular durante a foliculogênese da égua. 2014. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/114683>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

ROSSETTO, R.; LIMA, I. M. T.; SARAIVA, M. V. A.; LIMA-VERDE, I. B.; SALES, E. T.; FIGUEIREDO, J. R. de. AVANÇOS NO ISOLAMENTO E SISTEMAS DE CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS. v. 5, n. 1, p. 15–23, 3 jan. 2011.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles*. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 4, p. 783–790, abr. 1993.

RUA, M. A. da S.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A.; JÚNIOR, A. B.; VEGA, H. O.; RIBEIRO, M. da S. Aspiração folicular, maturação in vitro e injeção intracitoplasmática em éguas. **PUBVET**, v. 10, p. 190–270, 18 out. 2015.

SAMPAIO DA SILVA, A. M.; BRUNO, J. B.; DE LIMA, L. F.; RIBEIRO DE SÁ, N. A.; LUNARDI, F. O.; FERREIRA, A. C. A.; VIEIRA CORREIA, H. H.; DE AGUIAR, F. L. N.; ARAÚJO, V. R.; LOBO, C. H.; DE ALENCAR ARARIPE MOURA, A.; CAMPELLO, C. C.; SMITZ, J.; DE FIGUEIREDO, J. R.; RIBEIRO RODRIGUES, A. P. Connexin 37 and 43 gene and protein expression and developmental competence of isolated ovine

secondary follicles cultured in vitro after vitrification of ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1457–1467, maio 2016.

SANFILIPPO, S.; CANIS, M.; SMITZ, J.; SION, B.; DARCHA, C.; JANNY, L.; BRUGNON, F. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, p. 67, 2015.

SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; MELO, M. A. P.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 9–15, 2008.

SHEIKHI, M.; HULTENBY, K.; NIKLASSON, B.; LUNDQVIST, M.; HOVATTA, O. Preservation of human ovarian follicles within tissue frozen by vitrification in a xeno-free closed system using only ethylene glycol as a permeating cryoprotectant. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 1, p. 170–177.e2, jul. 2013.

SILVA-SANTOS, K. C.; SENEDA, M. M. Multioocyte follicles in adult mammalian ovaries. **Anim Reprod**, v. 8, p. 58–67, 2011.

SILVEIRA, C. O.; GUIMARÃES, J. D.; SILVEIRA, R. O.; CHRISTILIS, M.; FERNANDES, L. S. CONSIDERAÇÕES SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO. **ANAIS SIMPAC**, v. 3, n. 1, 17 ago. 2015. Disponível em: <<https://academico.univicoso.com.br/revista/index.php/RevistaSimpac/article/view/349>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

SOUZA. **Jumento melhora e conquista mercados - Geral**. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/geral,jumento-melhora-e-conquista-mercados,42606>>. Acesso em: 26 fev. 2017.

SOUZA, S. S.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; SANTOS, J. D. R.; DIOGENES, Y. P.; BHAT, M. H.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. F.; TEIXEIRA, D. I. A. Relationship of Doppler velocimetry parameters with antral follicular population and oocyte quality in Canindé goats. **Small Ruminant Research**, v. 141, p. 39–44, ago. 2016.

STANLEY, P. **Simpson's Donkey: A wartime journey**. [s.l.] Allen & Unwin, 2011.

STARKEY, P.; STARKEY, M. **Regional and world trends in donkey populations in: Donkeys, people and development. A resource book of the Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa**. Wageningen, The Netherlands.: Centre for Agricultural and Rural Cooperation, 2000.

THOMSON, K.; ATESS, V.; LAIRD, M.; FRANKS, S.; HARDY, K. The Role of the Epidermal Growth Factor (EGF) Receptors (ErbBs) in Mouse Preantral Follicle Development. 14 out. 2016. Disponível em: <<http://www.endocrine-abstracts.org/ea/0044/ea0044p222.htm>>. Acesso em: 16 jun. 2017.

TING, A. Y.; YEOMAN, R. R.; CAMPOS, J. R.; LAWSON, M. S.; MULLEN, S. F.; FAHY, G. M.; ZELINSKI, M. B. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. **Human Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1267–1279, 1 maio 2013.

TORRES, A. D. P.; JARDIM, W. R. **Criacao do cavalo e outros equinos**. 3. ed. São Paulo/SP: Nobel, 1992.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 357–364, 2 jul. 2000.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of Mammalian Oocytes and Their Growth, Differentiation and Maturation within Ovarian Follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, abr. 2005.

VANDEPLASSCHE, G. M.; WESSON, J. A.; GINTHER, O. J. Behavioral, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys. **Theriogenology**, v. 16, n. 2, p. 239–249, ago. 1981.

VIEIRA, P. A. **O Jumento, Nosso Irmão**. 2. ed. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos, 1964.

WALT, M. L.; STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; NEELY, D. P.; BRADBURY, R. Development of the Equine Ovary and Ovulation Fossa. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, n. 27, p. 471–477, 1979.

WARREN, L.; MURAWSKI, M.; WILK, K.; ZIEBA, D. A.; BARTLEWSKI, P. M. Suitability of Antral Follicle Counts and Computer-Assisted Analysis of Ultrasonographic and Magnetic Resonance Images for Estimating Follicular Reserve in Porcine, Ovine and Bovine Ovaries Ex Situ. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 5, p. 576–584, 1 maio 2015.

WEAVER, S. **The Donkey Companion: Selecting, Training, Breeding, Enjoying & Caring for Donkeys**. [s.l.] Storey Publishing, 2012.

WEEKS, J. W.; CROWELL-DAVIS, S. L.; HEUSNER, G. Preliminary study of the development of the Flehmen response in *Equus caballus*. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 78, n. 2, p. 329–335, 2002.

ZEDER, M. A. **Documenting Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms**. [s.l.] University of California Press, 2006.

ZHMAKIN, A. I. Physical Aspects of Cryobiology. **Uspekhi Fizicheskikh Nauk**, v. 51, n. 3, p. 243–266, 2008.

**Perspectivas de aplicação de biotécnicas reprodutivas para a conservação e
multiplicação de fêmeas asininas**

Perspectivas da aplicação de biotécnicas reprodutivas para a conservação e multiplicação de fêmeas asininas

Katia Regina Freire Lopes¹

Alexandre Rodrigues Silva²

Resumo

A aplicação de biotécnicas reprodutivas às diversas espécies tem cumprido diversos papéis, da salvaguarda de espécies em risco ao aumento da produtividade no campo. Para tanto melhorias contínuas nestas técnicas surgem continuamente, mas quase sempre voltadas ou utilizadas nas espécies de maior potencial econômico, ou mesmo para o homem. Com os asininos, uma espécie que vem perdendo espaço entre os rebanhos mantidos pelo homem, estes estudos são limitados, especialmente quando comparados a outros animais de mesmo porte ou importância histórica. Esta revisão de literatura tem por objetivo identificar as biotécnicas mais relevantes que já foram realizadas nos asininos ou que possuem grande potencial para uso. Do universo das biotécnicas reprodutivas, focou-se naquelas capazes de recompor ou aumentar populações de raças asininas em risco de extinção, para evitar a perda deste importante patrimônio genético.

1. Introdução

Equinos e asininos, sendo animais do mesmo gênero, apresentam muitas características comuns do ponto de vista anatômico (GETTY *et al.*, 1986) e fisiológico. A consequência deste fato é que há um grande potencial de que muitas biotécnicas aplicadas a uma espécie, com sucesso, possam ser igualmente aplicadas à outra espécie. Para os equídeos, o uso de biotécnicas reprodutivas é especialmente importante para aumentar a taxa de sucesso de descendentes com características desejadas, substituindo coberturas que naturalmente poderiam ocorrer com dificuldades e reservar gametas para uso futuro, neste último caso, auxiliando a conservar espécies e raças (CECCHI *et al.*, 2006; QUARESMA *et al.*, 2015). A atividade econômica da equideocultura é fortemente baseada nestas técnicas e

¹ Laboratory of Animal Germplasm Conservation – LCGA, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil. E-mail: katiaregina.dna@gmail.com

² Laboratory of Animal Germplasm Conservation – LCGA, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil. E-mail: alexrs2000@gmail.com

o comércio de gametas mobiliza milhões em recursos financeiros e ocupa muitos profissionais no Brasil e no Mundo (LOOMIS, 2001; CRESSENT; JEZ, 2013; MASERATI e MUTTO, 2016).

Para os asininos, em particular, além do aprimoramento da espécie, um outro interesse mobiliza o avanço da técnica que é a produção de muares. Sob a ótica econômica, os muares hoje ocupam uma posição de vanguarda quando comparados aos asininos, inclusive no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2016). A cruza entre o macho asinino e a fêmea equina produz comumente um rebento com o porte herdado da mãe e a rusticidade e resistência do macho (CANISSO *et al.*, 2010), mas a cruza natural é dificultada por diferenças anatômicas entre as espécies, especialmente a altura da cernelha dos equinos, superior a dos asininos. Em condições naturais, dificilmente um macho asinino possui estatura para cobrir uma égua e as biotécnicas aumentam as chances de sucesso deste cruzamento (CANISSO, 2008; CANISSO *et al.*, 2011; ROSSI *et al.*, 2012).

As biotécnicas reprodutivas aplicadas são diversas e bem consolidadas em diferentes espécies mamíferas, mas poucas são aplicadas às fêmeas asininas. Neste sentido, este trabalho visa descrever, com base na literatura disponível, algumas biotécnicas reprodutivas com potencial para uso em asininos, ou já em uso, que possibilitem auxiliar a reprodução assistida, a conservação de raças, o controle populacional em casos de superpopulação ou decréscimo da mesma. Para tanto será destacado aspectos da fisiologia reprodutiva da espécie, bem como a descrição das técnicas já utilizadas na própria espécie e em espécies equídeas similares.

2. Aspectos Fisiológicos

As Jumentas entram na fase fértil entre 24 e 36 meses de vida, e amaturidade sexual ocorre em torno dos 5 anos, com grande variação, inclusive impactada por fatores ambientais (BLANCHARD *et al.*, 1999; PUGH, 2002). Os ovários dos asininos possuem a forma de rim ou feijão, similarmente aos equinos (AARDE *et al.*, 1988; KAINER, 1993), com uma região côncava, claramente definida, em sua borda livre (oposta àquela borda onde conectam-se vasos, nervos e ligamentos), chamada de fossa de ovulação. Este formato é diferente dos demais mamíferos, cujos formatos mais comuns são o de cachos de uva entre as múltiparas e ovóide entre as uníparas (GETTY *et al.*, 1986). É na região cortical na qual

os folículos e oócitos são encontrados, conseqüentemente, a ovulação ocorre somente na fossa de ovulação (WALT *et al.*, 1979).

O ciclo estral da fêmea asinina varia entre 22 e 28 dias dos quais 5 a 9 dias compreendem o estro (FIELDING, 1988). Após o início das manifestações do estro, contam-se 5 a 6 dias até a ovulação (VANDEPLASSCHE *et al.*, 1981). Num estudo que acompanhou 50 ciclos, detectou-se a ocorrência de 55,6%, 42,45% e 1,89% para ovulações simples, duplas e triplas, respectivamente (TABERNER *et al.*, 2008).

A fêmea asinina em estro adota comportamento para destacar-se entre as demais fêmeas e chamar a atenção dos machos. Entre as principais posturas, destacam-se: cabeça baixa com o pescoço estendido à mesma altura do dorso; orelhas para trás, paralelas ao pescoço, abrir e fechar constante da boca, passa a urinar com mais frequência, mantém as pernas traseiras abertas e cauda levantada numa atitude clara de exibição do períneo (MCCORT, 1980). Destacam-se ainda por vocalizar com maior frequência e por executar movimentos de forma mais rápida e exagerada (MCDONNELL, 1998).

Os asininos formam grupos matriarcais errantes e os machos fixam-se em territórios (MOEHLMAN, 1998). Os grupos de fêmeas e filhotes, que podem chegar a 15 indivíduos, por outro lado, não se fixam num território específico. Eles transitam entre os territórios dos machos, ou em áreas não dominadas, buscando sempre as melhores condições de vida para o grupo. Não há padrões específicos de tempo de permanência num território (MCDONNELL, 1998).

Apesar de serem detectadas grandes variações na duração da gestação entre diferentes estudos, que já observaram períodos entre 339 e 370 (CRISCI *et al.*, 2014), 360 e 375 (WEAVER, 2012) e 362 a 375 dias (BARROS *et al.*, 2012), admite-se que a duração da gestação é de aproximadamente de 370 dias.

3. Métodos de controle reprodutivo

A aplicação de biotécnicas reprodutivas depende drasticamente dos ciclos estrais das fêmeas pois toda a logística e sucesso da execução da maior parte das técnicas está ligada à fase do ciclo. Para aumentar as chances de uma fertilização bem sucedida são estudadas técnicas para alterar a época do estro, sincronizar o estro e favorecer a superovulação.

Para os asininos os ciclos reprodutivos estão conectados à estação do ano (em virtude de alterações climáticas e oferta de alimento, água e abrigo) (BLANCHARD *et al.*,

1999) e já foi verificado que o comprimento do estro na primavera e no verão são significativamente mais longos, em comparação com o outono e o inverno, sendo o diestro mais curto no verão do que nas outras estações. Na primavera e verão, os folículos que chegam à ovulação apresentam dimensões maiores que nas demais estações (CONTRI *et al.*, 2014). Em regiões tropicais, onde as estações do ano não são tão claramente definidas, mas há clara distinção entre a estação chuvosa e não chuvosa, as jumentas produzem um número maior de folículos na estação chuvosa, em comparação com às estações secas, sendo os intervalos interovulatórios mais curtos durante a estação chuvosa (LEMMA *et al.*, 2006).

Contudo, a dependência da sazonalidade climática, e a consequente sazonalidade da oferta de alimentação, água e diferentes durações de dias e noites, implica em dificuldades de manejo de grupos de animais, pois consome esforços e recursos e impactam negativamente na aplicação de biotécnicas como a inseminação artificial. Neste contexto, foram desenvolvidas estratégias para estimular ou suprimir os ciclos ou parte dos ciclos, para que os animais de um mesmo grupo se mantenham com seus ciclos o mais fortemente sincronizados quanto possível.

Nos asininos, ainda não há métodos consolidados para o controle do ciclo estral, o que compromete o emprego de biotécnicas comuns em outras espécies (GOUDET *et al.*, 2016). O ciclo estral dos equídeos é impactado pelo comprimento dos dias e noites, sendo mais curtos quando os dias são mais longos (FIELDING, 1988). Assim, estratégias de aumentar artificialmente a duração dos dias, deixando os animais expostos a 15 a 16 horas de iluminação natural mais artificial, as quais têm sido utilizadas em equinos para antecipar ou diminuir o diestro em éguas (MURPHY *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2016) poderiam ter o mesmo efeito sobre as fêmeas asininas.

Outra estratégia de sincronização dos ciclos em grupos de fêmeas é alterar o equilíbrio hormonal das fêmeas, dado que há uma forte relação entre as concentrações hormonais e os ciclos estrais. Em equinos, estudos com progestágenos de uso oral e implantes intra vaginais mostram que ambos são eficazes em estratégias de sincronização de estro, com pequeno destaque ao implante (ALMEIDA *et al.*, 2001). Além disso, sabe-se que a prolactina possui efeito de estimulação do ciclo estral e no desenvolvimento folicular nos equinos (NEQUIN *et al.*, 1993), podendo ser administrada diretamente de modo exógeno (BESOGNET *et al.*, 1997). Em adição, o uso de sulpiride ou domperidone, antagonistas da

dopamina, antecipam o fim do diestro em éguas, à medida em que induzem aumento da concentração de prolactina (MARI *et al.*, 2009; PANZANI *et al.*, 2011).

A administração de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em éguas induz a ovulação em até 48 h após a injeção (SQUIRES *et al.*, 1994). De forma similar, com a administração de doses únicas de lecirelina (um análogo de GnRH), ocorre uma redução significativa no tempo para a ovulação bem como no tamanho dos folículos, que foram maiores, quando comparadas a éguas que não receberam o estímulo.

Por outro lado, além do controle do período da ovulação, a possibilidade de dispor de múltiplos oócitos no ciclo, amplia as chances de sucesso na biotécnicas reprodutivas, de modo que a indução de múltiplas ovulações seria desejável especialmente nos equídeos. Contudo, contrariamente a outras espécies de interesse zootécnico, nestes, tais métodos têm uma eficiência muito baixa (SMITS *et al.*, 2012) e mesmo as rotinas já testadas, como o uso de hormônio folículo estimulante, geram resultados inexpressivos (MEYERS-BROWN *et al.*, 2011).

4. Inseminação Artificial

A inseminação artificial (IA) foi a primeira biotecnologia a ser aplicada em escala global para melhorar o patrimônio genético e a produtividade dos animais de interesse zootécnico. Da necessidade de aumentar a qualidade dos resultados da IA que surgiram outras pesquisas como criopreservação, cultivo e transferência de células e tecidos, regulação do ciclo estral e até mesmo a clonagem (FOOTE, 2002).

Em jumentos Poitou, raça francesa em risco de extinção, a inseminação artificial utilizando sêmen criopreservado proporcionou o nascimento de crias. Contudo a taxa de sucesso foi considerada muito baixa e atribui-se este fato ao efeito tóxico do glicerol sobre os espermatozoides asininos, pois apesar de favorecer a integridade dos espermatozoides, mostrou-se impeditivo para a fertilização e, apenas após sua completa retirada, foi obtido sucesso na gestação (TRIMECHE *et al.*, 1998). Estudos comparativos entre cavalos e jumentos determinaram que sob as mesmas condições, a taxa de sucesso de fertilização pós-criopreservação em asininos é sempre menor que em equinos, e que os asininos são pelo menos duas vezes mais sensíveis à toxicidade do glicerol, seja por danos ao espermatozoide, seja por efeitos negativos causados à fêmea (VIDAMENT *et al.*, 2009). Sob as mesmas condições e crioprotetores, a taxa de gestação pós-congelamento do sêmen com uso de glicerol

chega a 53% nas éguas, mas apenas 21% nas jumentas. Por outro lado, a substituição do glicerol por outras substâncias, como o dimetilsulfoxido, dimetilformamida ou dimetilacetamida não proporcionou elevação significativa na taxa de concepção em jumentas (ROTA *et al.*, 2012).

Em um estudo conduzido com jumentas nordestinas, monitorou-se a presença de folículos ovarianos antrais e observou-se que quando os mesmos atingem 30 a 35mm, isto é um indicativo do momento apropriado para a indução da ovulação. Para este propósito, foram utilizadas doses de 1.500 a 2.500UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG), sendo possível a efetiva realização da IA após 24h (BARROS *et al.*, 2012).

Diante de um cenário onde o uso da IA não consegue atingir bons resultados, os estudos mais recentes têm focado no aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen. A congelação lenta utilizando equipamento para controlar a queda gradual da temperatura tem efeitos superiores ao método manual; o aumento do número de espermatozoides por dose de sêmen, quando comparado a equinos, também melhora a taxa de sucesso, podendo atingir 93% de concepção; inseminações profundas nos cornos uterinos também favorecem o sucesso da biotécnica (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

5. Maturação e Fertilização *in vitro*

O uso da fertilização *in vitro* (FIV) possui como limitação o número de células reprodutivas femininas cuja obtenção é mais complexa que as masculinas. Nos equídeos, com a dificuldade de realizar superovulações, a chance de sucesso da FIV cai drasticamente (SESSIONS-BRESNAHAN *et al.*, 2014). A maturação *in vitro* (MIV) auxilia a diminuir este problema à medida em que possibilita a captura de um grande número de oócitos imaturos e permite, num ambiente controlado, levá-los à maturidade, dando continuidade ao processo reprodutivo (RUA *et al.*, 2015)

Quando comparadas a outros mamíferos, as taxas de sucesso na maturação *in vitro* de oócitos equinos são baixas, com o máximo de 60% de oócitos atingindo o estágio de metáfase II (MII) (CARNEIRO *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2006). As causas deste insucesso não são claras, mas estudos apontam para as sucessivas alterações bioquímicas da meiose (GOUDET *et al.*, 2016).

Para asininos, um estudo com 3 meios de cultivo distintos e suplementos de FSH suíno, hormônio luteinizante (LH) equino e fator de crescimento semelhante a Insulina-I

(IGF-I), mostro a viabilidade não só da maturação, mas também da ativação do oócitos asininos, tornando-os aptos à fertilização (ZHAO *et al.*, 2011).

No tocante à FIV em equinos, este procedimento tem baixas taxas de sucesso e, em asininos são ainda superficiais (GOUDET *et al.*, 2016). A capacitação inadequada de espermatozoides sob condições *in vitro* é comumente apontada como o maior obstáculo à FIV equina. Mesmo com a reprodução das condições do fluido do oviduto de forma artificial, há pouco sucesso na penetração do espermatozoide nos oócitos *in vitro* (LEEMANS *et al.*, 2016). Contrariamente à FIV tradicional, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é replicável em equinos e possui boas taxas de sucesso mesmo com espermatozoides frescos ou criopreservados apresentando baixa motilidade (RUA *et al.*, 2015). Entretanto, o procedimento requer equipamento e pessoal especializado, e um custo comparativamente mais alto que a FIV convencional (SANCHEZ *et al.*, 2016).

Uma recente tentativa para estabelecer um protocolo de FIV para asininos utilizou espermatozoides desta espécie associados tanto a oócitos asininos como equinos. Para tanto, utilizou-se o meio de cultivo tecidual 199 (TCM199) suplementado com soro fetal bovino (SFB) e fator de crescimento epidermal (FCE ou EGF - Epidermal growth fator), conforme adaptado de protocolos utilizados para a FIV em equinos. Os espermatozoides foram diluídos a uma concentração de $5 \times 10^6/\text{ml}$ em meio Whitten suplementado de 5mM de procaína, para induzir hiperatividade. Comparados com os equinos, este desenvolvimento apresentou-se mais lento, porém viável. Mesmo sem realizar a implantação dos zigotos, e comprovar a eficiência em conduzir à prenhez, o estudo aponta caminhos positivos para a FIV em asininos (GOUDET *et al.*, 2016).

6. Tecnologia de embriões

A Transferência de embriões (TE), assim como a inseminação artificial são biotécnicas muito executadas em equídeos. Dentre os asininos, esta biotécnica vem ganhando espaço no fomento de estratégias de conservação de algumas raças (PANZANI *et al.*, 2012a). Salienta-se que a TE já vem sendo utilizada há bastante tempo em equídeos, especialmente com a finalidade de conservação de espécies, usando éguas e jumentas como receptoras de embriões de cavalos de Przewalski (*Equus przewalski*) e zebras. (*Equus burchelli*) (KYDD *et al.*, 1985).

O uso de ferramentas de diagnóstico por imagem, especialmente a ultrassonografia, é importante no acompanhamento da gestação para detecção do momento de coleta e transferência do embrião, para avaliar a dinâmica folicular e a ecotextura uterina. Estas ferramentas são não invasivas e permitem identificar o momento adequado da colheita. Com isso, a técnica possibilita a colheita do embrião, que em jumentas já foi executada com sucesso através de lavagem uterina com Ringer lactato[®], aquecido a 37°C, sendo todo o líquido drenado e filtrado por material apropriado para reter o embrião (COELHO, 2010).

Em asininos a taxa de gestação subsequente à TE é considerada baixa quando comparadas a outras espécies. Fatores como baixa viabilidade dos embriões, sensibilidade a meios de cultivo, qualidade das receptoras, sincronia entre estros da doadora e receptora, luteólise por liberação de prostaglandina F2 α (PGF2 α) devido à manipulação da cérvix na passagem transcervical, são possíveis fatores relacionados ao baixo sucesso (CAMILLO *et al.*, 2010). No entanto, um estudo utilizando embriões asininos comprovadamente viáveis por meio de transferências não cirúrgicas proporcionou resultados de 50% de taxa de gestação, compatível com equinos (PANZANI *et al.*, 2012b).

Estratégias para aumentar a taxa de sucesso normalmente envolvem a indução do estro, nas fêmeas doadoras para aumentar o número de embriões disponíveis, nas receptoras para que haja garantias de que as condições de recepção serão as melhores possíveis no ato da transferência, ou mesmo na sincronização dos ciclos. Em asininos algumas substâncias tem resultados comprovados, como o luprostiol e o dinoprost trometamina (BOTTREL *et al.*, 2016). Outra estratégia comum é estimular a superovulação, geralmente com uso de hormônio folículo-estimulante (FSH) mas os resultados em equídeos não tem o mesmo impacto que tem em outras espécies (MEYERS-BROWN *et al.*, 2011).

Por serem híbridas, resultado do cruzamento entre equinos e asininos, as mulas são consideradas inférteis, mas possuem ciclos estrais regulares e todos os fenômenos endócrinos a eles relacionados. Desse modo, é possível utilizá-las como receptoras de embriões tanto de éguas (DAVIES *et al.*, 1985) como de jumentas (GONZÁLEZ *et al.*, 2015), resultando no nascimento de filhotes saudáveis.

A criopreservação de embriões aparece como importante ferramenta para salvaguardar o germoplasma de espécies ou raças de interesse zootécnico ou ameaçadas. Neste sentido, foi conduzido um estudo comparativo com embriões de éguas e jumentas, testando os procedimentos de vitrificação por superfície sólida e congelação lenta utilizando

como crioprotetor uma solução à base de metanol, propilenoglicol e sacarose. Assim, demonstrou-se que os embriões de jumentas respondem melhor à vitrificação, apresentando menor injúria celular após a congelação, diferentemente dos embriões de égua que parecem ser mais sensíveis ao processo e por isso sofreram mais danos (PEREZ-MARÍN *et al.*, 2016).

7. Outras biotécnicas

A Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) surge como ferramenta para conhecer a população de folículos ovarianos de uma espécie, auxiliando na conservação de uma grande parcela de oócitos que durante a foliculogênese naturalmente seriam perdidos. Ela consiste no resgate dos folículos, sua manipulação imediata ou conservação por resfriamento ou congelamento e no cultivo dos oócitos a fim de levá-los à maturação e à fecundação (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). A MOIFOPA atende a pelo menos três aspectos relevantes para o estudo da reprodução: o conhecimento mais profundo sobre a foliculogênese e detalhes da fisiologia reprodutiva de espécies e raças; melhoria do desempenho de biotécnicas de reprodução assistida e consequente possibilidade de favorecimento de destaque de características genéticas de rebanhos de espécies de interesse zootécnico; e a recuperação de populações de mamíferos em risco de extinção ou em queda brusca de sua população.

A MOIFOPA já foi aplicada em diversas espécies mas não há relatos de seu uso em asininos, e mesmo em equinos os relatos são escassos (GOMES; SENEDA, 2015), apontados por pesquisadores, como uma biotécnica a ser explorada no futuro (LISBOA *et al.*, 2016). O mesmo afirma-se quanto aos asininos, especialmente considerando-se o grande número de raças em risco de extinção.

Clonagem é um termo geral que se refere à produção de cópias de indivíduos geneticamente idênticos utilizando técnicas de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (KEEFER, 2015). Muito embora as técnicas necessárias para a aplicação da TNCS em asininos, como a maturação *in vitro* e a ativação artificial, já tenham sido descritas (ZHAO *et al.*, 2011) não são conhecidas pesquisas que apliquem qualquer estratégia de clonagem para este grupo de animais.

A TNGS, entretanto, já foi utilizada para produzir uma mula clonada (WOODS *et al.*, 2003). Uma linhagem celular de fibroblastos do doador foi estabelecida a partir de um feto de mula de 45 dias. Os oócitos foram coletados de éguas quarto de milha por aspiração

folicular guiada por ecografia transvaginal, tratados com hialuronidase para remover células do *cumulus*, pelos quais obtiveram-se 334 oócitos manipulados. Destes, 305 foram transferidos para as fêmeas equinas receptoras, resultando em vinte e uma (6,9%) gestações. Percebeu-se neste estudo que embriões mantidos e ativados em meio com concentrações elevadas de cálcio estabeleceram prenhez que mantiveram-se além do 45º dia, resultando no nascimento de uma mula masculina viva, representando uma taxa de 0,3% de sucesso, a partir de uma gestação de 346 dias que culminou num parto natural (WOODS *et al.*, 2003). O sucesso deste estudo abre possibilidades para ampliar a taxa de sucesso para clonagem em equídeos e favorecer a primeira clonagem em asininos.

Considerações finais

Muito embora os asininos sejam uma espécie antiga na trajetória humana é pouco estudada e pouco valorizada nos dias atuais. Contudo há a disponibilidade de diversas biotécnicas, algumas já consagradas em seu uso em outras espécies, que permitem não só conhecer melhor a espécie como também planejar estratégias de conservação e melhoria genética. O emprego de biotécnicas nos asininos, pode privilegiar o reconhecimento da espécie, o ressurgimento como espécie de interesse econômico ou simplesmente a conservação de raças que podem vir no futuro a favorecer o ser humano.

Referências

- AARDE, L. M. W.; AARDE, R. J. van; SKINNER, J. D. Reproduction in Female Hartmann's Zebra, *Equus Zebra Hartmannae*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 2, p. 505–511, 1 nov. 1988.
- ALMEIDA, H. B. de; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P. de; OLIVEIRA, C. A. de. Estrus synchronization and follicular dynamics of Crioulo mares by norgestomet, melengestrol acetate and altrenogest treatments. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 267–272, 2001.
- BARROS, O.; VITORINO, P. V. V.; MAXIMO, V. T.; GALVÃO, R. B. B. FISILOGIA E BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ASININOS. **Ciência Animal**, v. 22, n. 2012, p. 207–218, 2012.
- BESOGNET, B.; HANSEN, B. S.; DAELS, P. F. Induction of reproductive function in anestrus mares using a dopamine antagonist. **Theriogenology**, v. 47, n. 2, p. 467–480, 15 jan. 1997.

BLANCHARD, T. L.; TAYLOR, T. S.; LOVE, C. L. Estrous cycle characteristics and response to estrus synchronization in mammoth asses (*Equus asinus americanus*). **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 827–834, 1 out. 1999.

BOTTREL, M.; ZARZA, E.; FERNANDEZ, L.; ORTIZ, I.; HIDALGO, M.; DORADO, J. A Comparison of Luprostiol and Dinoprost Tromethamine for Induction of Oestrus in Donkey Embryo Transfer. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 501–501, 1 mar. 2016.

CAMILLO, F.; PANZANI, D.; SCOLLO, C.; ROTA, A.; CRISCI, A.; VANNOZZI, I.; BALBO, S. Embryo recovery rate and recipients' pregnancy rate after nonsurgical embryo transfer in donkeys. **Theriogenology**, v. 73, n. 7, p. 959–965, 15 abr. 2010.

CANISSO, I. F. Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga. 13 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/5587>>. Acesso em: 26 fev. 2017.

CANISSO, I. F.; CARVALHO, G. R.; MOREL, M. C. G.; GUIMARAES, J. D.; MCDONNELL, S. M. Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*). **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 56–63, 2010.

CANISSO, I. F.; CARVALHO, G. R.; MOREL, M. D.; KER, P. G.; RODRIGUES, A. L.; SILVA, E. C.; DA SILVA, M. a. C. Seminal Parameters and Field Fertility of Cryopreserved Donkey Jack Semen after Insemination of Horse Mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 2, p. 179–183, 1 mar. 2011.

CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 899–905, 2001.

CECCHI, F.; CIAMPOLINI, R.; CIANI, E.; MATTEOLI, B.; MAZZANTI, E.; TANCREDI, M.; PRESCIUTTINI, S. Demographic genetics of the endangered Amiata donkey breed. **Italian Journal of Animal Science**, v. 5, n. 4, p. 387–391, 1 jan. 2006.

COELHO, P. G. B. Acompanhamento folicular, adaptação da técnica de coleta de embriões e avaliações morfológica e morfométrica de embriões de jumentas da raça Pêga. 11 maio 2010. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/5033>>. Acesso em: 27 mar. 2016.

CONTRI, A.; ROBBE, D.; GLORIA, A.; DE AMICIS, I.; VERONESI, M. C.; CARLUCCIO, A. Effect of the season on some aspects of the estrous cycle in Martina Franca donkey. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 657–661, 15 mar. 2014.

CRESENT, M.; JEZ, C. The French horse industry at present. **Advances in Animal Biosciences**, v. 4, n. s2, p. 54–65, 2013.

CRISCI, A.; ROTA, A.; PANZANI, D.; SGORBINI, M.; OUSEY, J. C.; CAMILLO, F. Clinical, Ultrasonographic, and Endocrinological Studies on Donkey Pregnancy. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 275–283, 15 jan. 2014.

DAVIES, C. J.; ANTCZAK, D. F.; ALLEN, W. R. Reproduction in Mules: Embryo Transfer Using Sterile Recipients. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. S3, p. 63–67, 1 mar. 1985.

FIELDING, D. Reproductive Characteristics of the Jenny donkey—*Equus Asinus*: A Review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 20, n. 3, p. 161–166, 1 set. 1988.

FIGUEIREDO, J. R. de; CELESTINO, J. J. de H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 2, p. 143–152, 2007.

FOOTE, R. H. The History of Artificial Insemination: Selected Notes and Notables. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. E-Suppl_2, p. 1–10, 2002.

GETTY, R.; ROSENBAUM, C. E.; GHOSHAL, N. G.; HILLMANN, D. **Sisson [e] Grossman: anatomia dos animais domésticos**. [s.l.] Guanabara Koogan, 1986.

GOMES, R. G.; DA SILVA, C. B.; GONZÁLEZ, S. M.; LINDQUIST, A. G.; BLASCHI, W.; BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M. EQUINE REPRODUCTION: PHYSIOLOGY AND ADVANCES IN TECHNOLOGY. **Biotechnology of animal reproduction/editors, Marcelo Marcondes**, p. 237, 2016.

GOMES, R. G.; SENEDA, M. M. Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 4, p. 318–322, 23 set. 2015.

GONZÁLEZ, S. M.; GOMES, R. G.; SOUZA, A. K.; SILVA, C. B.; SILVA-SANTOS, K. C.; SENEDA, M. M. Evidences of Regular Estrous Cycles in Mules and Successful Use of These Animals as Recipients for Donkey Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 10, p. 869–872, out. 2015.

GOUDET, G.; DOUET, C.; KAABOUBA-ESCURIER, A.; COUTY, I.; MOROS-NICOLÁS, C.; BARRIÈRE, P.; BLARD, T.; REIGNER, F.; DELEUZE, S.; MAGISTRINI, M. Establishment of conditions for ovum pick up and IVM of jennies oocytes toward the setting up of efficient IVF and in vitro embryos culture procedures in donkey (*Equus asinus*). **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 528–535, 15 jul. 2016.

KAINER, R. A. Reproductive organs of the mare. **Equine Reproduction**, p. 5–19, 1993.

KEEFER, C. L. Artificial Cloning of Domestic Animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 29, p. 8874–8878, 21 jul. 2015.

KYDD, J.; BOYLE, M. S.; ALLEN, W. R.; SHEPHARD, A.; SUMMERS, P. M. Transfer of Exotic Equine Embryos to Domestic Horses and Donkeys. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. S3, p. 80–83, 1 mar. 1985.

LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E.; SCHAUWER, C. D.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; SOOM, A. V. Why Doesn't Conventional IVF Work in the Horse? The Equine Oviduct as a Microenvironment for Capacitation/Fertilization. **Reproduction**, v. 152, n. 6, p. R233–R245, 1 dez. 2016.

LEMMA, A.; BEKANA, M.; SCHWARTZ, H. J.; HILDEBRANDT, T. Ultrasonographic study of ovarian activities in the tropical jenny during the seasons of high and low sexual activity. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 1, p. 18–22, jan. 2006.

LISBOA, L. A.; DA SILVA, C. B.; GONZÁLEZ, S. M.; BÚFALO, I.; SENEDA, M. M. IN VITRO CULTURE OF PREANTRAL FOLLICLES. **Biotechnology of animal reproduction/editors, Marcelo Marcondes**, p. 271, 2016.

LOOMIS, P. R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, Symposium on Stallion Reproduction. v. 68, n. 3–4, p. 191–200, 3 dez. 2001.

MARI, G.; MORGANTI, M.; MERLO, B.; CASTAGNETTI, C.; PARMEGGIANI, F.; GOVONI, N.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrous mares. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 959–965, 1 abr. 2009.

MASERATI, M.; MUTTO, A. In Vitro Production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. **Journal of Equine Veterinary Science**, Proceedings from the International Equine Embryo Symposium. v. 41, p. 42–50, jun. 2016.

MCCORT, W. D. **The behavior and social organization of feral asses (*Equus asinus*) on Ossabaw Island, Georgia**. [s.l.] Pennsylvania State University, 1980.

MCDONNELL, S. M. Reproductive behavior of donkeys (*Equus asinus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, n. 2–3, p. 277–282, 15 nov. 1998.

MEYERS-BROWN, G.; BIDSTRUP, L. A.; FAMULA, T. R.; COLGIN, M.; ROSER, J. F. Treatment with recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) followed by recombinant equine luteinizing hormone (reLH) increases embryo recovery in superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v. 128, n. 1–4, p. 52–59, out. 2011.

MOEHLMAN, P. D. Feral asses (*Equus africanus*): intraspecific variation in social organization in arid and mesic habitats. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, n. 2–3, p. 171–195, 15 nov. 1998.

MURPHY, B. A.; WALSH, C. M.; WOODWARD, E. M.; PRENDERGAST, R. L.; RYLE, J. P.; FALLON, L. H.; TROEDSSON, M. H. T. Blue Light from Individual Light Masks Directed at a Single Eye Advances the Breeding Season in Mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 5, p. 601–605, 1 set. 2014.

NEQUIN, L. G.; KING, S. S.; JOHNSON, A. L.; GOW, G. M.; FERREIRA-DIAS, G. M. Prolactin may play a role in stimulating the equine ovary during the spring reproductive transition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, n. 11, p. 631–635, 1 nov. 1993.

OLIVEIRA, J. V. de; OLIVEIRA, P. V. de L. F.; MELO E OÑA, C. M.; GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; SANCLER DA SILVA, Y. F. R.; PAPA, P. de M.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1267–1273, 15 abr. 2016.

PANZANI, D.; ROTA, A.; CRISCI, A.; KINDAHL, H.; GOVONI, N.; CAMILLO, F. Embryo quality and transcervical technique are not the limiting factors in donkey embryo transfer outcome. **Theriogenology**, v. 77, n. 3, p. 563–569, fev. 2012a.

PANZANI, D.; ROTA, A.; CRISCI, A.; KINDAHL, H.; GOVONI, N.; CAMILLO, F. Embryo quality and transcervical technique are not the limiting factors in donkey embryo transfer outcome. **Theriogenology**, v. 77, n. 3, p. 563–569, fev. 2012b.

PANZANI, D.; ZICCHINO, I.; TARAS, A.; MARMORINI, P.; CRISCI, A.; ROTA, A.; CAMILLO, F. Clinical use of dopamine antagonist sulpiride to advance first ovulation in transitional mares. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 138–143, 1 jan. 2011.

PEREIRA, G. R.; LORENZO, P. L.; CARNEIRO, G. F.; BILODEAU-GOESEELS, S.; KASTELIC, J. P.; PEGORARO, L.; PIMENTEL, C. A.; ESTELLER-VICO, A.; ILLERA, J. C.; SILVAN, G.; OTHERS. Effect of equine growth hormone (eGH) on in vitro maturation of equine oocytes and on steroidogenesis by their cumulus-oocyte complexes. In: Animal Reproduction Science, **Anais...ELSEVIER SCIENCE BV PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS**, 2006.

PEREZ-MARÍN, C. C.; CALERO, G. V.; MARTÍNEZ, J. J. G.; BUENDÍA, E. A.; MARTINEZ, R. V. Comparison of the Effects of Slow Freezing and Vitrification on in Vitro Embryo Quality in Horse and Donkey. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 716–716, 1 mar. 2016.

PUGH, D. G. Donkey reproduction. In: Proc. Am. Assoc. Equine Pract, **Anais...2002**. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2002/910102000113.PDF>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

QUARESMA, M.; MARTINS, A. M. F.; RODRIGUES, J. B.; COLAÇO, J.; PAYAN-CARREIRA, R. Viability Analyses of an Endangered Donkey Breed: The Case of the Asinina de Miranda (*Equus Asinus*). **Animal Production Science**, v. 55, n. 9, p. 1184–1191, 20 ago. 2015.

ROSSI, R.; PALHARES, M. S.; FILHO, S.; M, J.; RIBEIRO, E. A.; RESENDE, Y. F.; ANJOS, F. R. Efeito do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen asinino diluído e resfriado a 5°C por 12 horas de armazenamento. **Arq. bras. med. vet. zootec**, p. 114–119, 2012.

ROTA, A.; PANZANI, D.; SABATINI, C.; CAMILLO, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1846–1854, nov. 2012.

RUA, M. A. da S.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A.; JÚNIOR, A. B.; VEGA, H. O.; RIBEIRO, M. da S. Aspiração folicular, maturação in vitro e injeção intracitoplasmática em éguas. **PUBVET**, v. 10, p. 190–270, 18 out. 2015.

SANCHEZ, R.; HERRERA, C.; BLANCO, M.; ROSATI, I.; LAZZARI, G.; COLLEONI, S.; SIEME, H.; GALLI, C. In Vitro Production of Equine Embryos by Ovum Pick Up and Intracytoplasmic Sperm Injection in Young Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 41, p. 77, 1 jun. 2016.

SESSIONS-BRESNAHAN, D. R.; GRAHAM, J. K.; CARNEVALE, E. M. Validation of a heterologous fertilization assay and comparison of fertilization rates of equine oocytes using in vitro fertilization, perivitelline, and intracytoplasmic sperm injections. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 274–282, 15 jul. 2014.

SMITS, K.; HOOGEWIJS, M.; WOELDERS, H.; DAELS, P.; VAN SOOM, A. Breeding or Assisted Reproduction? Relevance of the Horse Model Applied to the Conservation of Endangered Equids. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 239–248, 1 ago. 2012.

SQUIRES, E. L.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; KEEFE, T. J.; MEYERS, S. A.; FIGUEIREDO, E.; MCCUE, P. M.; JOCHLE, W. Effect of dose of GnRH analog on ovulation in mares. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 757–769, 2 fev. 1994.

TABERNER, E.; MEDRANO, A.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ, J. Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in Catalanian jennies. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1489–1497, dez. 2008.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 793–806, 1 out. 1998.

VANDEPLASSCHE, G. M.; WESSON, J. A.; GINTHER, O. J. Behavioral, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys. **Theriogenology**, v. 16, n. 2, p. 239–249, ago. 1981.

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F.-X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n. 1–2, p. 22–35, maio 2009.

WALT, M. L.; STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; NEELY, D. P.; BRADBURY, R. Development of the Equine Ovary and Ovulation Fossa. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, n. 27, p. 471–477, 1979.

WEAVER, S. **The Donkey Companion: Selecting, Training, Breeding, Enjoying & Caring for Donkeys**. [s.l.] Storey Publishing, 2012.

WOODS, G. L.; WHITE, K. L.; VANDERWALL, D. K.; LI, G.-P.; ASTON, K. I.; BUNCH, T. D.; MEERDO, L. N.; PATE, B. J. A Mule Cloned from Fetal Cells by Nuclear Transfer. **Science**, v. 301, n. 5636, p. 1063–1063, 22 ago. 2003.

ZHAO, G.; WU, K.; CUI, L.; ZHAO, L.; LIU, Y.; TAN, X.; ZHOU, H. In vitro maturation and artificial activation of donkey oocytes. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 700–704, 1 set. 2011.

Characterization of the ovarian preantral follicles population and its correlation with weight and age in Brazilian Northeastern donkeys (*Equus asinus*)

Characterization of the ovarian preantral follicles population and its correlation with weight and age in Brazilian Northeastern donkeys (*Equus asinus*)

Katia Regina Freire Lopes^a, Gabriela Liberalino Lima^a, Luana Grasielle Pereira Bezerra^a, Raimundo Alves Barreto Junior^b, Moacir Franco de Oliveira^a, Alexandre Rodrigues Silva^{a*}

^aLaboratory of Animal Germplasm Conservation - Universidade Federal Rural do Semi-árido. Mossoró-RN. Brasil.

^bLaboratory of Internal Veterinary Medicine- Universidade Federal Rural do Semi-árido. Mossoró-RN. Brasil.

* Corresponding author: Laboratory of Animal Germplasm Conservation - Universidade Federal Rural do Semi-árido - Av. Francisco Mota, 572 - Bairro Costa e Silva. Mossoró-RN. Brasil. CEP: 59.625-900. E-mail address: legio2000@yahoo.com

Abstract

This study aimed to characterize the ovarian follicular population and to determine its correlations with the weight and age of donkeys of the Northeastern Brazilian breed. A total of 10 females with a mean age of 5.1 ± 3.2 years were submitted to ovariectomy by videolaparoscopy to obtain the ovaries. In the laboratory, the ovaries were sectioned into 6 to 12 fragments of approximately 7 mm in diameter, which were fixed in Carnoy, dehydrated in increasing concentrations of alcohol (85%, 95% and absolute), clarified using xylol and finally included in blocks of histological paraffin. The blocks were cut in sections of $7\mu\text{m}$ and each 120th section was mounted on a slide for observation under optical microscopy. The follicle counting and identification allowed the characterization of the population of the

preantral follicles, counted in 21.135 ± 10.821 preantral follicles, of which, 91.32% are primordial follicles, 8.25% are primary follicles and 0.42% are secondary follicles. No differences were found between the ovaries regarding the follicular population ($P > 0.05$). There was a rate of 9.77% of degenerated follicles. Values of 0.99% of follicles containing two oocytes were also identified and classified as multioocyte follicles, always in the primordial category. The thickness of the granulosa cell layer was $1.85 \mu\text{m} \pm 1.39$, $3.56 \mu\text{m} \pm 2.08$ and $21.85 \mu\text{m} \pm 17.27$, for primordial, primary and secondary follicles, respectively. There was a significant inverse correlation ($r = -0.66$; $P < 0.001$) between the age of the animals and the population of ovarian follicles. A negative influence of the weight on the ovarian follicular population was also observed, when very thin or very heavy. It should be pointed out that this was the first study to describe the morphometric characteristics and estimation of the population of preantral ovarian follicles in Northeastern Brazilian breeds, showing that this is negatively influenced by the age of the animals and may also be affected by nutritional problems.

Key words: Jennies; Folliculogenesis, Oocyte; Ovary; Granulosa cell.

1. Introduction

In spite of a world population estimated at 44 million animals (Food and Agriculture Organization, 2016), of the 194 documented breeds (Domestic Animal Diversity Information System, 2016), some donkeys are no longer existent and others are in real danger of extinction. Among these, we highlight the Miranda breed in Portugal (Quaresma,

2015), the Catalan breed in Spain (Jordana, 2006), the Amiata breed in Italy (Cecchi et al., 2006), the Baroque breed in Austria (Méndez et al., 2003) and the Istarski breed in Croatia (Kugler et al., 2008). In Africa, the cradle of donkey lineages that live in all parts of the world, there are practically no more wild breed individuals (Zewdie et al., 2015), and in Brazil, the Northeastern breed's population is exponentially reduced each year (Salles et al., 2013; IBGE, 2016; FAO, 2016). The imminent risk of extinction of several donkey breeds highlights the need to study the reproductive physiology of the species, allowing the application of appropriate reproductive management programs.

In relation to their reproduction, the equids present some peculiarities in relation to the other mammalian species. Their ovary is peculiar and, unlike ovaries of other mammals, the cortical region in which the follicles and oocytes are found is located in the central part of the organ, while its connective tissue and vessels are found in its outer layer. Consequently, ovulation is limited to a specific region, called the ovulation fossa (Walt et al., 1979). In donkeys, details on the quantitative and morphological characteristics of the population of ovarian follicles are unknown. This information is important for the consolidation of assisted reproductive techniques (ARTs) that support greater knowledge of the species as well as favor strategies of assisted reproduction. In mares, for example, this knowledge allowed the reproduction between animals of great commercial and genetic value to be preferentially carried out with support of ARTs (Flores et al., 2012; Severo, 2015), revealing details such as the need for hyperactivation of spermatozoa as a success factor in *in vitro* fertilization (McPartlin et al., 2009) and allowing applications of complex techniques, such as *in vitro* fertilization of mature ovarian follicles *in vitro* (Zhang et al., 1990).

In equidae, the number of oocytes available for biotechniques is very small because of the characteristics of the animals, because they are uniparous and few follicles reach maturity. Another limiting factor for the research is the limited number of slaughters (Gomes and Seneda, 2015) and the low yield of superovulation techniques (Logan et al., 2007). However, preantral follicles, which reach tens of thousands in many species, including equines and make up the majority of the follicular population (Telfer, 1996), can supply this demand. Since the preantral follicles are available in large numbers, their use would be advantageous for the preservation of genomic material and the development of new individuals from these oocytes (Leonel et al., 2015). Knowing the distribution pattern of the germinative reserve included in the preantral follicles of the donkeys would allow the formation of germplasm banks and subsequent multiplication of animals.

The scientific literature on the reproduction of donkeys is scarce, but some physiological aspects have already been identified, such as sexual behavior (Henry et al., 2009) and characteristics of the estrous cycles and gestation (Pugh, 2002). To our knowledge, details about the population of preantral follicles of the female donkey, especially of the Northeastern Brazilian breed, have never been described. Therefore, the objective of this study was to present the estimation and characterization of the population of preantral follicles of the donkeys of the Northeastern Brazilian breed, and to establish relationships between these characteristics and the weight and age of the animals.

2 Materials and Methods

The experiment was conducted at the Animal Germplasm Conservation Laboratory of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido (LCGA-UFERSA), Mossoró

Campus, in the State of Rio Grande do Norte, Brazil (5°12'10.2"S 37°10'39.1"W). All experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of UFERSA (Opinion CEUA/UFERSA No. 08/2014).

2.1 Animals

The experiment used female donkeys from the federal highway stray animal capture by the Federal Highway Police of Brazil in the federal highways that cross the city of Mossoró/RN (05° 11' 15" S, 37° 20' 39" W), in the northeastern region of Brazil, characterized by a semi-arid climate with a high water deficit, concentrated precipitation in a few months of the year, and an average annual temperature above 27°C (Marengo, 2010). None of them presented signs or behaviors that could be perceived as estrus or gestation, as evidenced by ultrasonographic examination. These animals were quarantined at the facilities of the Laboratory of Internal Veterinary Medicine (LMVI-UFERSA), receiving food and water *ad libitum*. Female donkeys had a mean age of 5.1 ± 3.2 years (minimum of 1.6 and maximum of 10 years), estimated by the dental formula of the equines (Silva et al., 2003; Dias, 2013) and a mean weight of 105.2 ± 18.6 kg (minimum of 75 and maximum of 130 kg).

2.2 Material collection and processing

After a 12-hour fast, the females were submitted to a bilateral ovariectomy procedure by videolaparoscopy (Walmsley, 1999; Ragle, 2012). As such, ten pairs of ovaries ($n = 10$) were obtained, identified as left or right from each animal and transported from the

surgical center to the laboratory in minimum essential medium at room temperature within 30 minutes. In the laboratory, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10s, measured with a universal analog caliper (150 mm, 530 Series, Mitutoyo Corp., Mitutoyo, Japan), and weighed on a digital analytical scale (FA2104n, Bioprecisa, Curitiba, PR, Brazil). The gonadosomatic index (GSI) was calculated based on the equation $GSI = \text{ovarian weight} / \text{animal weight} \times 100$ (Kenagy and Trombulak, 1986; Lanna, 2009). Subsequently, the ovaries were fractioned in approximately equal fragments, totaling from 6 to 12 fragments per ovary, according to the volume of the organ, each with about 7mm in diameter. Then the fractions were fixed in Carnoy for 18 hours and stored in 70% alcohol until histological processing. To do so, the fragments were dehydrated in increasing concentrations of alcohol (85%, 95% and absolute) at regular intervals of 1h, clarified using xylol for 3 hours and finally included in histological paraffin blocks at 76°C. The blocks were cut in sections of 7µm (Alves et al., 2015) with the aid of a microtome (Leica RM2125RT, Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA) and the slides were assembled in intervals of 120 sections, according to the protocol described by (Cahill et al., 1979; Carrijo Jr. et al., 2009). The slides were stained with hematoxylin-eosin and analyzed.

2.3 Morphological evaluation of preantral follicles

The slides were evaluated under a light microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan), with 40x enlargement, by which the follicles and other structures of the ovary were observed. For registration and subsequent consultation, all areas of the fragment that had structures of interest were photographed by a high-resolution camera (11,9 MegaPixels) coupled to the objective of the light microscope.

The preantral follicles (PAF) were identified and classified as primordial (oocyte surrounded by a single layer of pavement pre-granulosa cells); primary follicles (oocyte surrounded by a single layer of cubic-shaped granulosa cells) and secondary follicles (oocyte surrounded by two or more layers of cubic-shaped granulosa cells) (Silva et al., 2004).

The PAF were further classified according to their morphological integrity as normal or degenerate, according to Silva et al. (2004). The follicles were classified as normal when they contained a regular-shaped oocyte and uniform cytoplasm as well as organized granulosa cells. No follicles with discontinuity of the granulosa cell layer or disorganized granulosa cells, pyknotic nucleus and foreign bodies within the follicle (Santos et al., 2006) were considered intact.

The follicular dimensions (oocyte nucleus diameter, oocyte diameter and follicle diameter) were obtained based on the photographs analyzed using ImageJ software (National Institute of Health, USA) (Schneider et al., 2012). The thickness of the granulosa cell layer was calculated by the difference between the diameters of the follicle and the oocyte (Domingues et al., 2004), divided by 2 (since the granulosa cell layer is distributed around the oocyte, it is cut twice by the transverse lines of the follicle diameter measurement).

2.4 Estimation of the population of preantral follicles

In order to evaluate the follicular population, the preantral follicles (PAF) were counted for each of the preantral laminae. Primordial, primary and secondary classification were performed, and the diameter of the nuclei of these follicles was also measured. This equation $PF = (nFo \cdot nS \cdot xC)/(nSo \cdot dO)$ was used to calculate the follicular population

(Driancourt et al., 1982), where the estimated population of preantral follicles (FP) is obtained by the ratio between the product and the number of follicles observed in the slide readings (nFo), the total number of sections in which the Fragment was cut (nS) and the thickness of the cuts ($\times C$), divided by the product of the number of slides that were read (nSo) and the mean diameter of the oocyte nucleus (dO).

2.5 Statistical Analysis

Data were expressed as the mean and standard deviation. All quantitative data were collected and organized into tables using Microsoft Excel software and analyzed statistically using SAS software (SAS University Edition, SAS Institute, Cary, NC, USA). Pearson's correlation coefficient (r) was calculated to verify the existence of correlations between the age and weight of the animals, and ovarian morphometry and follicular population. The positive r values were considered directly proportional and negative r values were considered inversely proportional (Figueiredo Filho and Silva Junior, 2010; Hauke and Kossowski, 2011), and values in the confidence margin greater than 5% ($P < 0.05$) were adopted as significant.

The comparisons of the follicular population among the follicular classes, as well as the comparisons between the follicular, oocyte and nuclear diameters among the follicular categories were made through one way ANOVA, and the Student's t test. The results were expressed as mean and standard error. The values were considered statistically significant when $P < 0.05$

3. Results

Despite the difference in mass and size between some ovaries, macroscopic anatomical alterations that indicated diseases were not observed. Most ovaries (70%) presented a kidney shape (Figure 1A), however, about 30% of the ovaries presented a discoid shape (Figure 1B) in which it was possible to visualize a laterally expanded structure with the concavity facing downwards.

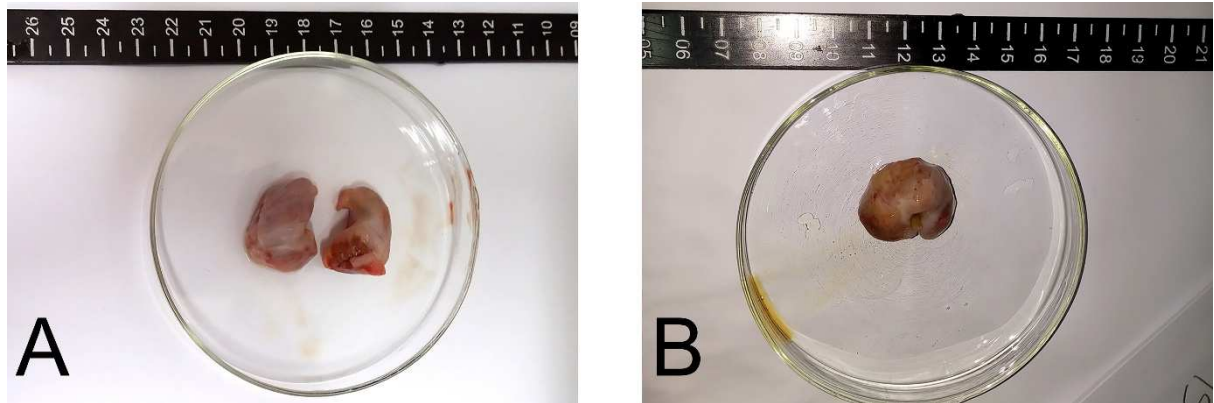


Figure 01 - A) Ovary of jennies of the Northeastern Brazilian breed with reniform shape; B) Ovary of jennies of the Northeastern Brazilian breed with a discoid format;

The mean weight of the ovaries analyzed was 11.3 ± 10.7 g and the mean length was 32.3 ± 8 mm. These data are detailed in table 01. The Pearson's correlation test revealed no statistically significant relationship between the body mass of the animals and the weight of the ovaries ($r = 0.15$ and $r = 0.14$, respectively, for the left and right ovary). Under the same test, ovarian weight was directly proportional to the female's age with a low but statistically significant correlation ($r = 0.30$ for the left ovary and $r = 0.37$ for the right).

Table 1 - Estimated age (EA - years), Weight (kg), morphometry of ovaries (Length x Mean Width [LxW - mm] and Weight of ovary [Wo-grams]) and gonadosomatic index (GSI; %) of Northeast Brazilian donkeys.

Animal	Left Ovary				Right Ovary		GSI
	EA	Weight	Wo	L x W	Wo	L x W	
A1	2.5	112.0	4.0	26.0 x 9.9	4.0	26.0 x 11.6	0.007
A2	10.0	75.0	21.4	45.8 x 31.2	22.6	38.4 x 25.7	0.059
A3	1.6	80.0	9.8	31.0 x 20.5	6.3	31.0 x 13.5	0.020
A4	2.0	100.0	11.5	35.8 x 20.1	10.5	35.4 x 16.9	0.022
A5	9.0	125.0	5.9	31.9 x 16.3	6.7	25.5 x 17.5	0.010
A6	7.0	110.0	7.5	26.3 x 16.6	8.0	28.0 x 18.0	0.014
A7	2.0	110.0	5.0	25.6 x 16.5	3.2	24.3 x 11.3	0.007
A8	8.0	120.0	7.6	31.5 x 15.9	5.9	24.7 x 15.5	0.011
A9	6.0	130.0	40.0	52.5 x 35.6	37.7	49.5 x 29.4	0.060
A10	3.0	90.0	3.7	26.3 x 12.9	4.8	31.7 x 11.4	0.009
Mean ±	5.1 ±	105.2 ±	11.7 ± 11.2	30.0 ± 13.0	11.0 ± 10.9	28.2 ± 11.6 x	0.020
SD	3.2	18.6		x 17.7 ± 9.7		15.2 ± 7.4	± 0.02

Light microscopy revealed absence of follicles or a very small number of follicles in the ovaries of three females, such as in the older female, which had no viable or degenerated preantral follicles. Still, a fourth female (table 01 - A9) presented a very low follicle count (5 times lower than the average). Due to these facts, all the slides of these animals were evaluated, but not included in the statistical process, representing 7 ovaries excluded from the total of 20.

The primordial PAFs (Figure 2A) were identified as an oocyte flanked by a commonly dispersed layer of pavement or pavement-granule cells that are sparse, which are supported by a basement membrane. In this category, follicles containing two oocytes were identified, being characterized as multioocitary follicles (Figure 2B). The primary follicles (Figure 2C) presented a single and organized layer of granulosa cells around the oocyte and the secondary follicles (Figure 2D) have an oocyte surrounded by two or more concentric layers of cuboidal granulosa cells.

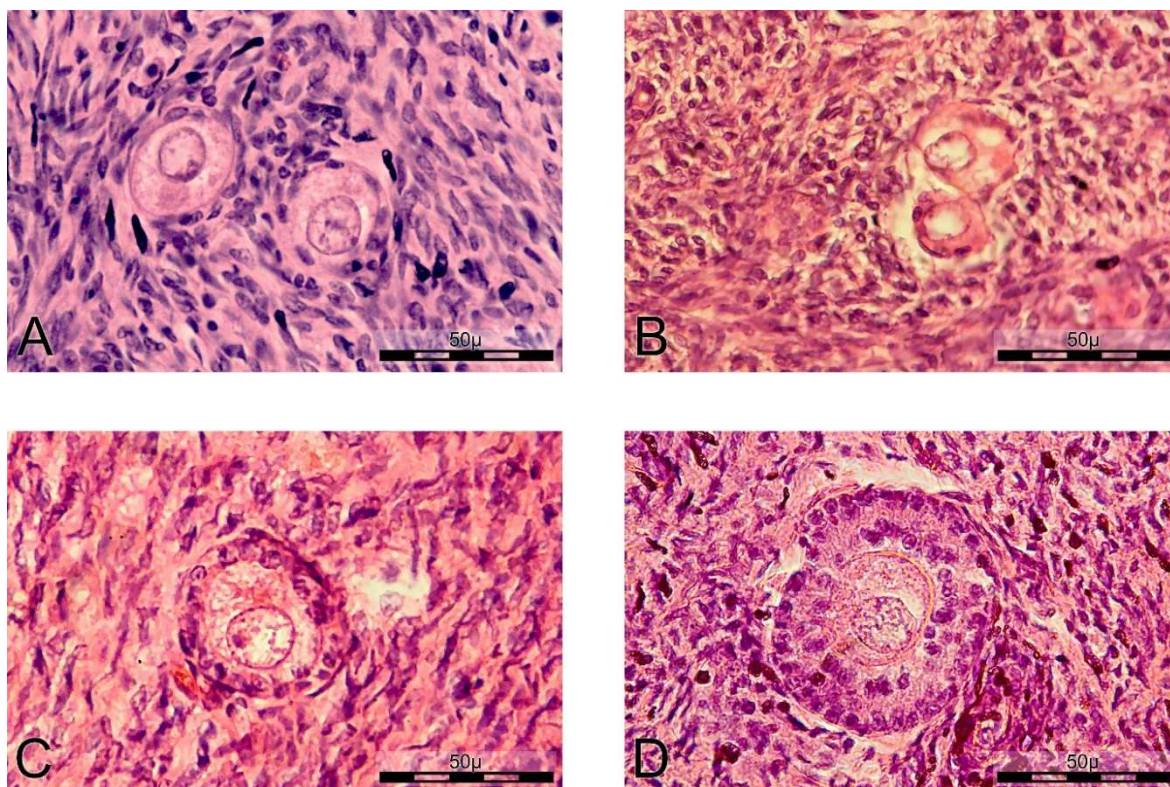


Figure 02 - Preantral follicles and the different thicknesses of the granulosa cell layers: A) primordial follicle; B) Multiocyte primordial follicle; C) primary follicle; D) secondary follicle. Optical microscopy with 40x magnification.

The morphometry of the follicles, oocytes and nuclei, grouped by category, is expressed in Table 02. A statistically significant difference was found between the mean diameters of the nuclei of the secondary follicles and the others ($P < 0.05$). The mean follicle granulosa layer thickness was also measured, ranging from $1.8 \pm 1.4 \mu\text{m}$ for primordial follicles, $3.6 \pm 2.1 \mu\text{m}$ for primary follicles and $21.8 \pm 17.3 \mu\text{m}$ for secondary follicles.

Table 2 - Morphometry (μm) of the oocyte nucleus, oocyte and ovarian follicles by category, as well as the size of the granulosa layer in the follicles of the Northeastern donkeys.

Follicular category		Diameter (μm)			Granulosa layer
		Nucleus	Oocyte	Follicle	
Primordial	Mean $\pm$ SD	16.6 $\pm$ 2.2 ^a	26.9 $\pm$ 5.2 ^a	30.6 $\pm$ 6.0 ^a	1.8 $\pm$ 1.4 ^a
	(Range)	(11.2 - 21.6)	(16.0 - 40.9)	(16.6 - 50.4)	
Primary	Mean $\pm$ SD	16.0 $\pm$ 4.3 ^a	28.1 $\pm$ 6.6 ^a	34.9 $\pm$ 8.3 ^b	3.6 $\pm$ 2.1 ^b
	(Range)	(8.9 - 42.1)	(12.2 - 59.9)	(19.5 - 76.8)	
Secondary	Mean $\pm$ SD	26.8 $\pm$ 16.5 ^b	39.4 $\pm$ 20.6 ^b	70.6 $\pm$ 43.4 ^c	21.8 $\pm$ 17.3 ^c
	(Range)	(12.5 - 76.7)	(16.4 - 93.2)	(27.37 - 171.2)	

^{a,b,c} Values with different subscripts in the same column are significantly different (P < 0.05)

A total follicular population of 21,135.3 $\pm$ 10,646.1 preantral follicles was estimated, with a predominance of primordial follicles (91.3%), as detailed in table 03. There was also no significant difference between the right (54.9%) and left (45.1%) ovaries in the follicle population (P > 0.05). Of the total estimated follicles, 91.2% were classified as normal, and 8.8% were degenerate. The detailing about the morphological integrity of the follicles in each follicular category is expressed in table 04. It should be noted that, among the primordial follicles, the presence of those classified as multioocyte follicles (1.4%) (multioocyte follicle – MOF) (Figure 2D) was identified.

Table 3 - Estimate of the population (Mean $\pm$ Standard Deviation) of preantral follicles in the ovarian pair of Northeastern breed donkeys.

Follicular category	Right ovary	Left ovary	Follicular Population	Percentage of follicles (%)
Primordial	10878.7 $\pm$ 7833.6 ^a	8422.2 $\pm$ 6536.7 ^a	19.300.9 $\pm$ 10821.9 ^a	91.3
Primary	683.4 $\pm$ 1271.0 ^b	1061.8 $\pm$ 989.8 ^b	1.745.3 $\pm$ 1524.9 ^b	8.2
Secondary	52.4 $\pm$ 12.8 ^c	36.5 $\pm$ 43.0 ^c	88.9 $\pm$ 48.0 ^c	0.4
Total	11614.6 $\pm$ 3039.1	9520.6 $\pm$ 2523.2	21.135.3 $\pm$ 10.646.1	100.0

^{a,b,c} Values with different subscripts in the same column are significantly different (P < 0.05)

Table 4 - Morphological integrity of preantral ovarian follicles of Northeastern donkeys, distributed by follicular category and presence of multioocyte follicles (MOF).

	Primordial		Primary		Secondary	
	Abs	%	Abs	%	Abs	%
Normal	17397.8 ± 5757.6 ^a	90.1	1531.6 ± 955.9 ^a	87.7	88.9 ± 48.5 ^a	100.0
Degenerated	1647.0 ± 1407.8 ^b	8.5	213.7 ± 183.8 ^b	12.2	0.0 ± 0.0	0.0
MOF	256.1 ± 192.4 ^c	1.3	0.00 ± 0.00	0.0	0.0 ± 0.0	0.0
Total	19300.9 ± 10821.9	100.0	1745.3 ± 1524.9	100.0	88.9 ± 48.5	100.0

^{a,b,c} Values with different subscripts in the same column are significantly different (P < 0.05)

A strong and significant inverse correlation ($r = -0.66$; $P < 0.001$) was observed between the variables: age of the animals and estimated total number of follicles (Figure 03). According to this, the older the individual, the smaller the population of preantral follicles is. The same correlation was identified for the multioocyte follicles (Age x MOFs), resulting in an inverse and statistically relevant relationship ($r = -0.78$; $P < 0.001$). Detailed results of the correlations between age and weight of the animals and morphometry of the ovaries and number of follicles are shown in table 05.

Table 05 - Correlations between weight and age with morphometry and ovarian follicular population variables in Northeastern Brazilian jennies.

	Age	Weight
Left Ovary Length	0.113	0.049
Right Ovary Length	0.421*	-0.061
Average Ovary Length	0.301*	-0.002
Left Ovary Width	0.364*	-0.073
Right Ovary Width	0.113	0.143
Average Ovary Width	0.481*	0.021
Left Ovary Weight	0.300*	0.159
Rigth Ovary Weight	0.367*	0.146
Average Ovary Weight	0.329*	0.153
Gonasomatic Index	0.402*	-0.158
Estimated Follicular Population	-0.571**	-0.665***
Estimated Normal Follicles	-0.555**	-0.673***
Estimated Degenerated Follicles	-0.564**	-0.501**
Estimated Multioocyte Follicles	-0.781***	-0.847***

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

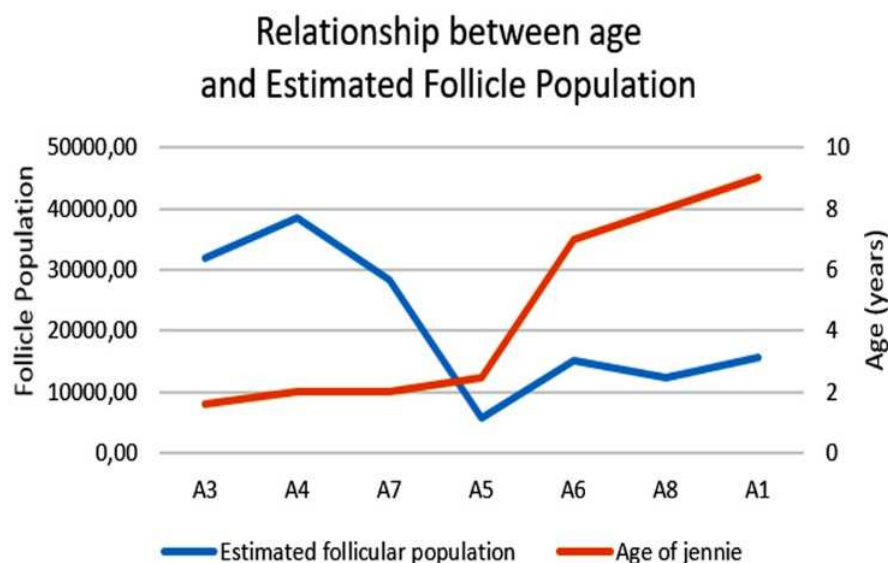


Figure 03 - Correlation between ages and estimated ovarian follicular population of donkeys of the Northeastern Brazilian breed.

4. Discussion

Most of the ovaries collected in this study had a reniform shape (kidney or bean form), with a concave area, clearly defined on its free border (opposite the border where vessels, nerves and ligaments connect), called the ovulation fossa, similar to that observed in mares (Aarde et al., 1988; Kainer, 1993). This format is different from the other mammals, the most common of which are: grape clusters on multiparous, and ovoid or almond, within the uniparous. The presence of antral follicles (Graff follicles), luteal bodies and albicans bodies in the ovarian fossa momentarily alter the shape of the ovary, making it discoid due to the increased volume in this area (Pierson, 1993; McCracken et al., 1999).

The mean length of the jennies' ovaries (32.4 ± 8.4 mm or 3.2 ± 0.8 cm) was similar to that of bovines (between 3.0 and 4.5 cm) (Nascimento et al., 2003), about half the size of ovaries of mares (7.0 to 8.0 cm) (Ley, 2000) and greater than the length of the ovaries

of swine (2.0 to 3.0 cm for animals weighing 90 to 100 kg) (Oberlender et al., 2014). When the mass was evaluated, the mean weight of the ovaries was 11.3 ± 10.8 g, similar to cows (10.0 to 20.0 g), suggesting a similar density, lower than the mean weight of the equine ovaries (40.0 to 80.0g) (Hafez, 2004), and greater than the swine ovaries (3.8 to 4.7g) (Oberlender et al., 2014).

For the first time, GSI (0.020 ± 0.02) was determined in asinine female. This index refers to the ratio of the weight of the gonads to the total weight of the animal. When measured in males, it provides a dimension of the volume of ejaculate, number of covers or aptitude of the male in dealing with the harem, in species where this phenomenon occurs. In females, it allows sizing of the oocyte availability (Lanna et al., 2013) and ovarian maturity (Nath et al., 2016). The GSI is not commonly measured in production or domestic species, but evaluated in wild species such as the Pampas deer (*Mazama americana*) that had the GSI value determined at 0.03 (Meireles et al., 2015) and mice with values found between 0.006 and 0.450 (Lanna, 2009).

The population of preantral follicles of Northeastern Brazilian donkeys, estimated at $21,135 \pm 10,641.1$, presents an equitable distribution between the ovaries. This population is lower than that reported for equines, with a population of approximately 30,700 follicles per ovary for mares and 41,100 follicles per ovary for ponies, both of European breeds, when a methodology similar to that adopted in the present study was used (Driancourt et al., 1982). The distribution pattern of preantral follicles in the different primordial, primary and secondary categories was similar to that observed in the other domestic species, with the highest number of follicles observed in the primordial category, followed by the primary and secondary follicular categories (Lucci et al., 1999; Carrijo Jr. et al., 2009; Silva-Santos et al., 2011; Praxedes et al., 2015). Considering the categories, the number of primordial follicles

for donkeys was also smaller when compared to large mares (30,400 primordial follicles) and ponies (40,800 primordial follicles) (Driancourt et al., 1982). Despite the phylogenetic proximity between donkeys, equines and ponies, it is known that the follicular population can vary widely from species to species and even between the races of the same species; in addition, it can be influenced by hormonal concentrations and age (Burns et al., 2005), and the influence of the latter was markedly shown in the present study in donkeys.

In monovulatory species, the development of follicles is commonly described in three phases. In the first phase, a large volume of primordial follicles is activated (Ginther et al., 1997), signaled by the proliferation of granulosa cells around the oocyte and enlargement of the oocyte, reaching the primary and later the secondary follicle stage (Hafez, 2004). Several oocytes participate simultaneously in the early stages of folliculogenesis, but most enter into atresia during the process (Mihm and Evans, 2008). Thereafter, there are two other phases: follicular recruitment, where follicles pass from secondary to antral, and selection, where one or a few follicles are selected and which will evolve and later be available for fertilization (Driancourt, 2001). In all donkeys in this study, the findings always indicated a decreasing number of preantral follicles by follicular category, compatible with this physiological process initiated with the recruitment of the reserve of primordial follicles.

During folliculogenesis, the follicular morphology is altered, as the oocyte grows and the surrounding cells multiply and differentiate (Bristol-Gould and Woodruff, 2006), giving rise to different follicular types. In fact, in the present study, a progressive increase in the mean diameter of the preantral follicles of the Northeastern donkeys (primordial: 30.6 μm ; primary 34.9 μm and secondary 70.6 μm) and of the granulosa layer thickness of the follicles (primordial: 1.8 μm ; primary 3.6 μm , and secondary 21.8 μm) was observed, compatible with the progression of follicular development (Figueiredo et al., 1993). With

the continuous development of the structures of the preantral follicle during folliculogenesis (van den Hurk and Zhao, 2005), the oocyte and its nucleus are naturally expected to follow the same trend, also observed in this study (primordial: $16.6 \pm 2.2 \mu\text{m}$; $16.0 \pm 4.3 \mu\text{m}$, and secondary $26.8 \pm 16.5 \mu\text{m}$). A study using methods of preantral follicle isolation in mares using filters of 50 to 300 μm identified follicles between 90 and 150 μm without, however, classifying them as primordial, primary or secondary (Telfer and Watson, 2000), which allows for evaluating that, based on data from this study, the preantral follicles of mares are larger than those of donkeys.

In 76% of the donkey ovaries, among the primordial follicles, multioocyte follicles containing two oocytes were identified. The presence of this follicular type has been documented in several species of mammals, such as in sheep (87.5% (Oliveira et al., 2017), in cows (41% (Silva-Santos et al., 2011), in bitches (40.7% (Payan-Carreira and Pires, 2008) and in sows (6.4% - (Stankiewicz et al., 2009)). Generally, follicles with this characteristic are usually excluded from FP studies (Westergaard et al., 2007). The presence of primordial follicles with more than one oocyte, a result of the development of granulosa cells around more than one oocyte (Tingen et al., 2009), is usually evidence of poor follicle formation due to hormonal imbalance (Kipp et al., 2007), presence or not of proteins (Su et al., 2013) or merely a probabilistic result, before a large number of follicles being formed simultaneously (Telfer and Gosden, 1987).

Granulosa cells involve oocytes and have an important endocrine role in follicular development, releasing various substances such as proteoglycans, glycosaminoglycans, hyaluronic acid and chondroitin sulfate (Clarke et al., 2006). The increase of the granulosa cell contact with the oocyte marks the beginning of the production of some of these substances, in addition to initiate the support of these extra-follicular substances that

culminate with the formation and filling of the antrum (Lima et al., 2016). Thus, the study of granulosa cell volume may lead to an understanding of the complex phases of follicular maturation and, in this sense, the ovarian follicles have been routinely classified based on the appearance, distribution, arrangement, and number of their granulosa cells (Lundy et al., 1999). Most studies value granulosa cells in two ways: by counting the number of cells in a cross-section (Almeida et al., 2012; Alves et al., 2015) or by measuring the thickness of the layer of cells that surround the oocyte (Domingues et al., 2004). In the present study, we opted for the second alternative, through which values compatible with follicular development were identified, showing differences between the primordial and primary follicles, which would be compatible with the organization of the first layer of granulosa cells that go from a pavement format to a cuboid. In addition, a marked growth of the granulosa layer was seen from the primary to the secondary follicles, demonstrating the proliferation of granulosa cells that starts from a single layer to several layers, before the antrum begins to form (Hatzirodos et al., 2014).

In this study, it was identified that the age of the donkeys presents a significant but low influence on the weight of the ovaries, evidencing that as the animal becomes older, there is a slight increase in ovarian weight ($r = 0.30$ and $P < 0.05$ for the left ovary and $r = 0.37$ and $P < 0.05$ for the right ovary). Age also had an impact on ovarian morphometry, particularly on the mean length ($r = 0.301$, $P < 0.05$) and the mean width ($r = 0.480$, $P < 0.05$) of the ovaries. In addition, it was also evidenced that age negatively influences the follicular population in donkeys ($r = -0.57$, $P < 0.01$). Moreover, the older female donkeys (10 and 9 years old) were excluded from the estimation of the follicular population because they did not present any ovarian follicles. In addition, similar to bitches (Telfer and Gosden, 1987; Payan-Carreira and Pires, 2008), there was a significant reduction in the occurrence of MOFs

with the advancement of donkey age ($r = -0.78$; $P < 0.001$). In fact, it is known that, during the reproductive life of mammalian females, with advancing age, the phenomenon of reproductive senescence, which corresponds to a decrease in the number of ovarian follicles, culminates in the depletion of the follicular reserve pool (Zuckerman, 1951; Picton, 2001). These results point to age as a criterion for the selection of donkey females to perform biotechniques involving preantral follicles, the preference being for younger females.

Another interesting fact observed in the present study was that nutritional status also influenced the number of follicles observed in donkeys, both in animals with low weight and in overweight animals. The heaviest animal in the group (animal 9: 130kg-23.8% above mean) had a reduced preantral follicle population count (5 times less than the mean), consistent with the correlation found in this study between the weight and the estimated population of preantral follicles ($r = -0.66$, $P < 0.001$). In contrast, animals weighing below the group average (animal 2: 75 kg-29% below average and animal 10: 90 kg-15% below average) had no viable preantral follicles on any of the analyzed slides, possibly impacted by a negative influence of malnutrition. Indeed, several studies report that the nutritional status and the weight of the animal, both at the upper and lower extremities, affect folliculogenesis by altering the number of follicles that reach advanced stages of maturity (Lashen et al., 1999; Chan et al., 2015; Day, 2015). Drastic reductions in the amount of food (Nolan et al., 1998), obesity (Nteeba et al., 2014) and other food imbalances (Boland et al., 2001) affect the entire reproductive cycle of several species of mammals, especially folliculogenesis.

Apparently, this is the first quantitative record of the ovarian follicles of female donkeys of the Brazilian Northeastern breed. In the case of species in population decline or risk of extinction, as is the case of Northeastern and other breeds of donkeys, a greater

success rate in terms of the development of conservation strategies is reached when the reproductive physiology of the species is well known. When establishing the estimate of the follicular population of the Northeastern breed, *in vitro* studies of gamete and maturation banks of oocytes may be initiated starting from a known number of available oocytes, making it easier to estimate the resources needed to perform the techniques. In addition, the information generated in this study allows us to size stocks of oocytes *in vivo* since a relationship between the populations and the ages and weights of the females of the breed was established. The latter data serves as a guide for future studies to recommend the use of younger females and with good body score, because they present larger estimated populations. In addition, this experience with Northeastern Brazilian donkeys may serve as a basis for similar studies with other donkey breeds at risk, or even in breeds without risk, but with great economic potential, such as the Pêga breed in Brazil. By establishing the minimum knowledge about the population of preantral follicles, necessary for the development of biotechniques that allow the maintenance of genetic diversity and facilitate reproduction, it will be possible to save breeds or establish new levels of rational and ethical exploration of donkey breeds.

This study described, for the first time, the morphometric characteristics and the population of the preantral follicles of donkeys (*Equus Asinus*) of the Northeastern Brazilian breed. It can be concluded that the ovarian follicular population decreases as the animal grows older, and it is negatively impacted by nutritional problems, since both animals with very low and very high body scores have lower follicular populations.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgments

CNPq (National Research Council, Brazil) supported this research (Process N^o 407302/2013-1). Professor Alexandre R. Silva was supported by grants from CNPq.

References

- Aarde, L.M.W., Aarde, R.J. van, Skinner, J.D., 1988. Reproduction in female Hartmann's zebra, *Equus zebra hartmannae*. *J. Reprod. Fertil.* 84, 505–511.
doi:10.1530/jrf.0.0840505
- Almeida, D.V., Santos, R.R., Scalercio, S.R., Leão, D.L., Haritova, A., Oskam, I.C., Domingues, S.F.S., 2012. Morphological and morphometrical characterization, and estimation of population of preantral ovarian follicles from senile common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Anim. Reprod. Sci.* 134, 210–215.
doi:10.1016/j.anireprosci.2012.08.028
- Alves, K.A., Alves, B.G., Rocha, C.D., Visonná, M., Mohallem, R.F.F., Gastal, M.O., Jacomini, J.O., Beletti, M.E., Figueiredo, J.R., Gambarini, M.L., Gastal, E.L., 2015. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. *Theriogenology* 83, 1048–1055.
doi:10.1016/j.theriogenology.2014.12.004

- Boland, M.P., Lonergan, P., O'Callaghan, D., 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55, 1323–1340. doi:10.1016/S0093-691X(01)00485-X
- Bristol-Gould, S., Woodruff, T.K., 2006. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 66, 5–13. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.019
- Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54–62. doi:10.1095/biolreprod.104.036277
- Cahill, L.P., Mariana, J.C., Mauléon, P., 1979. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fertil.* 55, 27–36.
- Carrijo Jr., O.A., Marinho, A.P.S., Campos, A.A., Amorim, C.A., Bão, S.N., Lucci, C.M., 2009. Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. *Cells Tissues Organs* 191, 152–160. doi:10.1159/000225935
- Cecchi, F., Ciampolini, R., Ciani, E., Matteoli, B., Mazzanti, E., Tancredi, M., Presciuttini, S., 2006. Demographic genetics of the endangered Amiata donkey breed. *Ital. J. Anim. Sci.* 5, 387–391. doi:10.4081/ijas.2006.387
- Chan, K.A., Tsoulis, M.W., Sloboda, D.M., 2015. Early-life nutritional effects on the female reproductive system. *J. Endocrinol.* 224, R45–R62. doi:10.1530/JOE-14-0469
- Clarke, H.G., Hope, S.A., Byers, S., Rodgers, R.J., 2006. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction* 132, 119–131. doi:10.1530/rep.1.00960

- Day, M.L., 2015. Nutritional Effects on Beef Heifer Development, Puberty and Subsequent Reproduction, in: 2015 Florida Ruminant Nutrition Symposium. p. 69.
- Dias, A.M.S.S., 2013. Medicina dentária em equinos de desporto (masterThesis). Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.
- Domestic Animal Diversity Information System, F., 2016. DAD-IS - Domestic Animal Diversity Information System [WWW Document]. URL <http://dad.fao.org/> (accessed 11.2.16).
- Domingues, S.F.S., Diniz, L.V., Furtado, S.H.C., Ohashi, O.M., Rondina, D., Silva, L.D.M., 2004. Histological study of capuchin monkey (*Cebus apella*) ovarian follicles. *Acta Amaz.* 34, 495–501. doi:10.1590/S0044-59672004000300015
- Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211–1239. doi:10.1016/S0093-691X(01)00479-4
- Driancourt, M.A., Paris, A., Colette, R., Mariana, J.C., Palmer, E., 1982. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reprod. Nutr. Dev.* 22, 1035–1047.
- FAO, F. and A.O. of the U.N., 2016. FAOSTAT [WWW Document]. FAOSTAT - Live Anim. URL <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QA> (accessed 2.20.17).
- Figueiredo, J.R., Hulshof, S.C., Van den Hurk, R., Ectors, F.J., Fontes, R.S., Nusgens, B., Bevers, M.M., Beckers, J.F., 1993. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology* 40, 789–799.
- Figueiredo Filho, D.B., Silva Junior, J.A., 2010. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). *Rev. Política Hoje* - ISSN 0104-7094 18.

- Flores, L.T., Souza, T.R.D., Filipini, V.T., Schwengber, E.B., Neves, A.P., 2012. Modelagem Do Custo De Uso De Inseminação Artificial E Monta A Campo Em Equinos. An. Salão Int. Ensino Pesqui. E Ext. 4.
- Food and Agriculture Organization, U.N., 2016. FAOSTAT [WWW Document]. URL <http://faostat.fao.org/beta/en/#compare> (accessed 11.2.16).
- Ginther, O.J., Kot, K., Kulick, L.J., Wiltbank, M.C., 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48, 75–87. doi:10.1016/S0093-691X(97)00192-1
- Gomes, R.G., Seneda, M.M., 2015. Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 37, 318–322.
- Gougeon, A., Chainy, G.B.N., 1987. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J. Reprod. Fertil.* 81, 433–442. doi:10.1530/jrf.0.0810433
- Hafez, E.S.E., 2004. Reprodução animal, 7th ed. Manole.
- Hatzirodos, N., Irving-Rodgers, H.F., Hummitzsch, K., Harland, M.L., Morris, S.E., Rodgers, R.J., 2014. Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during growth from small to large antral sizes. *BMC Genomics* 15, 24. doi:10.1186/1471-2164-15-24
- Hauke, J., Kossowski, T., 2011. COMPARISON OF VALUES OF PEARSON’S AND SPEARMAN’S CORRELATION COEFFICIENTS ON THE SAME SETS OF DATA. *Quaest. Geogr.* 30, 87–93.
- Henry, M., Lago, L.A., Mendonça, L.F., 2009. Asininos: animais com características sociais e reprodutivas próprias. *Rev Bras Reprod Anim* 33, 223–230.

- IBGE, I.B. de G. e E., 2016. IBGE | Séries Estatísticas & Séries Históricas [WWW Document]. Efetivo Animais Nos Estabel. URL <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&vcodigo=AGRO120&t=efetivo-animais-estabelecimentos> (accessed 2.20.17).
- Jordana, J., 2006. Dificultats per a la conservació de l'ase català. UAB Divulga 0001–0002.
- Kainer, R.A., 1993. Reproductive organs of the mare. *Equine Reprod.* 5–19.
- Kenagy, G.J., Trombulak, S.C., 1986. Size and Function of Mammalian Testes in Relation to Body Size. *J. Mammal.* 67, 1–22. doi:10.2307/1380997
- Kipp, J.L., Kilen, S.M., Bristol-Gould, S., Woodruff, T.K., Mayo, K.E., 2007. Neonatal Exposure to Estrogens Suppresses Activin Expression and Signaling in the Mouse Ovary. *Endocrinology* 148, 1968–1976. doi:10.1210/en.2006-1083
- Kugler, W., Grunenfelder, H.-P., Broxham, E., 2008. Donkey breeds in Europe. St Gallen Switz. *Monit. Inst. Rare Breeds Seeds Eur.*
- Lanna, L.L., Marques-Júnior, A.P., Oliveira, J.N., Santos, T.M., Soares, F.A., 2013. Índice gonadosomático e correlações entre dimensões e peso testiculares na codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) aos 60 dias de idade. *Arq Bras Med Vet Zootec* 65, 955–960.
- Lanna, M.F., 2009. Estudo morfométrico do desenvolvimento folicular ovariano de camundongas albino suíço. *Morphometric study of the ovarian follicular development in swiss albino mice.*
- Lashen, H., Ledger, W., Bernal, A.L., Barlow, D., 1999. Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 14, 712–715. doi:10.1093/humrep/14.3.712

- Leonel, E., Bento-Silva, V., Costa e Silva, E., Zúccari, C., 2015. Follicle populations in mare ovaries: from preantral to preovulatory follicles. *Enciclopédia Biosf.* 11, 1321–1333. doi:http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_162
- Ley, W.B., 2000. Reprodução em éguas para veterinários de eqüinos. Editora Roca.
- Lima, L.F., Bruno, J.B., Silva, A.M.S. da, Duarte, A.B.G., Figueiredo, J.R. de, Rodrigues, A.P.R., 2016. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. *Reprodução Clim.* 31, 93–104. doi:[10.1016/j.recli.2015.12.005](https://doi.org/10.1016/j.recli.2015.12.005)
- Logan, N.L., McCue, P.M., Alonso, M.A., Squires, E.L., 2007. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 48–55. doi:[10.1016/j.anireprosci.2006.09.027](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.027)
- Lucci, C.M., Amorim, C.A., Rodrigues, A.P., Figueiredo, J.R., Báó, S.N., Silva, J.R., Gonçalves, P.B., 1999. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim. Reprod. Sci.* 56, 223–236.
- Lundy, T., Smith, P., O’Connell, A., Hudson, N.L., McNatty, K.P., 1999. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil.* 115, 251–262. doi:[10.1530/jrf.0.1150251](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1150251)
- Marengo, J.A., 2010. Vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima no semi-árido do Brasil. *Parcer. Estratégicas* 13, 149–176.
- McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C., 1999. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiol. Rev.* 79, 263–323.

- McPartlin, L.A., Suarez, S.S., Czaya, C.A., Hinrichs, K., Bedford-Guaus, S.J., 2009. Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful In Vitro Fertilization of Equine Oocytes. *Biol. Reprod.* 81, 199–206. doi:10.1095/biolreprod.108.074880
- Meireles, W.A., Costa, F.F., Dias, D.F., 2015. Avaliação morfológica das vísceras de um exemplar de veado mateiro (*Mazama americana*). *Rev. Eletrônica Biol. REB* ISSN 1983-7682 8, 206–215.
- Méndez, A., Atilio, J., Jordana i Vidal, J., 2003. Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores microsatélites.
- Mihm, M., Evans, A., 2008. Mechanisms for Dominant Follicle Selection in Monovulatory Species: A Comparison of Morphological, Endocrine and Intraovarian Events in Cows, Mares and Women. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 48–56. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01142.x
- Nascimento, A.A. do, Pinheiro, N.L., Sales, A., Viana, J.H.M., 2003. Morphometric correlation of the ovary of bovine females on different reproductive stages. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 40, 126–132. doi:10.1590/S1413-95962003000200006
- Nath, P.P., Sarkar, K., Mondal, M., Paul, G., 2016. Metanil yellow impairs the estrous cycle physiology and ovarian folliculogenesis in female rats. *Environ. Toxicol.* 31, 2057–2067. doi:10.1002/tox.22205
- Nolan, R., O’Callaghan, D., Duby, R.T., Lonergan, P., Boland, M.P., 1998. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology* 50, 1263–1274. doi:10.1016/S0093-691X(98)00225-8

- Nteeba, J., Ganesan, S., Keating, A.F., 2014. Progressive Obesity Alters Ovarian Folliculogenesis with Impacts on Pro-Inflammatory and Steroidogenic Signaling in Female Mice. *Biol. Reprod.* 91, 86. doi:10.1095/biolreprod.114.121343
- Oberlender, G., Pontelo, T.P., Miranda, J.R., Miranda, D.R., Zangeronimo, M.G., Silva, A.C., Menezes, T.A., Rocha, L.G.P., 2014. Morphological and morphometric evaluation of prepubertal gilt ovaries, uterine tubes and uterus at different oestrus cycle stages. *Pesqui. Veterinária Bras.* 34, 83–90. doi:10.1590/S0100-736X2014000100014
- Oliveira, R.L., Silva, C.B., Silva, E.O., Gerez, J.R., Santos, M.M., Sarapião, F.D., Sartori, L., Bracarense, A.P.F.R.L., Seneda, M.M., 2017. Proliferative activity of multi-oocyte follicles in sheep ovaries. *Small Rumin. Res.* 146, 58–60. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.12.004
- Payan-Carreira, R., Pires, M.A., 2008. Multioocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. *Theriogenology* 69, 977–982. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.01.013
- Picton, H.M., 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55, 1193–1210.
- Pierson, R.A., 1993. Folliculogenesis and ovulation. *Equine Reprod.* McKinnon AO Voss JL Eds Lea Febiger Phila. 161–172.
- Praxedes, É.C.G., Lima, G.L., Silva, A.M., Apolinário, C.A.C., Bezerra, J.A.B., Souza, A.L.P., Oliveira, M.F., Rodrigues, A.P.R., Silva, A.R., 2015. Characterisation and cryopreservation of the ovarian preantral follicle population from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Reprod. Fertil. Dev.*
- Pugh, D.G., 2002. Donkey reproduction, in: *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* pp. 113–114.

- Quaresma, M.N.P., 2015. The asinina de Miranda donkey breed (*Equus asinus*): demographic analysis and characterization of the reproductive cycles.
- Ragle, C.A., 2012. Bilateral Ovariectomy in the Mare, in: Ragle, C.A. (Ed.), *Advances in Equine Laparoscopy*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 177–187.
- Salles, P.A., Souza, L.O., Gomes, L.P.B., Barbosa, V.V., Medeiros, G.R., Souza, C.M., Weller, M., 2013. Analysis of the population of equidae in semiarid region of Paraíba. *J Biotech Biodiv* 4, 269–275.
- Santos, R.R., Rodrigues, A.P.R., Costa, S.H.F., Silva, J.R.V., Matos, M.H.T., Lucci, C.M., Bão, S.N., van den Hurk, R., Figueiredo, J.R., 2006. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 91, 249–263. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.04.013
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., others, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675.
- Severo, N.C., 2015. História da inseminação artificial no Brasil. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 39, 17–21.
- Silva, J.R.V., van den Hurk, R., Costa, S.H.F., Andrade, E.R., Nunes, A.P.A., Ferreira, F.V.A., Lôbo, R.N.B., Figueiredo, J.R., 2004. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 273–286. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.09.006
- Silva, M.F., Gomes, T., Dias, A.S., Marques, J.A., Jorge, L.M., Faísca, J.C., Pires, G.A., Caldeira, R.M., 2003. Estimativa da idade dos equinos através do exame dentário. *Rev. Port. Ciênc. Veterinárias* 98, 103–110.

- Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Siloto, L.S., Hertel, M.F., Andrade, E.R., Rubin, M.I.B., Sturion, L., Melo-Sterza, F.A., Seneda, M.M., 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology* 76, 1051–1057.
doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.008
- Stankiewicz, T., Błaszczuk, B., Udała, J., 2009. A Study on the Occurrence of Polyovular Follicles in Porcine Ovaries with Particular Reference to Intrafollicular Hormone Concentrations, Quality of Oocytes and their in vitro Fertilization. *Anat. Histol. Embryol.* 38, 233–239. doi:10.1111/j.1439-0264.2009.00929.x
- Su, W., Guan, X., Zhang, D., Sun, M., Yang, L., Yi, F., Hao, F., Feng, X., Ma, T., 2013. Occurrence of multi-oocyte follicles in aquaporin 8-deficient mice. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11, 88. doi:10.1186/1477-7827-11-88
- Telfer, E., Gosden, R.G., 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.* 81, 137–147. doi:10.1530/jrf.0.0810137
- Telfer, E.E., 1996. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology, Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society* 45, 101–110.
doi:10.1016/0093-691X(95)00359-G
- Telfer, E.E., Watson, E.D., 2000. Method for isolating preantral follicles from mare ovaries. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 447–453.
- Tingen, C., Kim, A., Woodruff, T.K., 2009. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 15, 795–803.
doi:10.1093/molehr/gap073

- van den Hurk, R., Zhao, J., 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63, 1717–1751. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.08.005
- Walmsley, J.P., 1999. Review of equine laparoscopy and an analysis of 158 laparoscopies in the horse. *Equine Vet. J.* 31, 456–464.
- Walt, M.L., Stabenfeldt, G.H., Hughes, J.P., Neely, D.P., Bradbury, R., 1979. Development of the equine ovary and ovulation fossa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 471–477.
- Westergaard, C.G., Byskov, A.G., Andersen, C.Y., 2007. Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age. *Hum. Reprod.* 22, 2225–2231. doi:10.1093/humrep/dem135
- Zewdie, B., Welday, K., Pal, S.K., 2015. Conservation of indigenous donkey breeds of ethiopia: a review. *Int. J. Interdiscip. Multidiscip. Stud.* 2, 13–22.
- Zhang, J.J., Muzs, L.Z., Boyle, M.S., 1990. In vitro fertilization of horse follicular oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 361–365. doi:10.1002/mrd.1080260411
- Zuckerman, S., 1951. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog. Horm. Res.* 6, 63–109.

**Vitrification of ovarian tissue of Brazilian Northeastern donkey breed (*Equus asinus*)
using different cryoprotectants**

Vitrification of ovarian tissue of Brazilian Northeastern donkey breed (*Equus asinus*) using different cryoprotectants

KRF Lopes, ECG Praxedes, LB Campos, MB Bezerra, GL Lima, MVA Saraiva, AR Silva
Laboratory of Animal Germplasm Conservation – LCGA, Universidade Federal Rural do Semi-Arido –
UFERSA, Mossoró, RN, Brazil.

Contents

The aim of this study is to assess a vitrification protocol for asinine ovarian tissue, to preserve preantral follicles using different cryoprotectant solutions, composed of various concentrations (EG 3 or 6M) of dimethyl sulfoxide or ethylene glycol isolate, or as a combination (DMSO 3M plus EG 3M). Ten pairs of ovaries Brazilian northeastern breed jennies were obtained through videolaparoscopy and cortical fragments were submitted for solid surface vitrification (SSV) using each cryoprotectant solution. The ovarian tissue was evaluated for follicular morphology and viability, cell apoptosis (TUNEL technique) and the presence of nucleolar organizing regions in granulosa cells (AgNOR technique). After thawing, the percentage of normal preantral follicles was significantly reduced in the vitrified ovarian tissue fragments compared to the fresh control ($P < 0.05$). When comparing treatments, the use of DMSO 3M ($81.7 \pm 37.5\%$), EG 3M ($83.7 \pm 27.4\%$) and the combination of both DMSO 3M plus EG 3M ($81.8 \pm 46.8\%$) allowed a greater percentage of follicular survival in contrast to DMSO 6M ($69.8 \pm 16.5\%$) and EG 6M ($72.3 \pm 18.0\%$) ($P < 0.05$). When vitrified using the DMSO + EG combination, a higher percentage ($62.5 \pm 29.1\%$) of viable follicles (trypan blue) was observed in relation to the other vitrification treatments ($P < 0.05$). The TUNEL technique identified that all treatments tested showed DNA fragmentation in the follicular cells, except in the case of the DMSO 3M plus EG 3M treatment. When evaluating the presence of NORs, no significant differences were observed

in the amount of NORs between the fresh and vitrified groups using DMSO 3M plus EG 3M ($P > 0.05$). Thus, we concluded that the combination DMSO 3M plus EG was more efficient for the vitrification of ovarian tissue taken from *Equus asinus*, allowing adequate preservation of PAFS morphology, viability, DNA integrity and cell proliferative capacity.

Introduction

Asinines have a significant space in human history (Rossel *et al.* 2008), but nowadays they are being abandoned due to the modernization of rural activities. Consequently, several endemic asinine breeds are suffering a drastic reduction of their population, especially in Europe and the Americas (Kugler *et al.* 2008). In Brazil, the population of the Northeastern breed has exponentially lowered each year (IBGE 2016).

In order to safeguard the valuable genetic material of endangered breeds of donkeys, it is crucial to develop germplasm banks to enable the preservation of the main source of female gametes found in the ovaries: the preantral follicles (Santos *et al.* 2007), isolated (Carroll *et al.* 1990) or included in the ovarian cortex (Demirci *et al.* 2001). However, the preservation of ovarian tissue is a cryobiological challenge because it contains many cell types and specific extracellular matrix components (Hovatta 2005). Thus, it is necessary that cryopreservation protocols are successful to guarantee the later use of the reproductive cells and the subsequent production of healthy animals (Santos *et al.* 2007).

Tissue vitrification offers many advantages for cryobiology, but is challenging to achieve in practice, as it requires extremely fast cooling rates and intracellular water replacement by permeating cryoprotectants agents (CPA) at high concentrations (Lornage *et al.* 2006), which may result in significant cytotoxic effects (Santos *et al.* 2010). CPAs have

physical and chemical functions in the tissue, altering freezing conditions, in particular, with the formation of ice crystals (Asgari *et al.* 2015) without intoxicating cells in the process (Mouttham *et al.* 2015). Choosing the right CPAs is essential, which should involve prior evaluation of the benefits of the chosen substance including the permeability of the membranes, CPA concentration, the perfect match of cryoprotectant effect and toxicity, the possibility of combination with other CPAs, among others. Listed on most used CPAs, Ethylene glycol (EG) and dimethylsulfoxide (DMSO) have been tested at various concentrations and applications, from mice (Nakao *et al.* 1997) to humans (Aye *et al.* 2010). Moreover, in equines, a species closely related to donkeys, the combination of DMSO and EG has been effective in showing minimal toxic effects on immature oocytes (Canesin *et al.* 2017).

Therefore, the objective of this study is to compare the effects of different CPAs, in different concentrations or in combination, on the vitrification of asinine ovarian tissue. The present study is designed with the aim of developing a protocol to preserve the female donkey fertility with consideration of the imminent risk of extinction of many breeds of donkey.

Materials and Methods

Animals

All experimental procedures have been approved by the Ethics Committee on Animal Use of UFERSA (Opinion CEUA/UFERSA No. 08/2014). Ten free female donkeys captured on federal highways in Brazil by the Federal Highway Police were used for the experiment. These animals were quarantined in a collective outdoor facility of the University, receiving food and water *ad libitum*.

None of the females presented signs or behaviors that could be perceived as estrus or gestation, as evidenced by ultrasonographic and gynecological examination. Individuals had a mean age of 4.5 ± 3.2 years, estimated by the dental formula of the equines (Dias 2013) and a mean weight of 102.5 ± 11.8 kg.

Material collection and processing

Following a 12-hour fast, the females were submitted to a bilateral ovariectomy procedure by video laparoscopy (Ragle 2012). Pairs of ovaries ($n = 10$) were collected and transported from the surgical center to the laboratory in minimum essential medium (MEM) at room temperature within 30 min, and washed once in 70% alcohol for 10s and twice with phosphate buffer saline (PBS).

Subsequently, the pairs of ovaries were divided into approximately 24 fragments ($3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 1\text{mm}$) destined to the experimental protocol (Figure 1). Two fragments were immediately fixed in Carnoy to evaluate the follicular morphology and proliferation of the granulosa cells; another fragment was fixed in paraformaldehyde for later analysis of nuclear integrity (TUNEL); and another one was subject to the isolation protocol to evaluate the viability of the follicles, constituting the control group. The other fragments were subject to the solid surface vitrification process.

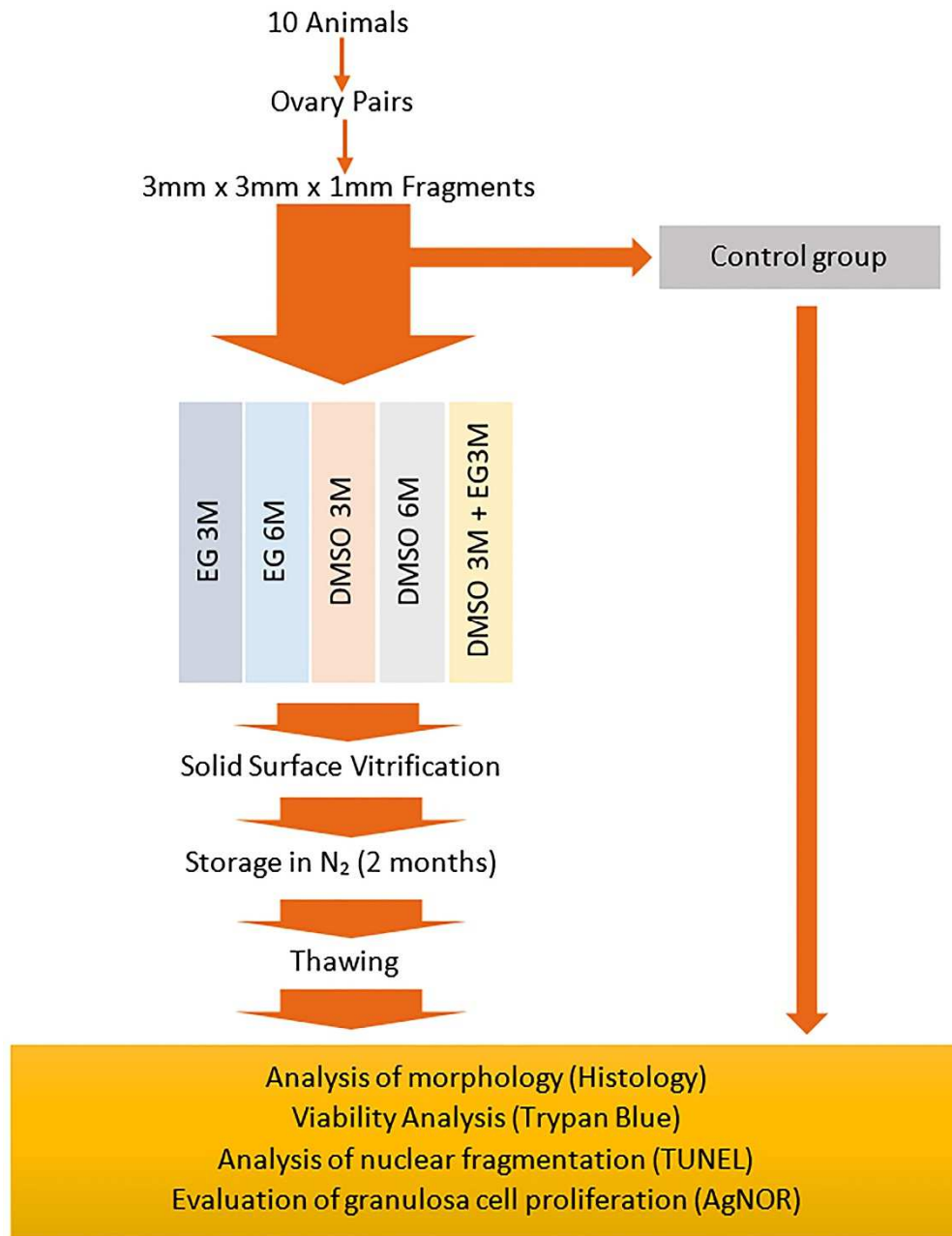


Figure 01 – Experimental design

Solid Surface Vitrification (SSV)

Ovarian tissue cryopreservation was conducted according to a solid surface vitrification procedure described by Carvalho *et al.*, 2013. A vitrification solution composed

of MEM supplemented with sucrose (SAC), 10% fetal bovine serum (FBS) and CPAs was used. As experimental groups, DMSO and EG were tested individually at 3M or 6M concentration, or in combination (DMSO 3M plus EG 3M).

Six ovary fragments per experimental group were exposed to the respective vitrification solution for 5 min. Fragments were then dried on sterile gauze and placed on a solid surface – an aluminum foil – in contact with liquid nitrogen (N₂). After vitrification, the fragments were placed in cryotubes and stored in a cryopreservation storage tank (Carvalho *et al.* 2013) for 1 week. Samples were heated at room temperature (25°C) for 1 min, followed by immersion in a water bath at 37°C for 5s. Cryoprotectants occurred were removed by three consecutive washes in MEM (5min) supplemented with 10% FBS and decreasing concentrations of sucrose (0.50, 0.25 and 0M). Finally, vitrified fragments were subject to the same analysis as conducted on the fresh control group, described as follows.

Morphological analysis

To evaluate the morphology of PAFs, fresh and vitrified fragments were allocated for histological processing and classified as normal or degenerated (Silva *et al.* 2004). These fragments were fixed in Carnoy for 12h and dehydrated in increasing concentrations of alcohol (70%, 85%, 95% and absolute) at regular intervals of 1h, diaphanized using xylol for 3h and finally included in histological paraffin. The blocks were cut into 7µm sections with a microtome (Leica RM2125RT, Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA) and each 5th section was assembled on slides, stained with hematoxylin-eosin and analyzed under light microscopy (400x - Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan).

Viability analysis

Fresh and vitrified ovary fragments were subjected to the mechanical procedure for follicular isolation (Figueiredo *et al.* 1993). The suspension obtained was centrifuged for 10min and in to the precipitate was added of 10 μ L of Trypan Blue (0.4%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at 25°C. After 5min, samples were evaluated under inverted microscopy and PAFs were classified as viable when unstained, and not viable when stained blue.

Detection of cellular apoptosis

For the purpose of this study, the Fluorometric Terminal Deoxyribonucleotide Transferase-mediated dUTP Nick-end Labeling (TUNEL) System kit was used according to the manufacturer's instructions (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Fragments of the control and treatment groups submitted to SSV were fixed in paraformaldehyde for 24h and dehydrated in increasing concentrations of alcohol (70%, 85%, 95% and absolute) at regular intervals of 1h, clarified using xylene for 3h and finally added to histological paraffin blocks at 76°C. The blocks were cut into sections of 5 μ m with a microtome (Leica RM2125RT, Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA) and mounted on poly-L-lysine treated slides (Starfrost, Knittel, Germany).

The slides were immersed in xylene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol, fixed in 4% paraformaldehyde and mixed in phosphate buffered saline (PBS) twice for five minutes. After washing, the samples were immersed in 20 μ g/mL proteinase K (37°C, 10min). The slides were then incubated with a 50 μ L TUNEL kit reaction mixture and incubated at 37°C for 60min in the dark, in a humidified chamber. As the internal positive control, sections were treated with 10units/ml DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in

1mg/ml BSA for 10min before incubation with the TUNEL reaction mixture to induce nonspecific breaks in DNA. The negative control sections consisted of omitting the terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme. The slides were mounted with an aqueous mounting medium for preserving the fluorescence of the tissue with DAPI (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA). Follicles were considered as having fragmented DNA when oocytes were detected with a green-colored nucleus and granulosa cells. Immunostaining was evaluated using a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse 80i, Tokyo, Japan).

Assessment of cell proliferation

We estimate cell proliferation ability only in the fresh control group and in the experimental group that provided the most efficient preservation of ovary follicle morphology and viability with reduced evidence of apoptotic signs. To this, the silver (Ag) nitrate impregnation method was used to quantify the number of nucleolar organizing regions (NOR). To perform the AgNOR technique, ovarian tissue fragments were fixed in Carnoy solution and subject to conventional histological processing. The blocks were then, the blocks were sectioned at 5µm and the sections were immersed in 1% potassium metabisulfite (3min). The slides were impregnated with silver nitrate (2:1 colloidal solution) in a darkroom (30min) and then placed in a solution of sodium metabisulfite (3min) and sodium thiosulphate (3min) to allow impregnation of the silver nitrate. For quantification, the follicles were observed under optical microscopy (x100) and the NORs of all nuclei of the visible granulosa cells were counted according to an adapted protocol from Castro *et al.* 2011. To quantify the NORs, all granulosa cells from all follicles of each of the treatments were identified and counted.

Statistical Analysis

Results were expressed as mean and standard deviation and evaluated using SAS software (SAS University Edition, SAS Institute, Cary, NC, USA). The normality of distribution and homogeneity of variance were evaluated by the Smirnov-Kolmogorov and Bartlett test, respectively. The comparison between experimental groups was performed by one-way ANOVA followed by the Student's t-test. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

A total of 1.080 PAFs were analyzed (~ 180 per group). The morphologically normal PAFs found in fresh or vitrified groups (Figure 2ABC) showed spherical oocyte, with the nuclei occupying most of the cytoplasm and positioned centrally or eccentrically in the oocyte. The granulosa cells were organized around the oocyte, forming concentric layers. After the vitrification process, the main changes observed in all groups consisted of oocyte retraction, detachment of granulosa cells from the basement membrane and pyknotic oocyte nuclei.

After thawing, the percentage of morphologically normal PAFs was significantly reduced ($P < 0.05$) in all experimental groups compared to the control group (Table 1). When comparing treatments, the use of individual DMSO 3M or EG 3M and the combination of DMSO 3M plus EG 3M provided the most efficient preservation of asinine ovary follicles morphology ($P < 0.05$).

Table 01 – Analysis of morphology and viability of asinine preantral ovarian follicles before (control) and after solid surface vitrification (SSV) using dimethyl sulfoxide (DMSO) or ethylene glycol (EG) isolate at different concentrations or in combination (DMSO or EG).

	Normal Morphology (%)	Viability (%)
Control	94.5 ± 5.8 ^a	90.6 ± 5.0 ^a
DMSO 3M	81.7 ± 37.5 ^b	55.4 ± 21.7 ^c
DMSO 6M	69.8 ± 16.5 ^c	49.2 ± 14.2 ^d
EG 3M	83.7 ± 27.4 ^b	52.9 ± 32.4 ^c
EG 6M	72.3 ± 18.0 ^c	57.1 ± 27.9 ^c
DMSO+EG	81.8 ± 46.8 ^b	62.5 ± 29.1 ^b

^{a,b, c,d} Superscript low case letters in the same column indicate significant differences among rows (P <0.05).

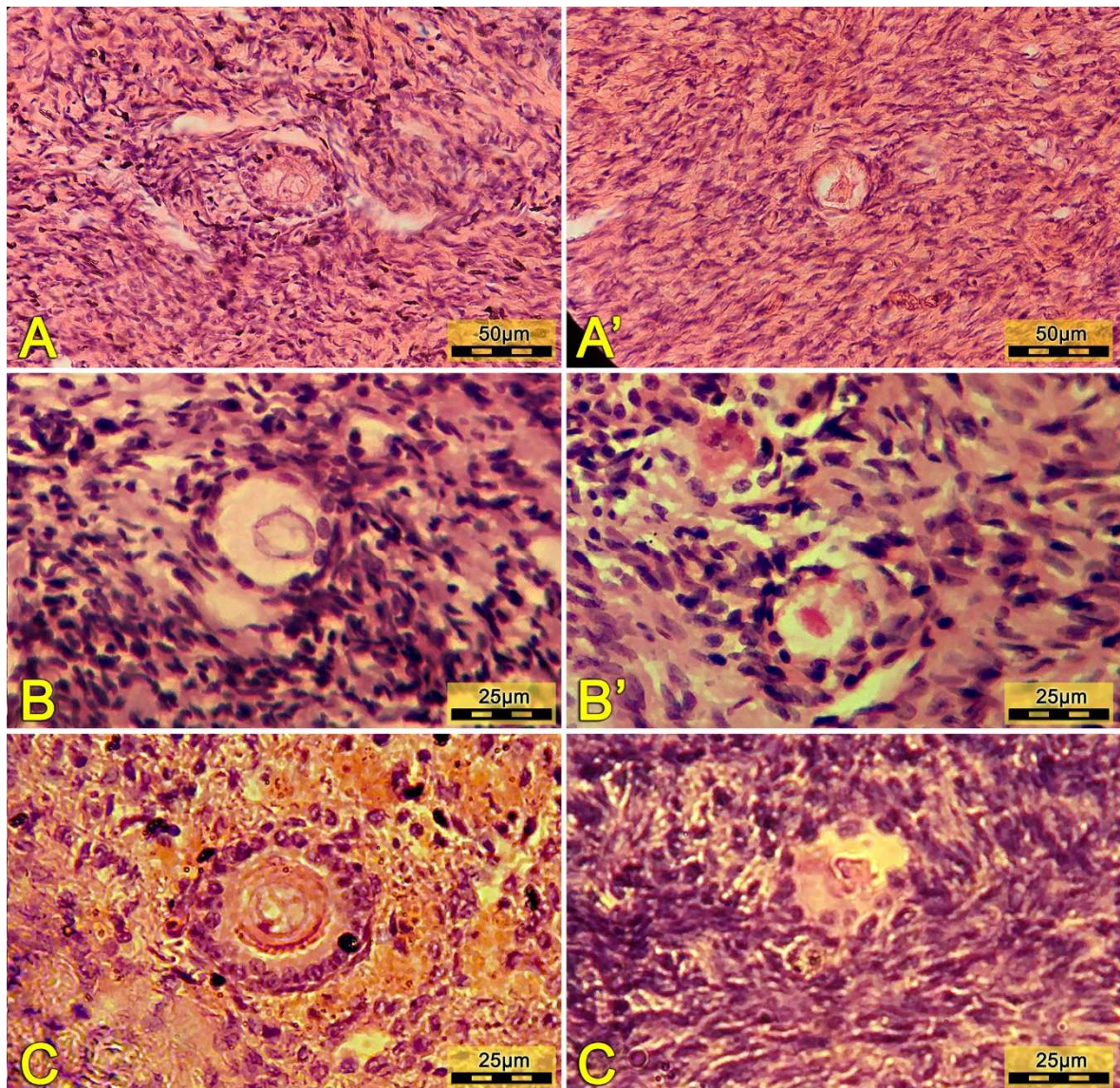


Figure 02 – Morphology of Preantral follicles: Control group (A: normal and A ': degenerate); vitrified groups containing DMSO 3M (B: normal and B ': degenerate) and DMSO 3M plus EG 3M (C: normal and C': degenerate). Scale bar: 50µm (A and A'); 25µm (B,B',C and C').

As demonstrated in Table 1, a higher percentage of viable asinine follicles was observed in the fresh control (90.6 ± 5.0) in comparison to the vitrified groups ($P < 0.05$). The use of the combination of DMSO and EG (62.5 ± 29.1) provided the most efficient preservation of PAFs viability when compared to the other CPAs ($P < 0.05$).

For the analysis of apoptosis by TUNEL, only follicles with visible oocyte nuclei were analyzed. A control for the evaluation kit was established (Figure 3A negative and Figure 3A' positive), as well as the fresh control group (Figure 3B and 3B', negative and positive, respectively). A positive TUNEL reaction is demonstrated for the group containing DMSO 6M, which indicates apoptosis of granulosa cells (Figures 3C and 3C'). A negative TUNEL reaction is shown for the group containing the DMSO 3M + EG 3M combination (Figures 3D and 3D').

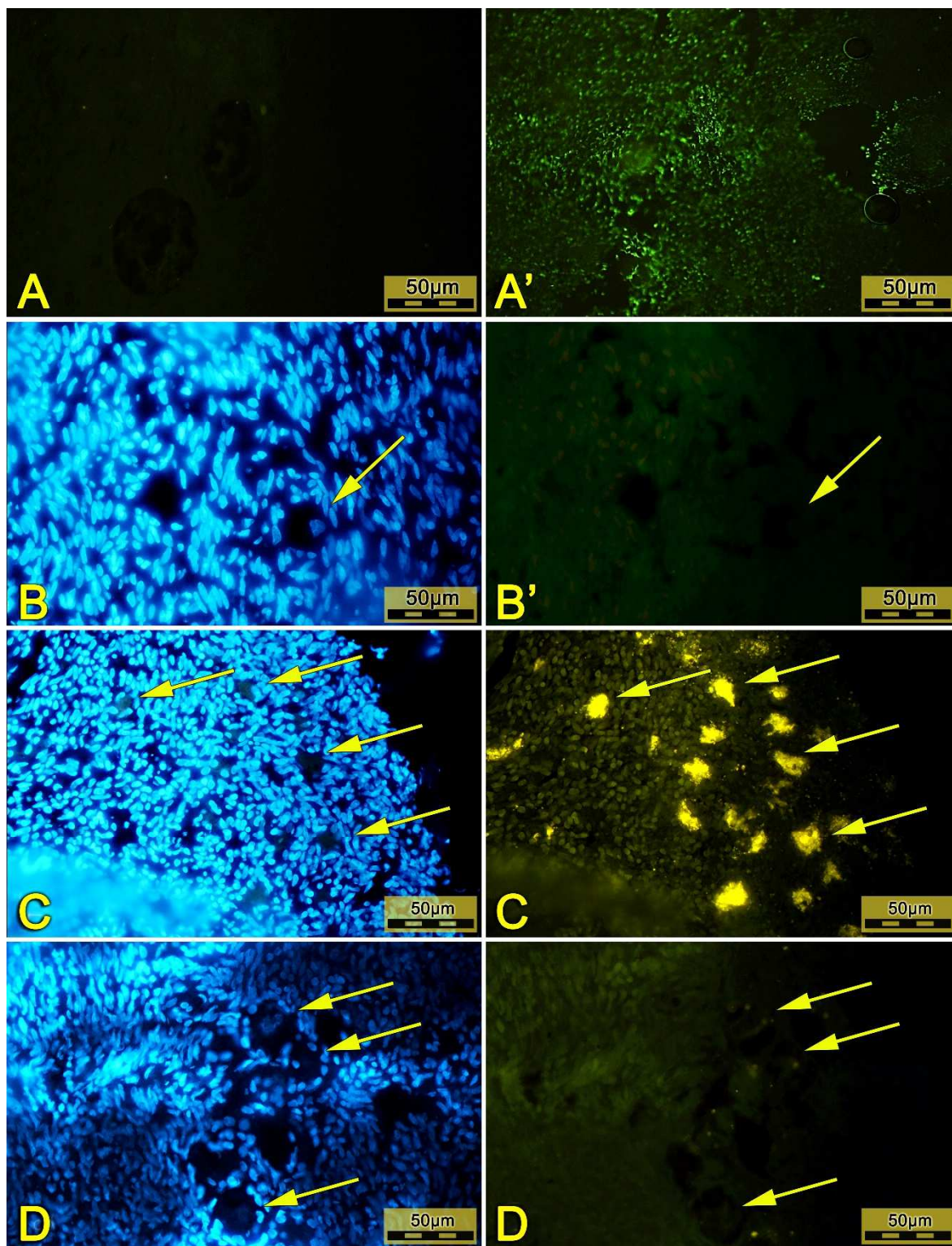


Figure 03 – Analysis of apoptosis in sections of ovarian donkey tissue (*Equus asinus*) using the TUNEL apoptosis detection kit: Negative control (A); Positive control marked with DAPI (A'); Negative control of kit (B); Positive control of kit (B'); Group vitrified with DMSO 6M (C and C'- positive reaction); Group vitrified with DMSO 3M + EG 3M (D and D'- positive reaction). Arrow: follicles. Scale bar: 50µm

Through AgNORs analysis, we identified 1.79 ± 1.4 NORs/cell in the fresh control group (Figure 4A). Based on its efficiency in the previous analysis, we identified that the combination of DMSO + EG (Figure 4B) was also quite effective in preservation 1.89 ± 0.7 NORs/cell after vitrification in comparison to the control group ($P > 0.05$).

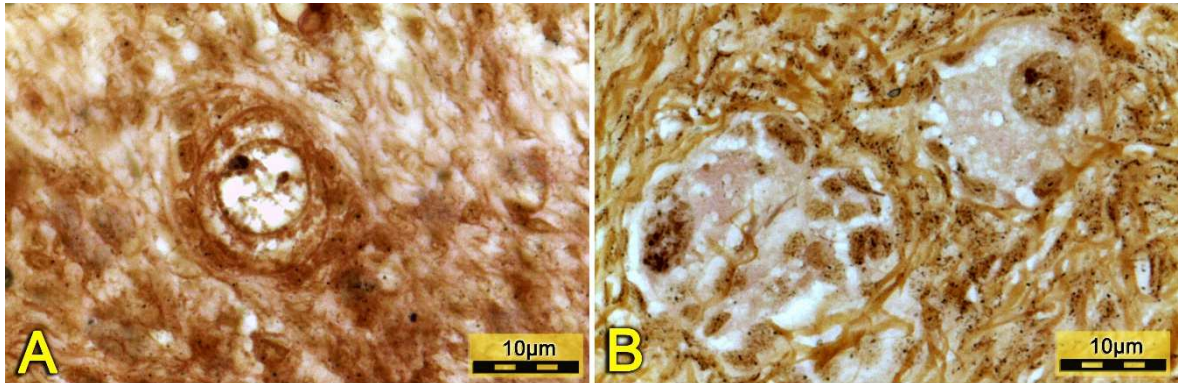


Figure 04 - Nucleolus-organizing regions (Ag-NORs) in asinine ovarian preantral follicles. Fresh control (A); vitrified using the combination DMSO 3M + EG 3M (B). Scale bar: 10µm.

Discussion

We have demonstrated, for the first time to our knowledge, the vitrification of ovarian tissue taken from donkeys. Among various vitrification techniques, SSV has been successfully used for different species such as caprine (Carvalho *et al.* 2013) mice (Fatehi *et al.* 2014), and wild rodents (SILVA *et al.* 2017). Despite these significant advances obtained, including the birth of healthy individuals after vitrification and transplant of ovarian tissue (Bordes *et al.* 2005), the vitrification techniques need to be adjusted and improved, especially regarding the determination of the most suitable CPAs to be used. In this context, microscopic examination of asinine preantral follicles have demonstrated the possibility of preserving more than 80% normal asinine preantral follicles after SSV using DMSO or EG at a 3M concentration, alone or in combination, which demonstrates promising results.

Similar results for ovarian tissue cryopreservation using EG 3M were recently reported for a species closely related to asinine: equine, in which $76.1 \pm 6.1\%$ morphologically normal PAFs were obtained after vitrification (Gastal *et al.* 2017). However, the PAFs for horses seem to be more sensitive to DMSO, which is different from asses where both cryoprotectants when isolated can be supported, that dramatically reduced normal morphology after vitrification, $40.9 \pm 14.8\%$ (Gastal *et al.* 2017). Such differences regarding the sensitivity of CPAs could be attributed to the fact that membrane properties such as water loss from the tissues and, consequently, the parameters of membrane permeability of ovarian cells from these two species differ (KARDAK; LEIBO; DEVIREDDY, 2007).

In the present study, higher concentrations of DMSO and EG (6M) increased the percentage of degenerated asinine PAFs compared to other treatments, probably due to the toxic effect of the ACPs in such a concentration. Depending on the amount of EG metabolized, the glycolic acid formed by its metabolism exceeds the cell's natural buffering capacity, leading to a reduction in pH with consequent cellular acidosis, resulting in the formation of glycine and oxalic acid (Carney *et al.* 1999). Despite the fact that DMSO is considered to be relatively non-toxic (Wusteman *et al.* 2008), it has been shown to have a significant toxic effect on the morphology of ovarian germ cells and cell proliferation depending on the concentration (Cecconi *et al.* 2004; Li *et al.* 2016).

According to Fauque *et al.* (2007), the viability test using trypan blue stain should be routinely used as a quality control method for ovarian cryopreservation procedures. On this basis, although DMSO 3M and EG 3M, either, alone or in combination, provided a high rate of morphologically healthy follicles after vitrification, the viability analysis revealed that the interaction between the DMSO 3M plus EG 3M combination promoted the most

effective preservation of asinine ovarian follicle viability ($62.5 \pm 29.1\%$) following vitrification. This could probably be due to sufficient permeation of the cryoprotectants into the ovarian tissue and the reduction of osmotic stress. It therefore could improve the success rate of cryopreserving the follicles (Ghavami *et al.* 2015).

In fact, to reduce the deleterious effects of CPAs used for vitrification, a combination of different substances has been used as a strategy to decrease total concentration of CPA without impairing its cryoprotective capacity (Wusteman *et al.* 2008). Thus, different types of CPAs have been used in combination to reduce toxicity and improve post-thaw ovarian tissue quality (Sugishita *et al.* 2016). Among them, the mix between EG and DMSO, using sucrose as the external CPA, has been demonstrated to improve the preservation of ovarian follicles (Sheikhi *et al.* 2013), as demonstrated in the case of donkey ovarian tissue in the present study. Similarly, the combination between DMSO and EG is also effective for the preservation of ovarian tissue in agoutis (Praxedes *et al.* 2015) and buffalos (Mahmoud *et al.* 2010).

Furthermore, we have not found DNA fragmentation (assessed by TUNEL) in cells derived from asinine ovarian follicles vitrified with the combination of DMSO + EG, similar to that found in the fresh control group. It is known that the maintenance of DNA integrity is also a strong indication of follicular integrity, as demonstrated in the case of rabbits (Neto *et al.* 2008), rats (Fathi *et al.* 2013), and mice (Lee *et al.* 2015). On the other hand, the presence of apoptotic cells in asinine PAFs was evidenced in all the other treatments subject to vitrification. We believe that the isolated use of CPAs under lower concentrations (3M) is not able to prevent cellular damage and consequently, apoptosis, caused by the cryopreservation process. In contrast, the higher CPA concentrations (6M) may increase risk of a toxic effect on the cells, leading to the occurrence of apoptosis. In general,

when a cell is subjected to stress conditions such as exposure to an inadequate concentration of CPAs and cooling/thawing procedures, the imbalance between the ROS/antioxidants can induce DNA double-strand breaks (DSBs) (Nowicki *et al.* 2004), which may lead to cell apoptosis (Franke *et al.* 2010).

The cellular proliferative activity in ovarian tissue of donkeys was evaluated only in the control group and in that vitrified with a combination of DMSO and EG, which provided efficient results according to the previous analyses. The NORs are segments of DNA that transcribe the ribosomal RNA which, in turn, is later translated into protein, forming ribosomes. The ribosomes, when linked to the RNA messenger, form polyribosomes, which are responsible for the synthesis of all proteins in humans, including proteins that will form new cells (Junqueira and Carneiro 2013). For this reason, NORs are directly related to cellular proliferative activity. It has been reported that the amount of NORs found in cells is directly proportional to cell proliferation, that is, the greater the proliferative activity of the cell, the greater the quantity of NORs observed (Rivero and Aguiar 2002). After the identification and counting of NORs, the same amount of NORs were observed by cells from the control follicles and those vitrified in the combination of DMSO + EG. This demonstrates that the proliferative capacity of the cells was unaffected after vitrification when using a combination of CPAs, which was selected as the most suitable treatment for asinine ovarian tissue cryopreservation.

In conclusion, we suggest that ovarian tissue taken from donkeys can be efficiently preserved through a solid surface vitrification technique using a combination of DMSO 3M and EG 3M. Present results obtained from Brazilian Northeastern breed of donkey are encouraging and highlight the possibility of establishing the protocols for freezing the genetic material derived from others endangered breeds of donkey, leading to

the formation of germplasm banks that can provide material for developing other reproductive assistance techniques to multiply these valuable animals.

Acknowledgments

CNPq (National Research Council, Brazil) supported this research (Process N° 407302/2013-1). Professor Alexandre R. Silva was supported by grants from CNPq.

Ethical

The Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA – approved the experimental protocols as well as the animal care procedures used (Opinion CEUA/UFERSA No. 08/2014)

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

References

- ASGARI, F.; VALOJERDI, M. R.; EBRAHIMI, B.; FATEHI, R. Three dimensional in vitro culture of preantral follicles following slow-freezing and vitrification of mouse ovarian tissue. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 529–536, dez. 2015.
- AYE, M.; DI GIORGIO, C.; DE MO, M.; BOTTA, A.; PERRIN, J.; COURBIERE, B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 7, p. 1905–1912, jul. 2010.

- BORDES, A.; LORNAGE, J.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; COURBIERE, B.; GUERIN, J. F.; SALLE, B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, v. 20, n. 10, p. 2745–2748, 1 out. 2005.
- CANESIN, H. S.; BROM-DE-LUNA, J. G.; CHOI, Y.-H.; ORTIZ, I.; DIAW, M.; HINRICHS, K. Blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection of equine oocytes vitrified at the germinal-vesicle stage. **Cryobiology**, v. 75, p. 52–59, abr. 2017.
- CARNEY, E. W.; FRESHOUR, N. L.; DITTENBER, D. A.; DRYZGA, M. D. Ethylene glycol developmental toxicity: unraveling the roles of glycolic acid and metabolic acidosis. **Toxicological Sciences**, v. 50, n. 1, p. 117–126, 1 jul. 1999.
- CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Extra-Ovarian Production of Mature Viable Mouse Oocytes from Frozen Primary Follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 1, p. 321–327, 1 set. 1990.
- CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; LOPES, C. a. P.; SANTOS, R. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Novel Wide-Capacity Method for Vitrification of Caprine Ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3, p. 220–227, 1 maio 2013.
- CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. de A.; DA SILVA, C. G.; FAUSTINO, L. R.; DE FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. R.; OTHERS. Intracellular cryoprotectant agents: characteristics and use of ovarian tissue and oocyte cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, 2011. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113170610>>.
- CECCONI, S.; CAPACCHIETTI, G.; RUSSO, V.; BERARDINELLI, P.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 1, p. 12–17, 2004.

- DEMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; FRANCK, M.; GUERIN, J. F. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 4, p. 754–762, abr. 2001.
- DIAS, A. M. S. S. **Medicina dentária em equinos de desporto**. 2013. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, 2013. Disponível em: <<http://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/5816>>. Acesso em: 29 mar. 2017.
- FATEHI, R.; EBRAHIMI, B.; SHAHHOSSEINI, M.; FARROKHI, A.; FATHI, R. Effect of ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 302–308, 15 jan. 2014.
- FATHI, R.; VALOJERDI, M. R.; SALEHNIA, M. Effects of Different Cryoprotectant Combinations on Primordial Follicle Survivability and Apoptosis Incidence After Vitrification of Whole Rat Ovary. **Cryoletters**, v. 34, n. 3, p. 228–238, 1 maio 2013.
- FAUQUE, P.; BEN AMOR, A.; JOANNE, C.; AGNANI, G.; BRESSON, J. L.; ROUX, C. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 5, p. 1200–1207, maio 2007.
- FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F. J.; FONTES, R. S.; NUSGENS, B.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, n. 4, p. 789–799, 1 out. 1993.
- FRANKE, J. C.; PLÖTZ, M.; PROKOP, A.; GEILEN, C. C.; SCHMALZ, H.-G.; EBERLE, J. New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 4, p. 575–586, 15 fev. 2010.
- GASTAL, G. D. A.; AGUIAR, F. L. N.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; TARSO, S. G. S. de; ISHAK, G. M.; CAVINDER, C. A.; FEUGANG, J. M.; GASTAL, E. L. Equine

Ovarian Tissue Viability after Cryopreservation and in Vitro Culture. **Theriogenology**, v. 97, p. 139–147, 15 jul. 2017.

GHAVAMI, M.; MOHAMMADNEJAD, D.; BEHESHTI, R.; SOLMANI-RAD, J.; ABEDELAHI, A. Ultrastructural and Morphological Changes of Mouse Ovarian Tissues Following Direct Cover Vitrification with Different Cryoprotectants. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 16, n. 3, p. 138–147, 2015.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 10, n. 6, p. 729–734, 1 jan. 2005.

IBGE, I. B. de G. e E. **IBGE | Séries Estatísticas & Séries Históricas**. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&vcodigo=AGRO120&t=efetivo-animais-estabelecimentos>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, G. F. **Histologia Básica**. 12^a ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2013.

KARDAK, A.; LEIBO, S. P.; DEVIREDDY, R. Membrane Transport Properties of Equine and Macaque Ovarian Tissues Frozen in Mixtures of Dimethylsulfoxide and Ethylene Glycol. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 129, n. 5, p. 688–694, 14 fev. 2007.

KUGLER, W.; GRUNENFELDER, H.-P.; BROXHAM, E. Donkey breeds in Europe. **St. Gallen, Switzerland: Monitoring institute for rare breeds and seeds in Europe**, 2008. Disponível em: <http://www.americanmuleassociation.org/s/donkey_breeds.pdf>. Acesso em: 8 dez. 2016.

LEE, J.; KIM, S. K.; YOUM, H. W.; KIM, H. J.; LEE, J. R.; SUH, C. S.; KIM, S. H. Effects of Three Different Types of Antifreeze Proteins on Mouse Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126252, 5 abr. 2015.

- LI, X.; WANG, Y.-K.; SONG, Z.-Q.; DU, Z.-Q.; YANG, C.-X. Dimethyl Sulfoxide Perturbs Cell Cycle Progression and Spindle Organization in Porcine Meiotic Oocytes. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0158074, 27 jun. 2016.
- MAHMOUD, Kg.; SCHOLKAMY, T.; AHMED, Y.; SEIDEL JR, G.; NAWITO, M. Effect of Different Combinations of Cryoprotectants on In Vitro Maturation of Immature Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Oocytes Vitriified by Straw and Open-Pulled Straw Methods. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 4, p. 565–571, 1 ago. 2010.
- MOUTTHAM, L.; FORTUNE, J. E.; COMIZZOLI, P. Damage to Fetal Bovine Ovarian Tissue Caused by Cryoprotectant Exposure and Vitrification Is Mitigated during Tissue Culture. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 8, p. 1239–1250, 1 ago. 2015.
- NAKAO, K.; NAKAGATA, N.; KATSUKI, M. Simple and Efficient Vitrification Procedure for Cryopreservation of Mouse Embryos. **Experimental Animals**, v. 46, n. 3, p. 231–234, 1997.
- NETO, V.; BUFF, S.; LORNAGE, J.; BOTTOLLIER, B.; GUÉRIN, P.; JOLY, T. Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue. **Fertility and Sterility, Reproductive Biology**. v. 89, n. 5, Supplement, p. 1348–1356, maio 2008.
- NOWICKI, M. O.; FALINSKI, R.; KOPTYRA, M.; SLUPIANEK, A.; STOKLOSA, T.; GLOC, E.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; BLASIAK, J.; SKORSKI, T. BCR/ABL Oncogenic Kinase Promotes Unfaithful Repair of the Reactive Oxygen Species–dependent DNA Double-Strand Breaks. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3746–3753, 1 dez. 2004.
- PRAXEDES, É. C. G.; LIMA, G. L.; SILVA, A. M.; APOLINÁRIO, C. A. C.; BEZERRA, J. A. B.; SOUZA, A. L. P.; OLIVEIRA, M. F.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, A. R. Characterisation and Cryopreservation of the Ovarian Preantral Follicle Population from Spix. **Reproduction, Fertility, and Development**, 8 out. 2015.

- RAGLE, C. A. Bilateral Ovariectomy in the Mare. In: RAGLE, C. A. (Ed.). **Advances in Equine Laparoscopy**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2012. p. 177–187.
- RIVERO, E. R.-C.; AGUIAR, M. C. F. de. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenóide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. **J Bras Patol Med Lab**, v. 38, n. 1, p. 39–44, 2002.
- ROSSEL, S.; MARSHALL, F.; PETERS, J.; PILGRAM, T.; ADAMS, M. D.; O’CONNOR, D. Domestication of the Donkey: Timing, Processes, and Indicators. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3715–3720, 11 mar. 2008.
- SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; HAEFTEN, T. V.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; HURK, R. V. den. Vitrification of Goat Preantral Follicles Enclosed in Ovarian Tissue by Using Conventional and Solid-Surface Vitrification Methods. **Cell and Tissue Research**, v. 327, n. 1, p. 167–176, 1 jan. 2007.
- SHEIKHI, M.; HULTENBY, K.; NIKLASSON, B.; LUNDQVIST, M.; HOVATTA, O. Preservation of human ovarian follicles within tissue frozen by vitrification in a xeno-free closed system using only ethylene glycol as a permeating cryoprotectant. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 1, p. 170–177.e2, jul. 2013.
- SILVA, A. R.; SILVA, A. M.; PAXEDES, E. C. G.; PEREIRA, A. F. Conservação de roedores histricognatos silvestres da América do Sul utilizando estratégias reprodutivas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 41, n. 1, p. 231–236, 2017.
- SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and Growth of Goat Primordial Follicles after in Vitro Culture of Ovarian Cortical Slices in Media Containing Coconut Water. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3–4, p. 273–286, abr. 2004.
- SUGISHITA, Y.; HASHIMOTO, S.; YAMOCHI, T.; IGARASHI, S.; NAKAJIMA, M.; NISHIJIMA, C.; TAKAE, S.; HORAGE, Y.; KAWAURA, K.; HOSOI, Y.; MORIMOTO, Y.; SUZUKI, N. Ovarian Tissue Cryopreservation: Ovarian Cortical

Tissue Vitrification. In: SUZUKI, N.; DONNEZ, J. (Ed.). **Gonadal Tissue Cryopreservation in Fertility Preservation**. [s.l.] Springer Japan, 2016. p. 79–94.

WUSTEMAN, M.; RAUEN, U.; SIMMONDS, J.; HUNDS, N.; PEGG, D. E. Reduction of cryoprotectant toxicity in cells in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. **Cryobiology**, v. 56, n. 1, p. 72–79, fev. 2008.

10. Conclusões

- A estimativa população de folículos pré-antrais de jumentas (*Equus asinus*) da raça nordestina segue uma correlação inversamente proporcional e estatisticamente significativa ($r = -0,57$; $P < 0,01$) entre a idade dos animais e a população de folículos ovarianos. Observa-se ainda uma influência inversamente proporcional do peso sobre população folicular ovariana: quando o estado nutricional se encontra muito abaixo ou acima da média, há impactos na população, em especial neste último ($r = -0,66$; $P < 0,001$). Com este cenário, determina-se que para a aplicação de biotécnicas reprodutivas como a Moifopa, deve-se priorizar fêmeas asininas jovens e com bom score corporal.
- O tecido ovariano de jumentas (*Equus asinus*) da raça nordestina podem ser preservados de forma eficiente através da vitrificação em superfície sólida utilizando solução de vitrificação composta de etileno glicol (EG 3M) associado a dimetil sulfóxido (DMSO 3M). Os resultados obtidos são encorajadores e suscitam a possibilidade de estabelecer protocolos de criopreservação de material genético advindo de outras raças de jumentos em risco de extinção, favorecendo a constituição de bancos de germoplasma e fornecendo material para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida para multiplicar estes valorosos animais.

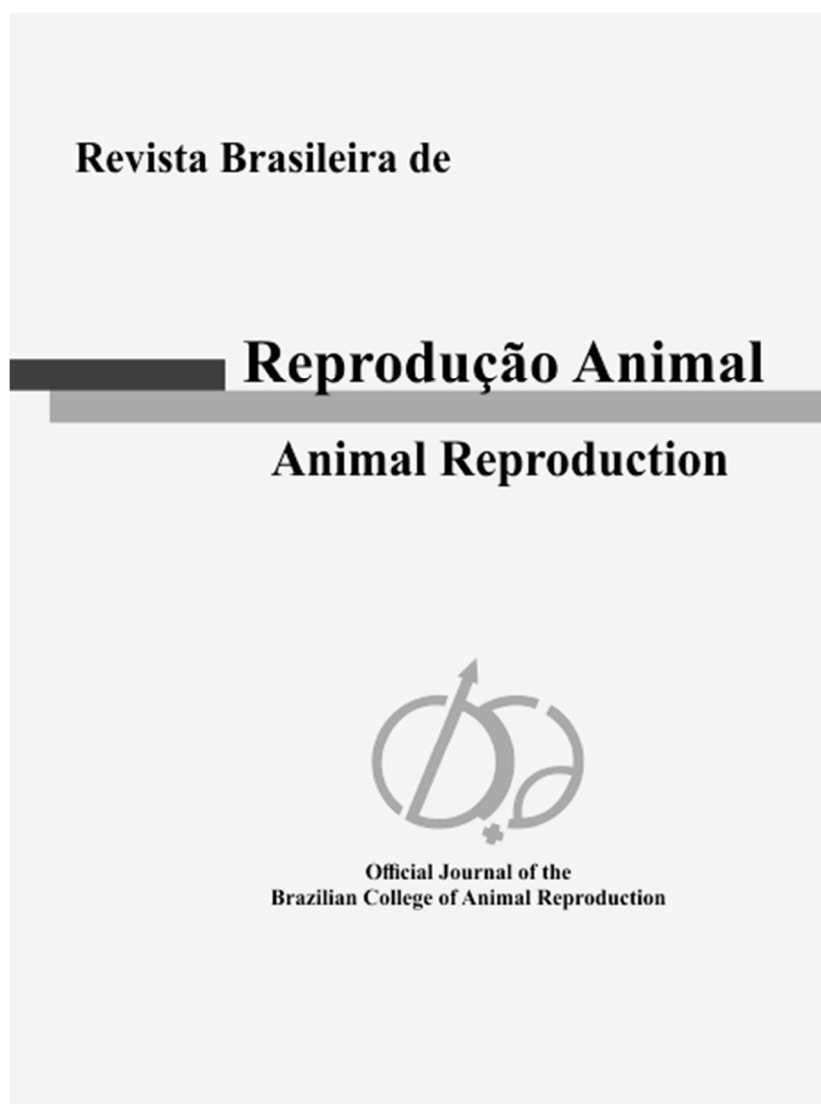
A pesquisa desenvolvida permite ampliar os horizontes acerca da aplicação das biotécnicas reprodutivas em jumentos (*Equus asinus*) especialmente diante do fato que muitas raças, inclusive a Nordestina, encontram-se sob risco de extinção. O conhecimento acerca da população de folículos pré-antrais bem como a definição de uma estratégia de criopreservação dos mesmos, permite vislumbrar a aplicação das biotécnicas já aplicadas em outras espécies ou mesmo o desenvolvimento de outras específicas.

O conhecimento construído permite não somente consolidar estratégias de manutenção do patrimônio genético, na formação de bancos de germoplasma, mas também na implementação de centros de reprodução da espécie, potencializando a formação de rebanhos, especialmente na recomposição de populações ameaçadas.

Os estudos realizados na raça nordestina, tem grande potencial de aplicação em outras raças de asininos, mas não encerram o tema. A reprodução entre os asininos nunca foram prioridade das pesquisas teóricas e aplicadas, principalmente quando comparadas a outras espécies de interesse zootécnico. A aplicação de outras biotécnicas importantes, como a maturação *in vitro* ou mesmo outras metodologias de criopreservação, ainda são inéditas na espécie e merecem ser o foco de pesquisas futuras.

Anexos – Produções adicionais

Anexo 01 – Castração química de mamíferos machos: revisão *in* Revista Brasileira de Reprodução Animal



ISSN: 1809-3000

[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n1/pag49-53\(RB489%20Lopes%20\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n1/pag49-53(RB489%20Lopes%20).pdf)

Castração química de mamíferos machos: revisão

Chemical castration of male mammals: review

K.R.F. Lopes¹, A.R. Silva

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal,
Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN, Brasil.

¹Correspondência: katia@dna.org.br

Resumo

A castração química, foco da presente revisão, é um procedimento não invasivo, que promove alterações definitivas nas estruturas do aparelho reprodutor masculino e, consequentemente, leva à redução total ou parcial da produção de espermatozoides, o que causa disfunção reprodutiva. Muitas substâncias já foram testadas em diferentes espécies, e há uma unanimidade entre os autores em descrever a quimiocastração como um procedimento de menor custo e mais seguro, se comparado a métodos cirúrgicos tradicionais (orquiectomia e deferentectomia), sem, contudo, atingir grandes níveis de eficácia. Além de conceitos, serão explorados os resultados de diversos estudos para fundamentar essas afirmações.

Palavras-chave: contracepção, intratesticular, não cirúrgico, quimiocastração.

Abstract

The chemical castration focus of this review is a noninvasive procedure that promotes definitive changes in the structures of the male reproductive system leading to total or partial reduction of sperm production, causing reproductive dysfunction. Many substances have been tested in different species and there is unanimity among the authors who describe the chemiocastration procedure as a safe lower-cost option when compared to traditional surgical methods (orchietomy and vasectomy) without, however, reaching the same levels of effectiveness. Besides concepts, the results of several studies will be explored to substantiate these claims.

Keywords: chemicastration, contraception, intratesticular, non-surgical.

Introdução

A condição natural de reprodução pode ser interrompida por diversos motivos. Nos animais de produção, a castração tem sido promovida visando ao ganho de peso, num espaço de tempo mais curto (Costa et al., 2002) ou a outras vantagens econômicas e de manejo. Nos animais de companhia, a castração pode ser indicada para tratar desvios de comportamento (Vinke et al., 2008), ou para controle populacional, naqueles de vida livre nas áreas urbanas (Shochat et al., 2010). A escolha de uma política que priorize machos ou fêmeas (ou ambos) é determinante para o sucesso da estratégia de controle. Quando as fêmeas copulam preferencialmente com o macho mais apto, a castração do macho é mais adequada (Knipling, 1959). Este modelo é bem consolidado e matematicamente descrito (Berryman, 1967).

Uma análise histórica da literatura pode fornecer subsídios para uma visão mais completa sobre os métodos de contracepção, neste caso focando os métodos químicos, para buscar a confirmação de fatos normalmente enunciados, como a economia, a praticidade e o melhor conforto para os animais (Cohen et al., 1990). De posse desta visão histórica e contemporânea, deseja-se observar que caminhos são mais promissores para estudos futuros.

Métodos contraceptivos

Os métodos contraceptivos podem ser classificados sob diferentes aspectos. Quanto à durabilidade do procedimento, o efeito pode ser permanente, quando a função reprodutiva é abolida, ou temporária. Neste último, há técnica de reversão, ou o efeito contraceptivo ocorre durante um espaço de tempo limitado (Speroff e Darney, 2010).

Adicionalmente, os métodos podem ser cirúrgicos ou não cirúrgicos. Os primeiros, invasivos, comumente são mutilatórios, por extraírem componentes dos sistemas reprodutivos do paciente (Johnston et al., 2001), e necessitam de cuidados pré e pós-operatórios específicos (Slatter, 2003), como qualquer procedimento cirúrgico.

Nos machos, a orquiectomia bilateral, que consiste na remoção dos testículos (Howe, 2006), e a deferentectomia, ou vasectomia, que se baseia na interrupção dos canais deferentes (Andrade et al., 1998), são os

métodos mais difundidos. No caso da deferentectomia, alterações comportamentais e físicas, relacionadas à esteroidogênese, não são inibidas (Johnston et al., 2001).

Nos métodos não cirúrgicos, são utilizadas substâncias que inibem processos da função reprodutiva ou que impedem que gametas viáveis sejam produzidos. Por motivos diversos, do custo à preocupação com o bem-estar animal (Prunier et al., 2006; Von Borell et al., 2009), os métodos não cirúrgicos vêm sendo estudados e aprimorados, especialmente nos últimos anos.

Métodos de castração não cirúrgicos em mamíferos machos

Três grandes classes de métodos não cirúrgicos são descritas, sendo elas a terapia hormonal, a imunoesterilização e a esterilização química (Oliveira et al., 2012), que diferem entre si pelo mecanismo de ação no organismo. Esta classificação é aceita universalmente, embora alguns considerem como não cirúrgicos métodos como o estrangulamento do cordão espermático e a morte das células testiculares, com elástico de borracha (Becker et al., 2012) ou uso do burdizzo (Dnekeshev e Kereyev, 2013).

Na terapia hormonal, busca-se a queda da qualidade seminal pela redução na concentração de espermatozoides, utilizando-se progestágenos, andrógenos ou agonistas de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH; Johnston et al., 2001). Muito embora os progestágenos sejam mais comumente usados para o controle da fertilidade feminina (Burke e Reynolds, 1975), o acetato de megestrol e o acetato de medroxiprogesterona (MPA) são também usados para machos (Wright et al., 1979). A teratozoospermia sugere efeito do MPA diretamente sobre a função epididimária, e seu uso em associação à testosterona gera efeitos ainda mais rápidos (Johnston et al., 2001). Contudo, progestágenos são contraindicados devido a efeitos adversos, como supressão adrenocortical, alterações no metabolismo da glicose e desenvolvimento de tumores mamários ou outros tumores malignos de natureza diversa (Asa e Porton, 2005).

O uso de andrógenos é considerado como mais eficaz que o de progestágenos. Eles atuam na supressão da liberação de LH e FSH e na diminuição da concentração de testosterona intratesticular, com consequente bloqueio ou diminuição da espermatogênese. Entre os efeitos colaterais associados, apontam-se dermatite seborreica, disfunções hepáticas, obesidade e mudanças comportamentais. Os andrógenos são fortemente contraindicados em animais pré-puberes, dadas as alterações em conformações ósseas (Gray et al., 2001). O uso de progestágenos, assim como o de andrógenos, é considerado reversível (Poli et al., 2009).

Outra abordagem consiste em influenciar a secreção das gonadotrofinas pela ação de agonistas ou antagonistas do GnRH. Existem fármacos com diferentes apresentações e são reversíveis com a suspensão do tratamento (Bowen, 2008). O sucesso no uso de implantes em cães (Ludwig et al., 2009) e em furões (Schoemaker et al., 2008) já foi demonstrado, assim como o de injeções em gatos (Levy et al., 2004).

A imunoesterilização possui uma ação diferente da terapia hormonal, pois leva o organismo a produzir ação imunológica a elementos essenciais na espermatogênese. As técnicas mais utilizadas e estudadas envolvem a produção de anticorpos contra o GnRH ou o LH, tanto em animais de produção (Pirard et al., 2002) como de companhia (Purswell e Kolster, 2006).

Castração química

O termo esterilização ou castração química vem ganhando destaque, inclusive na imprensa, pois há diversos países que consideram seu uso como pena a condenados por crimes sexuais (Ponteli e Sanches Jr., 2011). Neste caso, o termo inclui o uso de qualquer fármaco que induza à castração, inclusive a imunoesterilização e, principalmente, as terapias hormonais (dado que o controle hormonal limita também a libido). Contudo, a castração química refere-se ao uso de elementos que geram inflamação, fibrose e dano físico definitivo às estruturas do aparelho reprodutor masculino, especialmente nos ductos deferentes, nos epidídimos e nos próprios testículos, reduzindo a espermatogênese e a concentração sérica de andrógenos (Kutzler e Wood, 2006). Estes métodos são tidos como irreversíveis e proporcionam menores níveis de dor e maior velocidade de recuperação quando comparados aos procedimentos tradicionais (Cohen et al., 1990; Emir et al., 2008; Ahmed e Al-Badrany, 2009).

A aplicação intratesticular de ácido láctico foi eficaz na castração de bovinos, camundongos e cães, com resultados perceptíveis após 24 h (Nishimura et al., 1992). Em um estudo com caprinos, doses de 1 a 3 mL/10 kg de ácido láctico levaram à infertilidade definitiva (Okwee-Acai et al., 2008).

Solução salina 20% injetada diretamente nos testículos de ratos levou à azoospermia com necrose dos testículos, sem danos à bolsa escrotal (Emir et al., 2008). Entretanto, na maioria dos estudos com outras substâncias, os grupos controle são tratados com soluções salinas, mas em concentrações ou volumes menores, sem apresentação de danos que comprometam as funções reprodutivas (Oliveira et al., 2007).

O gluconato de zinco em injeção intratesticular vem sendo amplamente utilizado e estudado. Em ursos negros americanos, não gerou alterações nas dimensões dos testículos, tampouco na produção de GnRH, mas estudos ultrassonográfico e histológico demonstraram alterações degenerativas e comprometimento parcial da produção de espermatozoides (Brito et al., 2011). Em cães, análises histológicas revelaram danos similares e

igual eficácia da solução de zinco ao induzir processo inflamatório e perda da função testicular (Oliveira et al., 2007). Este processo inflamatório não prejudica o efeito contraceptivo, com manutenção do bem-estar do animal (Oliveira et al., 2012b). Em um estudo realizado com gatos, 73% dos animais apresentaram azoospermia e mudanças comportamentais (em 36% dos animais), sem detecção de queda substancial dos níveis de testosterona (Oliveira et al., 2013).

O zinco faz parte do processo de espermatogênese naturalmente. Sua carência ou excesso trazem variações no processo, levando quase sempre à azoospermia (Neathery et al., 1973). Em virtude disto, diversos fármacos vêm sendo desenvolvidos com substâncias à base de gluconato de zinco, como o Neutersol (Pet Healthcare International, Inc., Columbia, MO, USA; Wang, 2002), o Testoblock (BioRelease Technologies, Birmingham, AL, USA; Oliveira et al., 2012a), o Esterisol ou Zeuterin (Ark Sciences, New York, NY, USA; Massei e Miller, 2013) e o Infertile (RhoBifarma, Hortolândia, SP, Brazil; Soto et al., 2009), com composições, concentrações e veículos diferentes.

O uso do glicerol foi prescrito para determinar um modelo entre a relação de queda da espermatogênese e os níveis séricos de FSH, confirmando-se o glicerol como agente esclerosante eficaz para castração (Weinbauer et al., 1987). O glicerol já foi testado em cães em dose de 1 mL por testículo. Apesar da diminuição na concentração de testosterona sérica, não foi obtida a infertilidade (Immegart e Threlfall, 2000). Em macacos da espécie *Saimiri sciureus*, uma única injeção intratesticular de uma solução de glicerol levou à azoospermia definitiva (Wiebe et al., 1989).

O cloreto de cálcio (CaCl_2) mostrou-se eficaz em diferentes espécies (bovinos, caprinos, ovinos, suínos, caninos e felinos), utilizando-se veículos diferentes (normalmente água destilada, álcool etílico ou isopropílico), concentrações distintas e em volumes proporcionais à massa testicular, com resultados positivos (Koger, 1978). Testes específicos já foram realizados com sucesso em gatos (20% CaCl_2 ; Jana e Samanta, 2007), em caprinos (10 a 40 mg/kg de CaCl_2), sendo que a concentração mais alta apresentou resultados mais contundentes (Jana et al., 2005), e em cães, testando-se doses de 10 a 20 mg, com melhores resultados nesta última (Jana e Samanta, 2007).

Diversas outras substâncias esclerosantes já foram testadas. A azoospermia foi observada em cães após aplicação intratesticular 5,0 mL de formalina 3,3%, gluconato de clorexidina 1,5% associada ao DMSO 50% (Pineda et al., 1977). A aplicação testicular de 1mL de formalina 10% em 10 ovinos permitiu a detecção da perda de massa testicular e provocou dano irreparável aos túbulos seminíferos (Ijaz et al., 2000). Uma única aplicação nos vasos deferentes levou à azoospermia em cães, pela obstrução dos vasos deferentes, com o uso de etanol 100% e soluções formaldeído em etanol 3,5%, permanganato de potássio 5% e nitrato de prata 10%. Em todos os casos, houve oclusão dos vasos deferentes e atrofia testicular (Dixit et al., 1975). O nitrato de prata (1 a 5%) também foi estudado em coelhos (Lee et al., 1985) com resultados permanentes.

Em búfalos castrados com injeções intratesticulares de formaldeído 40% e 0,005 g/mL de cloridrato de cádmio diluído em óleo de girassol, numa razão de 1 mL/kg de peso vivo, verificaram-se não só azoospermia como ganho de peso, quando comparados a animais não tratados (Costa et al., 2002). Em coelhos, estudos que utilizaram uma única aplicação de cloridrato de cádmio mostraram-se efetivos ao destruírem células dos túbulos seminíferos (Cameron, 1965). Muare receberam tratamento de 600 mg de ácido tânico e 750 mg de cafeína, e todos os achados clínicos, hormonais e histopatológicos demonstraram azoospermia (Ahmed e Al-Badrany, 2009).

Considerações finais

A castração química é uma opção amplamente apontada na literatura como tendo eficácia similar aos procedimentos cirúrgicos tradicionais quando aplicada a mamíferos machos, com uma série de vantagens. O tempo de recuperação é menor quando comparado ao procedimento cirúrgico, assim como os cuidados pós-tratamento reduzem-se drasticamente. Ademais, é um processo menos invasivo, que minimiza as possibilidades de infecções oportunistas, sem necessidade de curativos.

Diversos tratamentos são eficazes numa única aplicação e têm caráter irreversível na maior parte dos casos estudados, critérios definidos para boas técnicas de esterilização. Há, ainda, facilidade de execução, rapidez de recuperação e o fato de materiais e substâncias ou fármacos acessíveis possuírem baixo custo, se esses tratamentos forem comparados ao procedimento cirúrgico. As técnicas químicas são promissoras a ponto de atraírem a indústria farmacêutica, que já colocou no mercado alguns fármacos cuja eficácia já foi provada em diversas espécies.

Referências

- Ahmed OS, Al-Badrany MS. Chemical castration in equidae. Mosul: College of Veterinary Medicine, University of Mosul, 2009.
- Andrade RP, Mello CR, Piazza, MJ, Thereza LA, Arrabal JS. Laqueadura tubária e vasectomia. *Femina*, v.26, p.449-453, 1998.



- Asa CS, Porton IJ.** Wildlife contraception: issues, methods, and applications. [s.l.] JHU Press, 2005.
- Becker J, Doherr MG, Bruckmaier RM, Bodmer M, Zanolari P, Steiner A.** Acute and chronic pain in calves after different methods of rubber-ring castration. *Vet J*, v.194, p.380-385, 2012.
- Berryman AA.** Mathematical description of the sterile male principle. *Can Entomol*, v.99, p.858-865, 1967.
- Bowen RA.** Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. *Anim Reprod Sci*, v.105, p.139-143, 2008.
- Brito LFC, Sertich PL, Rives W, Knobbe M, Piero FD, Stull GB.** Effects of intratesticular zinc gluconate treatment on testicular dimensions, echodensity, histology, sperm production, and testosterone secretion in American black bears (*Ursus americanus*). *Theriogenology*, v.75, p.1444-1452, 2011.
- Burke TJ, Reynolds HA.** Megestrol acetate for estrus postponement in the bitch. *J Am Vet Med Assoc*, v.167, p.285-287, 1975.
- Cameron E.** The effects of intratesticular injections of cadmium chloride in the rabbit. *J Anat*, v.99, p.907-912, 1965.
- Cohen RDH, King BD, Thomas LR, Janzen ED.** Efficacy and stress of chemical versus surgical castration of cattle. *Can J Anim Sci*, v.70, p.1063-1072, 1990.
- Costa NA, Moura Carvalho LOD, Lourenço-Júnior JB, Teixeira-Neto JF, Santos NFA, Monteiro EMM.** Ponderal performance of buffaloes chemically castrated, in Belém, Pará State, Brazil. In: *Buffalo Symposium of Americas*, 1, 2002, Belém, PA. Belém, PA: The American Water Buffalo Association, 2002. Resumo.
- Dixit VP, Lohiya NK, Arya M, Agrawal M.** The effects of chemical occlusion of vas deferens on the testicular function of dog: a preliminary study. *Acta Eur Fertil*, v.6, p.348-353, 1975.
- Duekeshv AK, Kereyev AK.** The effect of castration age on the productivity of meat from lamb hogs. *Afr J Agric Res*, v.8, p.32-35, 2013.
- Emir L, Dadali M, Sunay M, Erol D, Caydere M, Ustün H.** Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: a minimally invasive method. *Urol Oncol*, v.26, p.392-396, 2008.
- Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillelte L.** Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, v.109, p.S302-S319, 2001.
- Howe LM.** Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, v.66, p.500-509, 2006.
- Ijaz A, Abalkhail AA, Khamas WAH.** Effect of intra testicular injection of formalin on seminiferous tubules in Awassi lambs. *Pak Vet J*, v.20, p.129-134, 2000.
- Immegart HM, Threlfall WR.** Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs. *Am J Vet Res*, v.61, p.544-549, 2000.
- Jana K, Samanta PK.** Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. *BMC Vet Res*, v.7, p.39, 2011.
- Jana K, Samanta PK.** Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. *Contraception*, v.5, p.390-400, 2007.
- Jana K, Samanta PK, Ghosh D.** Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study. *Anim Reprod Sci*, v.86, n.1/2, p.89-108, 2005.
- Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS.** Canine and feline theriogenology. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2001.
- Knipling EF.** Sterile-male method of population control successful with some insects, the method may also be effective when applied to other noxious animals. *Science*, v.130, n.3380, p.902-904, 1959.
- Koger LM.** Calcium chloride castration. *Modern Vet Pract*, v.59, p.119-121, 1978.
- Kutzler M, Wood A.** Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, v.66, p.514-525, 2006.
- Lee EB, Park CS, Kang DJ, Yun CH.** Chemical castration by intratesticular injection of AgNO₃ solution in rabbits. *Korean J Anim Sci*, v.27, p.756-762, 1985.
- Levy JK, Miller LA, Cynda Crawford P, Ritchey JW, Ross MK, Fagerstone KA.** GnRH immunocontraception of male cats. *Theriogenology*, v.62, p.1116-1130, 2004.
- Ludwig C, Desmoulins PO, Driancourt MA, Goericke-Pesch S, Hoffmann B.** Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-Agonist Azagly-Nafarelin as a removable implant "Gonazon"; a preclinical trial. *Theriogenology*, v.71, p.1037-1045, 2009.
- Massei G, Miller LA.** Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: A review of products and criteria for field applications. *Theriogenology*, v.80, p.829-838, nov. 2013.
- Neathery MW, Miller WJ, Blackmon DM, Pate FM, Gentry RP.** Effects of long term zinc deficiency on feed utilization, reproductive characteristics, and hair growth in the sexually mature male goat. *J Dairy Sci*, v.56, p.98-105, 1973.
- Nishimura N, Kawate N, Sawada T, Mori J.** Chemical castration by a single intratesticular injection of lactic acid in rats and dogs. *J Reprod Dev*, v.38, p.263-266, 1992.
- Okwee-Acai J, Ojok L, Acon J.** Testicular morphologic and hormonal responses to an intratesticular injection



- of lactic acid for induction of chemosterilisation in adult mubende goats. *Afr J Anim Biomed Sci*, v.3, p.5-11, 2008.
- Oliveira BAS, Rocha LM, Mól B, Valle GR.** Métodos cirúrgicos e não cirúrgicos de contracepção masculina em cães. *Sinapse Múltipla*, v.1, p.1-14, 2012a.
- Oliveira ECS, Fagundes AK, Melo CC, Nery LT, Rêvoredó RG, Andrade TF, Oliveira-Esquerre K, Kastelic JP, Silva VA Jr.** Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial of efficacy and safety. *Vet J*, v.197, p.307-310 2013.
- Oliveira ECS, Moura MR, de Sá MJ, Silva VA Jr, Kastelic JP, Douglas RH, Marques Jr AP.** Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. *Theriogenology*, v.77, p.1056-1063, 2012.
- Oliveira ECS, Muller PM, Silva FL, Nery LT, de Sá MJ, Guerra MM, Oliveira-Esquerre KP, Kastelic JP, Douglas RH.** Oral administration of an anti-inflammatory does not compromise the efficacy of intra-testicular injection of zinc gluconate as a contraceptive for dogs. *Anim Reprod Sci*, v.132, p.207-212, 2012b.
- Oliveira ECS, Oliveira EC, Moura MR, Silva Jr VA, Peixoto CA, Saraiva KL, Sá MJ, Douglas RH, Marques Jr AP.** Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. *Theriogenology*, v.68, p.137-145, 2007.
- Pineda MH, Reimers TJ, Faulkner LC, Hopwood ML, Seidel GE Jr.** Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. *Am J Vet Res*, v.38, p.831-838, 1977.
- Pirard M, Portetelle D, Bertozzi C, Parmentier I, Haezebroeck V, Fontaine S, Renaville R.** Immunocastration of farm animals. In: Renaville R, Burny A (Ed.). *Biotechnology in Animal Husbandry. Focus on Biotechnology*. [s.l.] Springer Netherlands, 2002. p.169-178.
- Poli, MEH, Mello CR, Machado RB, Pinho Neto JS, Spínola PG, Tomas G, Silveira MM, Formiga Filho JFN, Ferrari AEM, Giordano MV, Aldrighi JM, Giribela AHG, Araújo FF, Magalhães J, Bossemeyer RP.** Manual de anticoncepção da FEBRASGO. *Femina*, v.37, n.9, p.460, 2009.
- Ponteli NN, Sanches Jr CA.** Notas para uma análise sociológica sobre a castração química. *Rev Levs/Unesp Marília*, n.5, 13p., 2011.
- Prunier A, Bonneau M, von Borell EH, Cinotti S, Gunn M, Fredriksen B, Giersing M, Morton DB, Tuytens FAM, Velarde A.** A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *Anim Welf*, v.15, p.277, 2006.
- Purswell BJ, Kolster KA.** Immunocastration in companion animals. *Theriogenology*, v.66, p.510-513, 2006.
- Schoemaker NJ, van Deijk R, Muijlaert B, Kik MJ, Kuijten AM, de Jong FH, Trigg TE, Kruitwagen CL, Mol JA.** Use of a gonadotropin releasing hormone agonist implant as an alternative for surgical castration in male ferrets (*Mustela putorius furo*). *Theriogenology*, v.70, p.161-167, 2008.
- Shochat E, Lerman SB, Anderies JM, Warren PS, Faeth SH.** Invasion, competition, and biodiversity loss in urban ecosystems. *BioScience*, v.60, p.199-208, 2010.
- Slatter DH.** Textbook of small animal surgery. [s.l.]: Elsevier Health Sciences, 2003, v.2
- Soto F, Viana WG, Mucciolo GC, Hosomi FY, Vannucchi CI, Mazzei CP, Eyherabide AR, de Fátima Lúcio C, Dias RA, de Azevedo SS.** Evaluation of efficacy and safety of zinc gluconate associated with dimethyl sulphoxide for sexually mature canine males chemical neutering. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.927-931, 2009.
- Speroff L, Darney PD.** A clinical guide for contraception. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
- Vinke CM, van Deijk R, Houx BB, Schoemaker NJ.** The effects of surgical and chemical castration on intermale aggression, sexual behaviour and play behaviour in the male ferret (*Mustela putorius furo*). *Appl Anim Behav Sci*, v.115, p.104-121, 2008.
- Von Borell E, Baumgartner J, Giersing M, Jägglin N, Prunier A, Tuytens FA, Edwards SA.** Animal welfare implications of surgical castration and its alternatives in pigs. *Animal*, v.3, p.1488-1496, 2009.
- Wang M.** Neutersol: Intratesticular injection induces sterility in dogs. In: International Symposium on non-surgical methods for pet population control, 2002, Pine Mountain, GA: Proceedings... Pine Mountain, GA: Alliance for Contraception in Cats and Dogs, 2002. p.62-65
- Weinbauer GF, Drobnitzky F, Galhotra MM, Nieschlag E.** Intratesticular injection of glycerol as a model for studying the quantitative relationship between spermatogenic damage and serum FSH. *J Endocrinol*, v.115, p.83-90, 1987.
- Wiebe JP, Barr KJ, Buckingham KD.** Sustained azoospermia in squirrel monkey, *Saimiri sciureus*, resulting from a single intratesticular glycerol injection. *Contraception*, v.39, p.447-457, 1989.
- Wright PJ, Stelmasiak T, Black D, Sykes D.** Medroxyprogesterone acetate and reproductive processes in male dogs. *Aust Vet J*, v.55, p.437-438, 1979.

Anexo 2 –Asininos: associação com assentamentos humanos *in* Anais XXXII Encontro anual de Etologia & V Simpósio Latino-americano de Etologia



<http://www.etologiabrasil.org.br/media/upload/eae/anais-2014.pdf>

SENTINDO O FUTURO

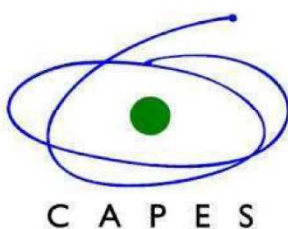


Mossoró-RN, Brasil - 18 a 21 de novembro de 2014

<http://www.etologiabrasil.org.br/xxxiieae/anais-do-evento.html>



UNIVERSIDADE FEDERAL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
RURAL DO SEMI-ÁRIDO



Pós-Graduação
Ecologia e Conservação
Ciência Animal

Sociedade Brasileira de Etologia



SBEt

ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA



www.facebook.com/EncontroAnualDeEtologia

**ANAIS DO
XXXII ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA
&
V SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE ETOLOGIA**

MOSSORÓ/RN

2014



reprodução de várias espécies de aves, sendo necessárias políticas de conservação desses habitats.

Palavras-chave: Aves, área urbana, reprodução, predação.

Apoio Financeiro: PIBIC/CNPq

Asininos: associação com assentamentos humanos

KATIA REGINA FREIRE LOPES**, KLEBER JACINTO, ALEXANDRE RODRIGUES SILVA, ERALDO BARBOSA CALADO, GISLAYNE CHRISTIANNE XAVIER PEIXOTO

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, Brasil.

katia@dna.org.br

No Brasil o transporte terrestre rodoviário é essencial para a economia, cortando áreas urbanas, rurais e de proteção ambiental, e a presença de animais nas vias é nociva aos condutores de veículos, pois os animais são apontados como fatores na insegurança nas estradas, e para os próprios animais, pois o atropelamento impacta nas populações de diversas espécies. No caso do jumento nordestino (raça de *Equus asinus*), que passa por um processo de abandono após séculos de domesticação, com um ciclo reprodutivo de cerca de 3 anos (entre nascimento e maturidade sexual) possivelmente aviste-se nas estradas pelo menos a terceira geração de animais selvagens, sem intervenção humana. Apesar desta condição, de serem animais nômades, capazes de buscar recursos naturais na adversidade, percebeu-se através da observação da presença de jumentos na BR-304, entre Macaíba/RN e Mossoró/RN, extensão de 245,8km, uma associação com a presença de assentamentos humanos (municípios ou áreas rurais segundo o censo do IBGE). A concentração dos animais era proporcionalmente maior onde havia presença humana. Estas áreas ocupam cerca de 38,25% do trecho rodoviário observado e 47,8% de todos os avistamentos de jumentos, vivos e mortos, ocorridos nos anos de 2013 e 2014, estavam concentrados nestas áreas. Percebe-se que apesar de seu estado selvagem, sem treinamento ou convívio forçado, estes animais, de índole mansa e forte senso de autopreservação, preferem a proximidade aos humanos, provavelmente pela disponibilidade de alimento (resíduos domésticos, pastagem e cultivo artificial), água e possivelmente por laços mais profundos entre as espécies do que normalmente são considerados.

Palavras-chave: jumento nordestino, trânsito, acidentes, ecologia das estradas

Comportamento de forrageio de beija-flores com o uso de bebedouros artificiais

LORENA LÚCIA DO VALE VASCONCELOS*, ROSA THAYANE MARTINS MACIEL, PRISCILLA KELLY DA SILVA BARROS

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, Brasil.

lorena.vvale@hotmail.com

Os beija-flores são aves nectarívoras, comumente atraídas por bebedouros artificiais em áreas urbanas. O presente estudo analisou o comportamento de forrageio de beija-flores durante a exploração de bebedouros artificiais com baixas concentrações de

Anexo 3 –Estimativa da população de folículos ovarianos pré-antrais da raça de Jumento Nordestino Brasileiro *in* Anais do XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal



[http://www.cbra.org.br/porta1/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p345-370%20\(ApresOral\).pdf](http://www.cbra.org.br/porta1/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p345-370%20(ApresOral).pdf)

Estimativa da população de folículos ovarianos pré-antrais da raça de Jumento Nordestino Brasileiro

Estimation of the preantral ovarian follicles population of Northeast Brazilian donkey (Equus assinus)

Katia Regina Freire Lopes*, Gabriela Liberalino Lima, Erica Camila Gurgel Praxedes, Luana Grasielle Pereira Bezerra, Alexandre Rodrigues Silva

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil.

*E-mail: katiaregina.dna@gmail.com

Os Jumentos (*Equus assinus*) são animais historicamente relevantes para a ocupação de áreas inóspitas em todo o mundo, mas tem perdido espaço devido à modernização dos centros urbanos e da mecanização agrícola e transporte motorizado. Assim, muitas raças de jumentos já foram extintas ou encontram-se em rápido processo de queda populacional, dentre estas, o jumento Nordestino, endêmico no Brasil. Uma das estratégias de conservação é o uso de biotecnologias que favoreçam a reprodução assistida, como a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) que maximiza a disponibilidade de oócitos para outras biotécnicas. Como o ponto inicial para o uso desta e outras técnicas é conhecer detalhes da fisiologia reprodutiva e dos gametas da espécie que deseja manipular, objetivou-se estimar e caracterizar a população de folículos ovarianos pré-antrais (FPs) de jumentas da raça Nordestina. Vinte fêmeas com idade média de $5,1 \pm 3,2$ anos e peso médio de $105,2 \pm 18,6$ kg, constituíram o grupo de estudo. As mesmas foram submetidas a procedimento de ovariectomia guiada por laparoscopia para coleta dos ovários. Assim como nos demais equídeos, os ovários das jumentas apresentam formato reniforme e suas zonas corticais, incluindo a fossa ovariana, foram extraídas. Os córtex foram fixados com Carnoy, desidratados em concentrações crescentes de etanol, clarificados usando xileno e finalmente inclusos em blocos de parafina histológica. Estes blocos foram sequencialmente seccionados em micrótomo em frações de 7 μ m. Uma a cada 120 frações foi montada em lâminas de vidro, coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas em microscópio ótico. Os FPs que apresentaram núcleo visível foram fotografados, mensurados com uso de software especializado e classificados como primordiais, primários e secundários. Os FPs classificados e contados foram identificados como normais, quando morfológicamente íntegros, ou degenerados, com sinais de degeneração. A população de FPs foi estimada usando a fórmula: (número de FPs observados $\times$ número total de secções $\times$ espessura das secções) dividido por (número de secções observadas $\times$ diâmetro médio do núcleo dos oócitos). A população média estimada foi de 21.135 ± 10.646 FPs por animal. Destes, 91,3% foram identificados como primordiais; 8,2% como folículos primários e 0,4% como secundários. Folículos com múltiplos oócitos foram observados em todos os animais, sendo todos folículos primordiais, representando 1% do total de folículos. O número médio de folículos primordiais estimado foi de 19.300 ± 10.821 como esperado, o máximo valor foi encontrado na segunda fêmea mais jovem (2 anos e 27.951,8 folículos) e o valor mínimo na mais velha (9 anos e 3.669,8 folículos). Estes folículos apresentaram um diâmetro médio de $30,7 \pm 6\mu$ m. Os primários foram estimados em 1.745 ± 1.524 , com máximo de 3.527,6 (também na segunda mais jovem) e 113,7 folículos no espécime mais velho, tendo um diâmetro médio de $35 \pm 8,3\mu$ m. Os folículos secundários, com $70,6 \pm 43,4\mu$ m, foram estimados em 89 ± 49 folículos por animal, com máximo de 155,2 e mínimo de 31,1. A população de FPs estimada estava distribuída entre os ovários direito e esquerdo, em 54,6% e 45,4% respectivamente. A maior parte dos FPs foi considerada morfológicamente normal (90,2%) e a menor parcela, degenerados (9,8%). Em conclusão, este trabalho apresenta de forma inédita a estimativa de folículos pré-antrais nos ovários das jumentas da raça nordestina. Esta informação é a base para o desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida para a conservação e multiplicação da raça.

Palavras-chave: Equus asinus, ovário, germoplasma, conservação.

Key-words: Equus asinus, ovary, germoplasm, conservation.

Anexo 4 – Vitrficação do tecido ovariano de jumento nordestino (*Equus asinus*) utilizando diferentes crioprotetores. Resumo submetido ao RENORBIO 2017: Encontro de Biotecnologia do Nordeste



Vitrificação do tecido ovariano de jumento nordestino (*Equus asinus*) utilizando diferentes crioprotetores

AR Silva¹⁻², KRF Lopes¹, ECG Praxedes¹, LB Campos¹, MB Bezerra¹, GL Lima¹,
MVA Saraiva¹

¹ Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal – LCGA, Universidade Federal Rural do
Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. ²E-mail: legio2000@yahoo.com

Os asininos tiveram um espaço significativo na história humana, mas nos dias atuais estão sendo abandonados devido à modernização das atividades rurais. Várias raças endêmicas estão sofrendo uma redução drástica de sua população, dentre estas a raça Nordestina Brasileira. Para salvaguardar seu valioso material genético, é crucial desenvolver bancos de germoplasma para permitir a conservação da principal fonte de gametas femininas encontradas nos ovários: os folículos pré-antrais. Neste sentido, objetivou-se avaliar um protocolo de vitrificação para o tecido ovariano asinino, com a finalidade de preservar folículos pré-antrais, usando diferentes soluções crioprotetoras contendo diferentes concentrações (3 ou 6 M) de dimetilsulfóxido (DMSO) ou etileno glicol (EG), isoladamente ou em associação (DMSO 3M e EG 3M). Para tanto, fragmentos do córtex de dez pares de ovários obtidos por videolaparoscopia foram submetidos à vitrificação em superfície sólida (SSV) usando cada solução crioprotetora proposta. Após uma semana armazenado em nitrogênio líquido, procedeu-se o reaquecimento e análise das amostras. Os tecidos a fresco e vitrificados foram avaliados quanto à morfologia por meio da histologia clássica, à viabilidade folicular pelo teste com a coloração de azul de Tripán, a apoptose celular utilizando-se um kit TUNEL, e à capacidade de proliferação celular por meio da contagem das regiões organizadoras nucleolares (AgNOR) em células da granulosa. Verificou-se que a vitrificação reduziu significativamente ($P < 0,05$) a proporção de folículos morfologicamente normais em comparação ao tecido fresco ($90,6 \pm 5,0\%$). Comparando-se os tratamentos, o uso de DMSO 3M ($81,7 \pm 37,5\%$), EG 3M ($83,7 \pm 27,4\%$) e a combinação de DMSO 3M mais EG 3M ($81,8 \pm 46,8\%$) permitiram uma maior porcentagem de folículos normais em contraste com DMSO 6M ($69,8 \pm 16,5\%$) e EG 6M ($72,3 \pm 18,0\%$) ($P < 0,05$). A melhor preservação da viabilidade folicular foi obtida no uso da combinação DMSO 3M + EG 3M ($62,5 \pm 29,1\%$) em relação aos outros tratamentos de vitrificação ($P < 0,05$). A análise por meio do TUNEL permitiu identificar que todos os tratamentos testados demonstraram fragmentação do DNA nas células foliculares, exceto no uso da combinação de DMSO 3M e EG 3M. Ao avaliar a presença de NORs, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de NORs entre os grupos a fresco e vitrificado utilizando-se a combinação DMSO 3M e EG 3M ($P > 0,05$). Assim, sugere-se o uso da combinação de DMSO 3M e EG 3M para a vitrificação do tecido ovariano obtido de *Equus asinus*, permitindo uma preservação adequada da morfologia, viabilidade, integridade do DNA e capacidade proliferativa celular dos folículos pré-antrais.

Keywords: Criopreservação, espécies em risco, agentes crioprotetores, dimetil sulfóxido, etileno glicol.

Financiamento: CNPq

Anexo 5 - Comunicado da Submissão do 2º Artigo/Capítulo II

Subject: Enc: Successfully received: submission Characterization of the ovarian preantral follicles population and its correlation with weight and age in Brazilian Northeastern donkeys (*Equus asinus*) for Animal Reproduction Science
To: Katia Regina <katia@dna.org.br>

Em Sábado, 22 de Abril de 2017 18:40, Animal Reproduction Science
<EvisSupport@elsevier.com> escreveu:

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: ANIREP_2017_248

Title: Characterization of the ovarian preantral follicles population and its correlation with weight and age in Brazilian Northeastern donkeys (*Equus asinus*)

Journal: Animal Reproduction Science

Dear Dr. Silva,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Animal Reproduction Science. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into
EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=ANIREP and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Animal Reproduction Science

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Anexo 6 - Comunicado da Submissão do 3º Artigo/Capítulo III

From: **Reproduction in Domestic**

Animals <onbehalfof+rdaoffice+wiley.com@manuscriptcentral.com>

Date: 2017-06-13 17:44 GMT-03:00

Subject: Reproduction in Domestic Animals - Manuscript ID RDA-OA-Jun-2017-0236 - Submission received

To: legio2000@yahoo.com

Cc: katia@dna.org.br, ericamila_38@hotmail.com, livia_campos86@hotmail.com, gabyliberalino@yahoo.com.br, viviane.saraiva@ufersa.edu.br, mbezerra@ufersa.edu.br, legio2000@yahoo.com

13-Jun-2017

Dear Dr. Silva

Thank you for your submitting your manuscript to Reproduction in Domestic Animals. Your manuscript entitled "Vitrification of ovarian tissue of Brazilian Northeastern breed donkey (*Equus asinus*) using different cryoprotectants" (by Lopes, Kátia Regina; Praxedes, Erica Camila; Campos, Livia; Lima, Gabriela; Saraiva, Márcia Viviane; bezerra, marcelo; Silva, Alexandre), has been successfully submitted online and is presently processed for review by members of our Editorial team.

Your manuscript was assigned the following ID: (RDA-OA-Jun-2017-0236). Please mention this ID number in all correspondence with the Reproduction in Domestic Animals Editorial Office. You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/rda>.

As soon as the review of this manuscript is completed we will communicate to you the Editor's decision.

Thank you for submitting your manuscript to Reproduction in Domestic Animals.

Sincerely,

Lorraine Quiambao

Reproduction in Domestic Animals

E-mail: rdaoffice@wiley.com