



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA
POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ
ANTRAIS DE CATETOS (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**

GABRIELA LIBERALINO LIMA

Médica Veterinária

MOSSORÓ – RN
2011

GABRIELA LIBERALINO LIMA

**CARACTERIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA
POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ
ANTRAIS DE CATETOS (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva

MOSSORÓ-RN
2011

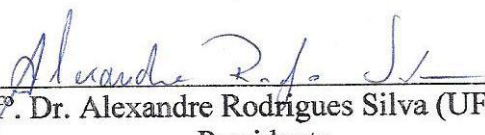
GABRIELA LIBERALINO LIMA

**CARACTERIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA
POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ ANTRAIS DE
CATETOS (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural
do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró,
como parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA


Prof.^o Dr. Alexandre Rodrigues Silva (UFERSA)
Presidente


Prof.^o Dr. José Domingues Fontenele - Neto (UFERSA)
Primeiro Membro


Prof.^a Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues (UECE)
Segundo Membro

MOSSORÓ – RN
2011

Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA

S732c Lima, Gabriela Liberalino.

Caracterização e conservação da população de Folículos Ovarianos pré antrais de catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758). / Gabriela Liberalino Lima. -- Mossoró: 2011.

132f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal. Área de Concentração: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Programa de Pós Graduação.

Orientador(a): Profº. Dr. Sc. Alexandre Rodrigues Silva

1. *Tayassu tajacu*. 2.Folículos pré antrais. 3.População folicular. 4.Refrigeração. Título.

CDD:636.9734

Bibliotecária: Marilene Santos de Araújo
CRB-5/1033

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIELA LIBERALINO LIMA – Nascida no Município de Mossoró-RN no dia 08.11.1985, filha de Genildo Eufrázio de Lima e Catarina Lúcia Liberalino, concluiu o Ensino Médio e Fundamental no Colégio Mater Christi. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2008.2, onde foi bolsista de PIBIC pelo período de um ano. Durante a graduação desenvolveu trabalhos com tecnologia de sêmen nas diferentes espécies domésticas e silvestres, bem como manipulação de folículos ovarianos pré antrais em espécies domésticas. Em janeiro 2009 foi selecionada pelo Programa em Pós- Graduação em Ciência Animal pela UFERSA. Durante o período do mestrado, foi colaboradora nas disciplinas de Reprodução Animal e Inseminação Artificial do curso de Zootecnia, Fisiopatologia da Reprodução e Ginecologia e Obstetrícia Veterinária do curso de medicina veterinária ambos na UFERSA.

À minha família, a qual foi base para
que eu pudesse alcançar todas as
minhas conquistas

E a todos os animais vítimas do
egoísmo e da crueldade dos homens

Dedico

“E nossa história
não estará pelo avesso assim
sem final feliz,
teremos coisas bonitas pra contar,
e até lá vamos viver,
temos muito ainda por fazer,
não olhe pra trás,
apenas começamos,
o mundo começa agora,
apenas começamos”

Legião Urbana

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meus caminhos, permitindo que eu chegasse até aqui.

A minha família, por ter me ensinado os verdadeiros valores da vida e ter me guiado sempre pelo melhor caminho, mostrando que nem sempre este é o mais fácil.

Especialmente a minha mãe, Catarina Lúcia Liberalino, pelo amor, dedicação e paciência não só nestes últimos cinco anos, mas durante toda minha vida. Por ter exercido inúmeras vezes o papel de mãe, pai e amiga, contribuindo para a vitória em mais uma de várias batalhas da minha vida, dedico minha profunda gratidão e meu amor.

Ao meu pai, Genildo Eufrázio de Lima, pelo amor e por me mostrar que a vida é cheia de obstáculos e que mesmo não estando preparados para os mesmos devemos tentar ultrapassá-los.

Aos meus irmãos, Fernando Liberalino Fernandes, Amanda Danielly Lima e Silva e Jemima Queren Lima e Silva, pelo amor e amizade que me deram forças para chegar até aqui.

Ao meu avô, João Liberalino Neto (*in memorian*), por ter me apoiado tantas vezes ao longo dessa caminhada. Por me ensinar a ter humildade e dedicação em tudo na vida. Apesar de não estar presente fisicamente, sua lembrança será constante.

A minha avó, Ilda Martins Liberalino, pela atenção e pelo amor dedicado durante todos esses anos. Pelo apoio e exemplo de fé e dedicação como avó e mãe, eu agradeço.

A todos os meus outros familiares, especialmente a tia Francisca Nazaré Liberalino, a tia Gilda e Dayanne por ter fornecido uma base forte na qual pude me apoiar para conseguir chegar a esta nova fase da minha vida.

Ao meu esposo Gleison de Moraes Lima, pela calma paciência de todos os momentos, principalmente daqueles em que eu achava que tudo ia dar errado e perdia o controle, pela dedicação e principalmente pelo amor, eu te amo muito.

Ao meu professor e orientador, Dr. Alexandre Rodrigues Silva, pelo exemplo de dedicação e amor à pesquisa científica que tem me mostrado desde 2006, quando me integrei a sua equipe. Agradeço pela oportunidade proporcionada, não só de ingressar na iniciação científica, mas de poder ser orientada por alguém tão competente e responsável. Pela confiança e pelo apoio que me foi dado durante este período e por me permitir mostrar que sou capaz. Agradeço todos os puxões de orelha merecidos, pois sem sua orientação eu não teria conseguido nada disso. Não tenho palavras para expressar minha profunda gratidão, respeito e honra de ter recebido sua orientação.

Ao Dr. José Ricardo de Figueiredo e sua equipe (LAMOFOPA-UECE), por terem me recebido tão bem durante meu estágio, por me proporcionarem o conhecimento em mais uma das inúmeras áreas da Reprodução Animal, meus agradecimentos.

A prof^a Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues e à equipe da criopreservação do LAMOFOPA, por terem me orientado e me ajudado durante a execução do experimento.

A todos os integrantes do LAMOFOPA, em especial a Dra Ticiania, Dra Ana Kelen, Msc Valdevane, Msc Valesca, Anelise, Rebecca, Laritza e Patrícia, por toda ajuda e pela amizade em todos os momentos, meus sinceros agradecimentos.

A equipe do laboratório de Anatomia e do ICB da USP pela ajuda, em especial a Diogo Manuel L. P. Cavalcanti por todo o auxílio, pela disposição em ajudar sempre que precisei.

A todos os professores que contribuíram para que eu alcançasse este objetivo, em especial ao Dr. Moacir Franco de Oliveira, ao Dr. José Domingues Fontenele Neto, a Dra. Maria Angélica Miglino, a Dra. Rose Eli Graci Ricci, ao Dr. Émer Suavinho Ferro, os quais me ajudaram diretamente na execução dos meus experimentos, meu profundo agradecimento. Bem como ao Msc. Bruno Rodrigo Simão pela grande ajuda na estatística do trabalho.

Aos funcionários do CEMAS – UFERSA pelo enorme auxílio no manejo dos animais utilizados no experimento.

A equipe do Laboratório de Histologia Veterinária da UFERSA, pela ajuda oferecida em todas as horas que precisei.

A equipe (família) do LCGA – UFERSA, pelo exemplo do que é realmente o trabalho em equipe, por toda a colaboração na vida profissional e pessoal oferecidas, vocês são uma verdadeira família.

A todos os meus amigos que estavam presentes em todas as etapas dessa caminhada, que sempre me apoiaram em todos os momentos e nunca me deixaram desistir. Especialmente a Alice, Carla Monadeli Filgueira Rodrigues, Fabrícia Geovânea Fernandes Filgueira, Geyanna Lopes Nunes, Isabella de Oliveira Barros, Leíse Gomes Fernandes e Maíra Conceição J. de Souza Lima, por terem sido uma verdadeira família durante todo esse tempo, agradeço todos os dias por esse presente maravilhoso que a vida me deu. Por poder compartilhar momentos da vida com pessoas tão especiais, as quais sempre estarão em meu coração, independente de tudo o que aconteça daqui pra frente.

A UFERSA e a todos os seus professores e funcionários, pela acolhida e ensinamentos passados.

Ao CNPq pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

Aos componentes da banca por terem aceitado o convite de participarem deste momento tão importante da minha vida.

Aos animais, por ensinarem todos os dias lições de vida. Pelo amor incondicional oferecido, pela sinceridade, pelo exemplo de respeito à natureza e por me

fazerem ver a cada dia como nós, humanos, ainda temos o que aprender. Sem eles nada disso teria sentido.

Meus sinceros agradecimentos.

CARACTERIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ ANTRAIS DE CATETOS (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)

LIMA, G. L. **Caracterização e conservação da população folicular ovariana de catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**. 2011. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Produção e Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi – Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2011.

RESUMO – Foram realizados a estimativa da população folicular ovariana de catetos, e ainda a refrigeração dos mesmos utilizando PBS ou ACP por curtos períodos. Os pares de ovários de 6 catetos foram coletados. Metade de um dos ovários foi destinada a estimativa e caracterização da população folicular, sendo imediatamente submetida ao processamento para histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão (MET). O outro ovário foi dividido em 9 fragmentos e um deles foi imediatamente destinado à histologia, os demais foram colocados em tubos com solução salina fosfatada tamponada (PBS) ou em solução à base de água de coco em pó (ACP) e acondicionados em caixas isotérmicas de 5L. As caixas foram lacradas e abertas 4h, 12h, 24h e 36h após, e os fragmentos ovarianos foram submetidos à histologia e processamento para MET. A temperatura das caixas e o pH do meio foram aferidos. Um total de 33273.45 ± 3019.30 folículos pré antrais (FOPA) foram estimados para a população em cada ovário. A maioria dos FOPA apresentava-se como morfolologicamente normal (94.4%) e apenas poucos deles eram atrésicos (5.6%). Na análise histológica, uma grande quantidade de gotas de lipídios foi observada no citoplasma oocitário, os quais foram confirmados através da análise ultraestrutural. Quanto à refrigeração, verificou-se que a integridade folicular foi mantida até as 4 h utilizando-se ACP. O pH dos meios de conservação permaneceu constante. Este trabalho mostra pela primeira vez a estimativa da população de FOPA do ovário, total e por categoria, e também a caracterização destes folículos em catetos (*Tayassu tajacu*). E pôde-se concluir que a ACP® pode ser utilizada como um meio alternativo para conservação de folículos pré-antrais.

Palavras-Chave: *Tayassu tajacu*, folículos Pré Antrais, população folicular, refrigeração, ACP.

**CHARACTERIZATION AND CONSERVATION OF THE OVARIAN
PREANTRAL FOLLICLES' POPULATION OF COLLARED PECCARIES
(*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**

LIMA, G. L. **Characterization and conservation of the ovarian preantral follicles' population of collared peccaries (*tayassu tajacu*, linnaeus, 1758).** 2011. 130 f. Thesis (Master's degree In Animal Science: Animal Production and Reproduction) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2011.

ABSTRACT – It were done the estimative of the follicular population of the collared peccaries' ovaries and the short term preservation of it using PBS or ACP. Pair of ovaries from 6 females were collected. A half of one ovary was designated to the estimative and characterization of the follicle population, and it was immediately submitted to histology and transmission electron microscopy (TEM). The other ovary was divided into 9 fragments and one of it was immediately submitted to histology procedures, the other fragments were stored either in phosphate-buffered saline (PBS; control group) or ACP medium in isothermal Styrofoam boxes containing biological ice packs. The boxes were sealed and opened only after 12, 24, or 36 h. After opening each box, the ovarian fragments were submitted to histological analysis and TEM. The temperature into the boxes and pH of the medium were checked. A total of 33273.45 ± 3019.30 preantral follicles (PF) were estimated for each ovary. Most of them was morphologically normal (94.4%) and just a few was atretic (5.6%). At histological analysis, a lot of lipids droplets was observed at oocyte cytoplasm, which was confirmed by TEM. About short term storage, it was observed that the follicular integrity was kept until 4 h, using ACP medium. The medium pH was kept constant. This work shows, for the first time, the estimative of the PF population of the ovary, totally and in each follicle category, and it's characterization in collared peccaries (*Tayassu tajacu*). It could be concluded that the ACP medium may be used as an alternative medium for the short term preservation of PF in that specie.

Key Words: *Tayassu tajacu*, Preantral follicles, follicular population, short term preservation, ACP medium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
EMBRAPA	Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
m	metro
Kg	quilograma
mm ³	milímetro cúbico
LAMOFOPA	Laboratório de Manipulação de Folículos Ovarianos Pré Antrais
µm	micrômetros
ATP	Adenosina trifosfato
Na ⁺	íon sódio
K ⁺	íon potássio
Ca ⁺⁺	íon cálcio
Mg ⁺⁺	íon magnésio
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré antrais
FOPA	folículos pré antrais
°C	graus Celsius

h	hora
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
pH	Potencial hidrogeniônico
ACP	Água de coco em pó
®	marca registrada
IAA	ácido 3-indol-acético
µg	microgramas
mL	mililitro
MET	microscopia eletrônica de transmissão
UECE	Universidade Estadual do Ceará
Nº	número
M	molar
nm	nanômetro
ANOVA	análise de variância
P	probabilidade
<	menor que
g	grama
mm	milímetro
M-II	metáfase II da meiose
s	segundos

mOsmol	miliosmol
L	litro
cm ³	centímetro cúbico
μL	microlitros
min	minutos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da água de coco anão maduro	42
Tabela 2: População de folículos pré antrais dos ovários (Média $\pm$ erro padrão) de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>) em diferentes categorias foliculares.....	74
Tabela 3: Diâmetros do folículo, oócito e núcleo em cada categoria folicular (Média $\pm$ erro padrão) de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>).....	75
Tabela 4: Valores médios da percentagem (normal/total) de folículos pré antrais morfológicamente normais de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>) preservados sob refrigeração em solução salina fosfatada tamponada (PBS) ou em meio à base de água de coco em pó (ACP) por até 36h.....	95
Tabela 5: Média dos valores ($\pm$ Erro Padrão) para temperatura ambiente e no interior das caixas isotérmicas durante a conservação de folículos pré antrais de catetos por até 36h.....	97
Tabela 6: Valores médios da percentagem (viáveis/total) de folículos pré antrais viáveis de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>) preservados sob refrigeração em solução salina fosfatada tamponada (PBS) ou em meio à base de água de coco em pó (ACP) por até 24h.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Animais do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS.....	21
Figura 2: Exemplar do cateto (<i>Tayassu tajacu</i>) adulto.....	23
Figura 3: Exemplares de filhotes de cateto (<i>Tayassu tajacu</i>).....	24
Figura 4: Folículo primordial (caprino) G – células da granulosa.....	28
Figura 5: Folículo primário (caprino). G – células da granulosa.....	28
Figura 6: Folículo secundário (<i>Tayassu tajacu</i>).....	29
Figura 7: Folículo pluriovular (<i>Tayassu tajacu</i>).....	30
Figura 8: Folículos em atresia. (A) Seta mostrando picnose nuclear. (B) Cabeça de seta.....	32
Figura 9: <i>Tissue chopper</i>	37
Figura 10: Folículo isolado (caprino).....	38
Figura 11: Caixa isotérmica de poliestireno expandido.....	40
Figura 12: Água de coco em pó, padronizada para conservação de ovário de cateto (<i>Tayassu tajacu</i>).....	41
Figura 13: (A) Microscópio de Luz. (B) Fotomicrografia de folículo primordial caprino sob microscopia de luz.....	45
Figura 14: Micrótomo.....	46
Figura 15: (A) Microscópio Eletrônico de Transmissão. (B) micrografia de folículo de cateto (<i>Tayassu tajacu</i>) sob microscopia eletrônica de transmissão.....	47
Figura 16: Avaliação da viabilidade de folículos caninos utilizando teste com Azul de Trypan. (A) folículo viável (não corado). (B) folículo não viável (corado).	48
Figura 17: Ovário de cateto (<i>Tayassu tajacu</i>) mostrando dois corpos lúteos (setas).....	72
Figura 18: Análise histológica de ovário de <i>Tayassu tacaju</i> . Epitélio germinativo (seta), túnica albugínea (TA), estroma (S) e folículos (setas cheias).....	72

Figura 19: Características histológicas de folículos pré antrais de cateto (<i>Tayassu tajacu</i>).....	73
Figura 20: Folículos morfológicamente normais (setas) exibindo núcleo excêntrico e citoplasma uniforme. Células da granulosa sem núcleo picnótico estão bem organizadas em camadas circundando o oócito.....	74
Figura 21: folículos degenerados exibindo retração do ooplasma e desorganização das células da granulosa (A) e núcleo oocitário picnótico (B).....	75
Figura 22: Micrografias eletrônicas de folículos de <i>Tayassu tajacu</i>	76
Figura 23: Micrografia eletrônica de folículo de <i>Tayassu tajacu</i> mostrando o núcleo oocitário.....	76
Figura 24: Micrografia eletrônica de folículo de <i>Tayassu tajacu</i> mostrando complexo de Golgi e cristalóides.....	77
Figura 25: Delineamento experimental: pares de ovários de catetos (n = 6) foram divididos em nove fragmentos, um deles foi selecionado como grupo controle enquanto os demais foram acondicionados em tubos contendo PBS ou ACP por 4, 12, 24 ou 36 h. Os fragmentos foram subsequentemente destinados a análise morfológica (histológica e ultraestrutural).....	91
Figura 26: Características histológicas de fragmentos de ovário de cateto (<i>Tayassu tajacu</i>) preservados por curtos períodos sob refrigeração.....	95
Figura 27: Micrografia eletrônica de folículo pré antral de cateto, conservado em meio à base de ACP® por até 4h.....	96

SUMÁRIO

	Página
1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1.1 ESTADO ATUAL DO CATETO NO BRASIL.....	22
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
1.2.1 A espécie <i>Tayassu tajacu</i>	22
1.2.2 População folicular e atresia.....	27
1.2.3 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais –	34
MOIFOPA.....	
1.2.4 Isolamento de folículos pré-antrais.....	36
1.2.5 Conservação de ovários por curtos períodos – resfriamento.....	38
1.2.6 Métodos para avaliação da qualidade dos folículos.....	43
1.2.7 Objetivos.....	48
1.2.7.1 Gerais.....	48
1.2.7.2 Específicos.....	49
1.2.8 Referências.....	49
 2 CAPÍTULO 2 - ESTIMATIVA E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	
FOLICULAR OVARIANA DE CATETOS (<i>Tayassu tajacu</i> LINNAEUS,	
1758).....	66
2.1 RESUMO.....	66
2.2 INTRODUÇÃO.....	66
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
2.3.1 Animais.....	68
2.3.2 Coleta e processamento dos ovários	68
2.3.3 Análise Histológica.....	69
2.3.4 Estimativa da população folicular.....	69
2.3.5 Análise da integridade dos folículos pré antrais.....	70
2.3.6 Análise ultraestutural.....	70
2.3.7 Análise Estatística.....	71
2.4 RESULTADOS.....	71
2.5 DISCUSSÃO.....	77
2.6. CONCLUSÕES.....	81

2.7 REFERÊNCIAS.....	81
3 CAPÍTULO 3 - CONSERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE CATETO (TAYASSU TAJACU) EM MEIOS A BASE DE SOLUÇÃO SALINA FOSFATADA TAMPONADA (PBS) OU ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP).....	87
3.1 RESUMO.....	87
3.2 INTRODUÇÃO.....	87
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
3.3.1 Animais.....	89
3.3.2 Coleta e preparação de ovários.....	90
3.3.3 Delineamento Experimental.....	90
3.3.4 Análise Histológica.....	92
3.3.5 Análise ultraestrutural dos folículos pré antrais.....	92
3.3.6 Análise da viabilidade dos folículos pré antrais.....	93
3.3.7 Análise Estatística.....	94
3.4 RESULTADOS.....	95
3.5 DISCUSSÃO.....	97
3.6 CONCLUSÕES.....	103
3.7 REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	108
ANEXO I – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “ESTIMATIVE AND CHARACTERIZATION OF THE OVARIAN FOLLICULAR POPULATION OF COLLARED PECCARIES (<i>Tayassu tajacu</i> LINNAEUS, 1758)” Á REVISTA <i>REPRODUCTION</i>	108
ANEXO II - “ESTIMATIVE AND CHARACTERIZATION OF THE OVARIAN FOLLICULAR POPULATION OF COLLARED PECCARIES (<i>Tayassu tajacu</i> LINNAEUS, 1758)”.....	109

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 ESTADO ATUAL DO CATETO NO BRASIL

A conservação da diversidade ecológica assume grande importância, não somente pelos valores intrínsecos dos seres vivos, mas também por suas implicações econômicas e sociais. Não obstante, a utilização intensiva e não sustentada destes recursos biológicos tem provocado uma perda crescente da biodiversidade mundial (LOPES; MANTOVANI, 2005). A preocupação com a perda da biodiversidade foi demonstrada pelo meio científico com o diagnóstico das regiões mais ricas e ameaçadas do planeta (MYERS et al., 2000), que foram consideradas como *hotspots* de biodiversidade. O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em megadiversidade, concorrendo com a Indonésia pelo título de nação biologicamente mais rica do nosso planeta (MITTERMEIER et al., 2005). Acolhendo cerca de 14% da biota mundial (LEWINSOHN; PRADO, 2002), ele abriga a maior diversidade de mamíferos, com mais de 530 espécies descritas. No entanto, a perda e a fragmentação de habitats, resultantes de atividades humanas, juntamente com a caça predatória constituem as maiores ameaças aos mamíferos terrestres no Brasil (COSTA et al., 2005).

O porco-do-mato ou cateto (*Tayassu tajacu*), junto com a queixada (*T. pecari*), está entre as espécies mais caçadas devido a apreciação pela sua carne e o interesse internacional pelo seu couro (BODMER et al., 1990; VEIGA et al., 1995). Em razão dessa procura, o cateto foi classificado no Anexo II da Convenção Internacional sobre o Tráfico de Espécies Silvestres (CITES), do qual o Brasil é signatário. Neste anexo, são incluídas espécies que, apesar de não estarem em perigo de extinção, podem chegar a essa condição caso continuem a caça e o comércio de forma descontrolada (DE SOUZA-MAZUREK et al., 2000; VEIGA et al., 1995).

Recentemente uma série de publicações tem ressaltado a importância do uso de estratégias alternativas de preservação da biodiversidade (CHAPIM et al., 2000). Nesse contexto, a criação legalizada de animais silvestres vem ganhando cada vez mais força. Com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, IBAMA, já existem criatórios legalizados de diversas espécies, como jacarés, pacas, tartarugas, emas e vários tipos de peixes (IBAMA, 2010) no Brasil.

Como se adapta facilmente às condições de cativeiro e por consumir alimentos produzidos regionalmente, esta é, entre as espécies silvestres brasileiras, uma das mais indicadas para serem exploradas comercialmente. Além disso, a produção de catetos pode se tornar uma solução para o aproveitamento das áreas improdutivas de propriedades rurais, uma vez que se trata de uma espécie de fácil adaptação a vários habitats (NOGUEIRA FILHO; CUNHA-NOGUEIRA; TAKECHI, 1999).

A exploração produtiva da espécie tem despertado interesse de entidades de pesquisa como a empresa brasileira de pesquisa agropecuária – EMBRAPA, na Amazônia Oriental, a qual, atualmente, desenvolve um projeto que avalia a criação de catetos em cativeiro, com a participação de populações rurais, no intuito de que estas obtenham uma produção rentável, seja para subsistência familiar ou para comercialização. Além disso, o referido projeto visa à obtenção de conhecimentos ecológicos e incentivos a população a preservar e gerenciar a biodiversidade local (ALBUQUERQUE, 2007).

No que se refere à região do semi-árido nordestino do Brasil, a Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, sediada no interior do estado do Rio Grande do Norte, apresenta potencial para a implantação de pesquisas relacionadas à exploração racional de diversos animais silvestres como animais de produção, o que possibilita, inclusive, a conservação da biodiversidade. Este potencial se deve, principalmente, à existência de um Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), registrado no IBAMA como criadouro científico sob o número 1478912, inserido nas dependências da UFERSA. Atualmente, o referido centro é constituído por uma população de, aproximadamente, 300 catetos (*Tayassu tajacu*), tendo já produzido relevantes conhecimentos no que se refere a esta espécie (Figura 1).

Contudo, poucos recursos financeiros e, principalmente o desconhecimento de aspectos biológicos básicos dessas espécies e suas relações com outras espécies animais e vegetais podem levar a um fracasso desse tipo de manejo e a um desequilíbrio ecológico perigoso (REDFORD, 1992). A função reprodutiva de uma espécie é um fator que deve ser bem compreendido, pois se torna fundamental na implantação de sistemas apropriados de manejo. Conhecimentos sobre a fisiologia reprodutiva das espécies são essenciais para um programa de criação em cativeiro, proporcionando meios para que estas populações tornem-se auto sustentáveis (MAYOR; LÓPEZ-GATIUS; LÓPEZ-BÉJAR, 2005).



Figura 1: Animais do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS.

O manejo produtivo em cativeiro do *Tayassu tajacu* não está totalmente estabelecido e, apesar de já existirem pesquisas básicas em reprodução, sanidade, comportamento e nutrição (ALBUQUERQUE et al., 2005; BARBELLA, 1993; MAUGET et al., 1997; MAYOR et al., 2006a; VENTURIERI; LE PENDU, 2006), as informações acerca da biologia reprodutiva nesta espécie são ainda escassas, e direcionadas, principalmente, aos machos (COSTA; PAULA, 2005; SOUZA et al, 2009; CASTELO et al., 2010).

Nesse sentido, o conhecimento das propriedades morfológicas e funcionais dos folículos ovarianos representa o objetivo de pesquisas recentes em muitas espécies animais. Isso ocorre porque a quantidade e a qualidade da população folicular determinam o potencial reprodutivo de uma fêmea (DOLEŽEL et al., 2004).

Haja vista a escassez de informações acerca da formação da população folicular ovariana em catetos, bem como a possibilidade da conservação do material genético oriundo das fêmeas desta espécie, justifica-se a realização do presente trabalho que se propõe a realizar uma série de estudos relacionados à manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de catetos.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 A espécie *Tayassu tajacu*

O cateto (*Tayassu tajacu*, LINNAEUS, 1758), conhecido como porco-do-mato ou caítitu, pertence ao reino *Animalia*, Filo *Chordata*, Classe *Mammalia*, ordem dos *Artiodáctilos*, subordem Suiforme, família dos *Tayassuideos* e gênero *Tayassu* (ORR, 1986). Estes animais são também conhecidos como “pecaris”, nome indígena de origem tupi-guarani, cujo significado é animal que faz muitos caminhos na mata. A palavra “tayassu” também de origem indígena significa “aquele que rói a taya” (planta com raiz succulenta) (SOWLS, 1997).

Apesar de serem semelhantes aos suínos domésticos e ao javali, os catetos não são porcos, diferindo dos mesmos em alguns aspectos, como por exemplo, presença de pré-estômagos (CAVALCANTE FILHO, 1996), vesícula biliar ausente, membros pélvicos contendo três dígitos e pela presença de uma glândula de cheiro na região dorsal próximo à cauda, cuja secreção tem odor forte e coloração esbranquiçada (SOWLS, 1984), tendo, certamente, um grande papel no reconhecimento individual e movimento do bando, porque freqüentemente esfregam o focinho nas glândulas de seus congêneres (WALLACH; BOEVER, 1983).

Eles possuem quatro dígitos no membro torácico e três no membro pélvico, orelhas e olhos pequenos, cauda muito curta, membros proporcionalmente delgados, em contraste com o corpo robusto, e dentes caninos superiores relativamente pequenos, pontudos cortantes e dirigidos para baixo (ORR, 1986). Seu focinho é alongado e termina em um disco nasal achatado e móvel. Seus pêlos são longos e ásperos, geralmente pretos com anéis brancos, o que confere aos animais uma pelagem acinzentada. Em seu dorso, existe uma crina erétil composta por pelos que tendem a ser mais escuros; na região do pescoço, destaca-se uma faixa de pelos brancos, conferindo um aspecto de colar (SOWLS, 1984). A pelagem do dorso é constituída por cerdas resistentes e que, possivelmente, funcionam como elemento de termorregulação e proteção externa, pois evitam lesões na pele quando o animal abre espaço entre a vegetação (Figura2) (FOWLER; MILLER, 2003). Entre a visão, o olfato e a audição, a visão é o sentido menos desenvolvido no cateto. Os olhos são pequenos, assim como o campo visual. O olfato é o mais desenvolvido e é usado para encontrar raízes e bulbos a uma profundidade superior a 0,5 m (SIMPSON, 1984). Cada indivíduo pode pesar até 30 Kg (SOWLS, 1997), sendo o seu peso médio de 15-28 Kg (BODMER; SOWL,

1993). Vivem aproximadamente 15 anos na natureza e em cativeiro até 24 anos. (MENA et al., 2000).



Figura 2: Exemplar do cateto (*Tayassu tajacu*) adulto.
Fonte: www.fzb.rs.gov.br/.../images/bichomescateto.jpg

O cateto ocupa uma grande variedade de habitats podendo ser encontrado do Arizona, nos Estados Unidos, à Argentina, podendo utilizar variados habitats, incluindo florestas úmidas, xerófilas e desertos (EISENBERG; REDFORD, 1999; MAYER; WETZEL, 1987). Ele é considerado onívoro, pois se alimenta de invertebrados, sementes, raízes, alimentos fibrosos, sobras de legumes, frutos e insetos (DEUSTSCH; PUGLIA, 1988). Em cativeiro, se adapta facilmente a diferentes tipos de alimentação, sendo normalmente tratado com milho, mandioca, abóbora, banana, cana-de-açúcar triturada, silagem de milho, silagem de sorgo e ração comercial de suínos (LIVA et al., 1989).

Os machos e as fêmeas são bem parecidos em tamanho e coloração dos pêlos, entretanto, os jovens possuem uma cor marrom amarelada com uma faixa preta no membro posterior (BELLATONI, 1991). A única diferença visual externa entre machos e fêmeas é a presença do escroto no macho (WALLACH et al., 1983). Os filhotes possuem pelagem mista de vermelho, marrom e creme, com faixa dorsal mais escura persistindo até um ano, mudando de tonalidade no segundo ano de vida (Figura 3) (SOWLS, 1961). A maturidade sexual nos machos é atingida aos 11 meses e a das fêmeas entre 8 e 14 meses. Durante a cópula, o cortejamento é iniciado pela fêmea. (BELLATONI, 1991).



Figura 3: Exemplares de filhotes de cateto (*Tayassu tajacu*).

Fonte : www.tolweb.org/Pecari_tajacu

As fêmeas desta espécie são descritas como poliestricas não estacionais (GOTTDENKER; BODMER, 1998; MAYOR et al., 2004), sendo capazes de se reproduzir durante todo o ano (GOTTDENKER; BODMER, 1998; HENRY et al., 1990; DA SILVA et al., 2002). Seu ciclo estral tem duração de 22.6 a 27.8 dias (SOWLS, 1997; MAUGET et al., 1997) e taxa de ovulação de 2.0-2.1 ovulações/ciclo (GOTTDENKER; BODMER, 1998; HELLGREN et al., 1995; MAYOR et al., 2004).

Estudos com esfregaços vaginais nesta espécie mostraram que o estro foi caracterizado pela predominância de células superficiais e pela proporção de células superficiais e intermediárias, maior do que 60% (MAYOR et al., 2007b). Por haver correlações positivas entre a concentração de estrógeno sérico, as mudanças no epitélio vaginal e as características da aparência vulvar no período de cio, o estro em caititus pode ser detectado com eficiência por estes métodos. Em trabalho de Mayor et al. (2007b), houve completa coincidência dos métodos avaliados em 62,5% dos estros detectados.

A receptividade sexual dura de 2 a 4 dias (MAYOR et al., 2007b; MAUGET et al., 1997; LOCHMILLER et al., 1984) e a cópula ocorre entre os dias 1 e 2 após o pico de estradiol (MAYOR et al., 2007b), no dia da cópula, a vulva se mostra avermelhada,

intumescida e com presença de muco. Após a cópula, em algumas fêmeas observa-se a presença de um tampão gelatinoso que sela a abertura vaginal.

As fêmeas de catetos podem apresentar mais de um parto por ano, sendo a produção média por fêmea de $1,03 \pm 0,73$ ninhadas por ano, com produção anual de $1,86 \pm 1,35$ recém-nascidos por fêmea por ano. Fêmeas múltiparas são mais prolíficas, com $1,40 \pm 0,5$ partos por ano e $2,47 \pm 0,99$ filhotes por ano, o que faz com que a produção média em um rebanho composto por fêmeas de diversas idades seja de 2,35 partos e 4,7 filhotes por fêmea ao ano (MAYOR et al., 2007a).

Os ovários dos catetos são completamente envoltos pela bursa ovárica. Contrário a observações nas marrãs (DYCE et al., 1987; GETTY, 1982; SCHWARZE, 1984), os folículos em crescimento não são protrusos na superfície ovariana, mas são visíveis como corpos transparentes. Mayor et al. (2006b) descreveram características dos folículos ovarianos desta espécie. Os folículos primordiais possuem uma camada simples de células da granulosa de formato pavimentoso, enquanto folículos primários exibem uma camada simples de células da granulosa de formato cuboidal. Pequenos folículos pré antrais foram caracterizados pela presença de 2-4 camadas concêntricas de células da granulosa de formato cúbico, com presença de zona pelúcida, nestes folículos já pode ser observada a teca interna, com 1-2 camadas de células fusiformes. Grandes folículos pré antrais apresentaram células da granulosa distribuídas em quatro camadas.

As células típicas do ovário nesta espécie foram bastante similares àquelas descritas nos suídeos (MOSSMAN; DUKE, 1973). Alguns autores sugerem que existem ondas foliculares envolvendo o crescimento sincrônico de um grupo de folículos, dos quais alguns serão selecionados a continuarem seu desenvolvimento. Além disso, sugere-se que estas ondas continuam ocorrendo mesmo na gestação (MAYOR et al., 2006b). Apesar destes dados, a fisiologia ovariana nesta espécie é ainda pouco estudada e informações acerca da população folicular, sob um ponto de vista qualitativo e quantitativo, são ainda inexistentes.

O corpo lúteo é ovoide e sobressai na superfície dos ovários, sendo que, em fêmeas não prenhes, pode atingir o volume de $397,1 \pm 569,3 \text{ mm}^3$, enquanto em fêmeas prenhes pode ter até $1.041,8 \pm 758,8 \text{ mm}^3$, provavelmente devido à hipertrofia das grandes células luteínicas e em função da sua produção hormonal (MAYOR et al., 2006b). Assim como foi observado em suínos domésticos (MURPHY, 2000), há duas populações distintas de células luteais: pequenas e grandes células (MAYOR et al., 2006b).

Após a concepção, o feto se relaciona com o corno uterino por meio de uma placenta epiteliocorial, corioalantoideana, difusa, pregueada e adeciuada, características de animais suiformes. O diagnóstico precoce de gestação e a predição da idade gestacional de caititus podem ser realizados por meio da ultrassonografia, com base na detecção e na mensuração de características do embrião. Normalmente são necessários 26 dias para se obter resultado seguro. A acurácia desse teste nos dias 22, 26 e 28 pós fecundação é de 56%, 93% e 100%, respectivamente (GARCIA; OHASHI, 2009).

A média da duração da gestação é de 138 ± 5 dias (MAYOR et al., 2005) e a média do tamanho da ninhada é de 1.7 a 1.9 filhotes (GOTTDENKER et al., 1998; MAYOR et al., 2005; DA SILVA et al., 2002; SOWLS, 1997). Os filhotes são precoces, podendo acompanhar a mãe no mesmo dia do nascimento, sendo que adquirem pelagem de adulto por volta dos 75 dias de vida (SANTOS, 2002).

As fêmeas lactantes desta espécie podem apresentar estro fértil logo no início do pós-parto, no dia 7 ± 1 . Isto foi confirmado por uma receptividade sexual em 45% das fêmeas no primeiro estro pós-parto, e observação de gestação em 30% (MAYOR et al., 2006b). Assim, fêmeas em lactação podem voltar a ter um ciclo fértil durante o período de sete dias pós-parto, desde que o estado nutricional da fêmea seja adequado. É relevante o aspecto nutricional, pois o balanço energético negativo e a subnutrição podem interferir na secreção de gonadotrofinas e, consequentemente, na função ovariana, com inibição da foliculogênese, como ocorre em suínos (GARCIA; OHASHI, 2009).

Estudos sobre aspectos qualitativos e quantitativos dos folículos ovarianos dos catetos ainda são inexistentes, sendo requeridos para a utilização futura dos mesmos, quer seja para fins de conservação ou de aumento da eficiência reprodutiva nesta espécie.

1.2.2 População folicular e atresia

No ovário de todas as espécies de mamíferos, o folículo é a unidade morfológica e funcional, a qual mantém o crescimento e a maturação do oócito (DURRANT et al., 1998). É constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e teca) e desempenha duas funções principais, que são interdependentes: uma endócrina (produção e liberação de hormônios esteróides e outros peptídeos) e a

outra exócrina ou gametogênica. Nesta última função, o folículo é um elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária, para assegurar o crescimento e a maturação de oócitos primários ou imaturos e, finalmente, para liberar um oócito maturado no processo de ovulação (FIGUEIREDO et al., 2008).

A população folicular do ovário é bastante heterogênea e localiza-se no córtex ovariano. De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em pré-antrais ou não cavitários e antrais ou cavitários (FIGUEIREDO et al., 2008). Os folículos são ainda classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento como primordiais, primários, secundários (HULSHOF et al., 1994), terciários e maduros. Os folículos pré antrais são assim denominados por não possuírem no se interior uma cavidade repleta de líquido folicular denominado antro e, são constituídos pelos folículos primordiais, primários e secundários. Com a intensa proliferação das células da granulosa no decorrer do desenvolvimento folicular, uma área preenchida por fluido folicular é identificada na camada granulosa e então os folículos passam a ser classificados como antrais ou cavitários. Estes últimos são constituídos pelos folículos terciários e maduros (FIGUEIREDO et al., 2008).

Vale salientar que os folículos ovarianos pré-antrais representam 90% da população de folículos pré antrais (SAUMANDE et al., 1991) sendo estes os responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário. Os folículos primordiais são os menores folículos encontrados no ovário. São os primeiros folículos formados e são originados quando uma camada de células somáticas pavimentosas conhecidas como células da pré-granulosa, originadas do tecido celômico, envolve o oócito imaturo (Figura 4) (RÜSSE, 1983; WANDJI et al., 1992). Esta camada de células da pré-granulosa é demarcada por uma membrana basal que os separa do estroma ovariano. Estes folículos localizam-se na periferia do córtex ovariano, constituindo o *pool* de reserva de folículos quiescentes e compreendem cerca de 90% de toda a população folicular presente no ovário mamífero (BECKERS et al., 1996).

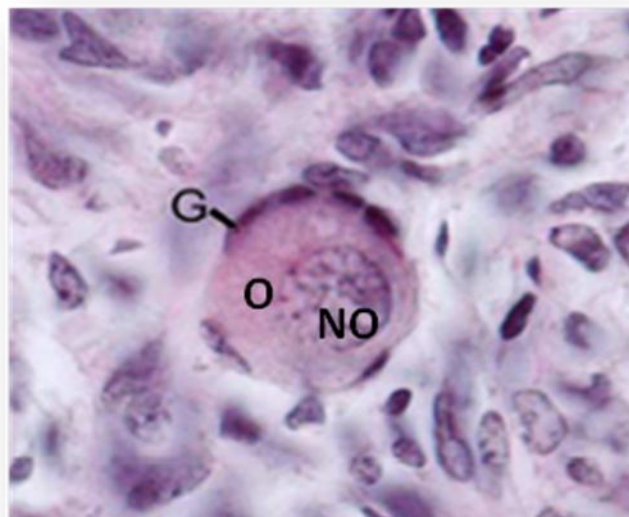


Figura 4: Folículo primordial (caprino) G – células da granulosa, O – oócito, NO – núcleo do oócito. Fonte: LAMOFOPA

Ainda na fase pré-natal, alguns folículos primordiais são ativados, havendo crescimento oocitário, multiplicação das células da granulosa e transformação da morfologia destas células da forma de pavimento para a cúbica, diferenciando-se em folículos primários. Estes caracterizam-se por possuírem um oócito imaturo central circundado por uma camada simples de células da granulosa de formato cúbico. Neste folículo as células da granulosa tornam-se mais numerosas e mais volumosas (Figura 5).



Figura 5: Folículo primário (caprino). G – células da granulosa, O – oócito, NO – núcleo do oócito. Fonte: LAMOFOPA

Os folículos secundários apresentam o oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica. Nestes folículos podem ser observadas as células da teca, as quais são recrutadas de precursores presentes no

estroma e apresentam aspecto fusiforme. Observa-se ainda nestes folículos a zona pelúcida. As proteínas que formam esta última são sintetizadas a partir da ativação dos folículos primordiais, no entanto só são claramente visíveis neste último tipo de folículo descrito (Figura 6) (FIGUEIREDO et al., 2008).

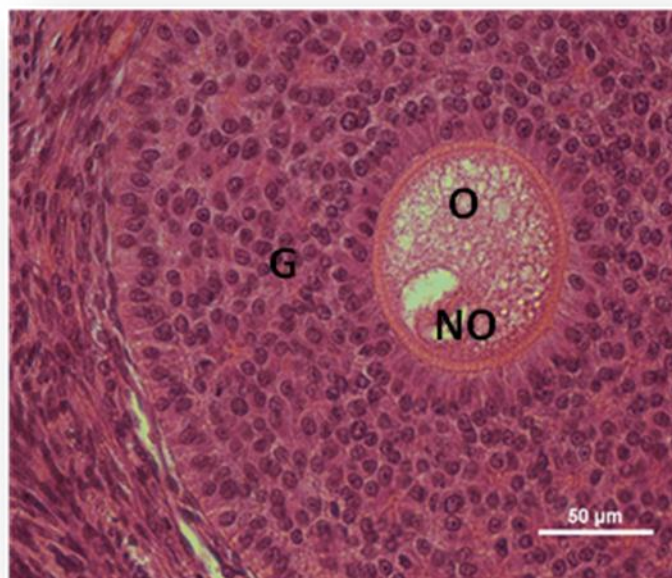


Figura 6: Folículo secundário (*Tayassu tajacu*), G – Células da granulosa, O – oócito, NO – núcleo do oócito. Fonte: Arquivo pessoal.

O diâmetro médio dos folículos varia de acordo com a espécie animal (MARTINS, 2004). Em cadelas, Lima et al. (2010) encontraram valores de 12–30 μm , 22–48 μm e 40–120 μm para folículos primordiais, primários e secundários, respectivamente. Em caprinos os valores são semelhantes, sendo estes de $20.05 \pm 0.31 \mu\text{m}$, $24.42 \pm 0.32 \mu\text{m}$ e $44.24 \pm 3.61 \mu\text{m}$ para primordiais, primários e secundários, respectivamente (LUCCI et al., 1999a). Em ovelhas, Amorim et al. (2000) apresentaram os seguintes resultados para os diâmetros foliculares: $21.5 \pm 3.1 \mu\text{m}$ para folículos primordiais, $30.3 \pm 6.1 \mu\text{m}$ para folículos primários e $85.5 \pm 15.2 \mu\text{m}$ para folículos secundários. Em bovinos os folículos primordiais medem 35.2 μm , os primários 55,1 μm e os secundários podem atingir até 200 μm (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997). Em catetos, Mayor et al. (2006) descreveram diâmetro de $20.5 \pm 3.6 \mu\text{m}$ (16.3-23.1) para folículos primordiais, $22.9 \pm 4.3 \mu\text{m}$ (19.3 – 24.2) para folículos primários e $84.6 \pm 24.2 \mu\text{m}$ (51.9-106.2) para folículos secundários.

A maioria dos folículos contém apenas um oócito, embora folículos plurióvulares tenham sido observados em outras espécies de mamíferos (Figura 7). Em

suínos, estes folículos foram descritos como grupos contendo uma camada incompleta de células da pré granulosa que circundavam “ninhos” de oócitos (GREENWALD; MOOR 1989). Os folículos pluriovulares também foram descritos em porcos da índia (ADAMS; HERTIG, 1964), vacas Zebu (LUCCI et al., 2002), cabras (LUCCI et al., 1999a), ovelhas (AMORIM et al., 2000), cadelas (LIMA et al., 2010; REYNAUD et al., 2009), gatas (LIMA, 2006) e macacas (AURICHIO, 1995).

De acordo com Rüsse (1983), na vida fetal as oogônias são encontradas lado a lado, formando grupos nas gônadas de ovelhas e cabras. Estas oogônias são acompanhadas de células somáticas as quais são, provavelmente, as precursoras das células da granulosa. A partir de dois terços da gestação tem início o isolamento dos oócitos, com o aumento do número de células somáticas. LUCCI et al. (1999a) sugerem que possivelmente este isolamento não é completo nestas espécies, o que origina os folículos pluriovulares, os quais persistem na vida pós natal. Talvez isto possa ocorrer nas outras espécies onde há presença este tipo de folículo.

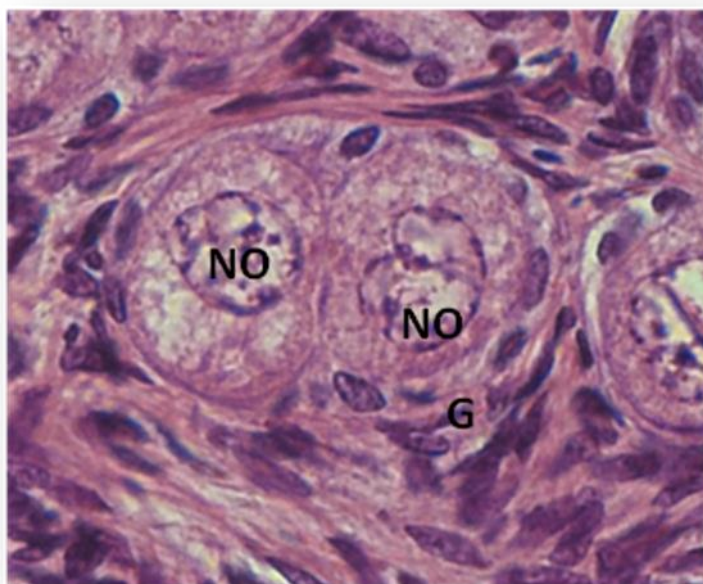


Figura 7: Folículo pluriovular (*Tayassu tajacu*). G – Células da granlosa, NO – núcleo do oócito. Fonte: Arquivo pessoal.

Em cadelas a ocorrência de folículos pluriovulares é freqüente, sua presença entre os folículos pré ovulatórios sugere que alguns deles ovulem também (REYNAUD et al., 2009), mas sua origem ainda não está elucidada. Tem sido proposto que eles podem ser oriundos de falhas do isolamento das células germinativas durante os primeiros estágios da foliculogênese, ou ainda sua taxa de desenvolvimento pode ser

mais rápida do que a diferenciação das células somáticas que os circundam, resultando na inclusão de várias células germinativas dentro de um único folículo (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006).

Embora este tipo de folículo aparente ser uma ocorrência normal em diferentes espécies de mamíferos, seu papel na fisiologia ovariana ainda permanece desconhecido (LUCCI et al., 2002).

Muitos trabalhos vêm sendo realizados no sentido de estimar a população folicular ovariana em diversas espécies mamíferas, isso porque parâmetros qualitativos e quantitativos da população folicular estão relacionados ao potencial reprodutivo das fêmeas. Adicionalmente, um conhecimento mais aprofundado sobre o desenvolvimento folicular auxilia no aumento da eficiência de biotécnicas reprodutivas (DOLEŽEL et al., 2004). Nesses estudos, tem-se constatado que a população folicular ovariana sofre grande variação individual (LIMA, 2006). Além disso, o número total de folículos varia entre as diferentes espécies, nas quais a população folicular pode ser afetada por fatores como idade, raça, níveis hormonais, status reprodutivo, nutrição e fatores genéticos (ERICKSON, 1976a; CAHILL et al., 1979; DRIANCOURT et al., 1985; ERICKSON, 1976b; ERICKSON et al., 1986; SCARAMUZZI et al., 1993).

Em macacas rhesus, BAKER (1966) estimou em aproximadamente 910.000 folículos por ovário, ao nascimento. MILLER et al. (1999) demonstraram que, em fêmeas de *Macaca nemestrina* (Pig tailed monkey), o número de folículos pré-antrais varia de 9.940 a 30.900, em animais com a idade variando de 0,85 a 12,50 anos. Já em macaco-prego (*Cebus apella*), a população foi estimada em torno de 56.000 folículos por ovário (DOMINGUES, 2000).

Em camundongas, esta população é de aproximadamente 1 500 folículos (SHAW et al., 2000), na ovelha é de 33 000 (AMORIM et al., 2000), na cabra é de 35 000 (LUCCI et al., 1999a), na mulher é de 2 000 000 (ERICKSON, 1986), em cadelas é de 500 000 folículos primordiais e primários em animais recém nascidos (DOLEŽEL et al., 2004) e em porcas é de 420 000 folículos primordiais (GOSDEN; TELFER, 1987). Em catetos, no entanto, até o presente momento, não há estudos acerca da estimativa da sua população folicular ovariana.

Como nenhum novo folículo primordial é formado após o estabelecimento de seu número, uma vez iniciado o crescimento folicular, este pode tomar dois caminhos distintos, o desenvolvimento até a ovulação, evento bastante raro (IRELAND, 1987), ou a morte folicular por atresia (ERICKSON, 1986), podendo esta ocorrer com maior

freqüência, em qualquer fase do crescimento folicular, em todas as espécies domésticas (IRELAND, 1987; FORTUNE, 1994). Ambos os fenômenos promovem uma redução ordenada, geralmente exponencial, do número de folículos pré antrais ao longo da vida reprodutiva da fêmea (SHAW et al., 2000). Apenas 0,01% dos folículos chega ao estágio de ovulação (NUTTINCK et al., 1993).

A atresia ou morte folicular é um fenômeno fisiológico, de duração desconhecida, sendo o destino da maioria dos folículos (Figura 8) (LIMA, 2006). Observações in vitro sugerem que a atresia não é um processo súbito, envolvendo a morte em conjunto de todas as células da granulosa bem como não é igualmente prevalente em todos os estágios de desenvolvimento folicular (FORTUNE, 1994), sendo predominante em folículos antrais (HIRSHFIELD, 1988).

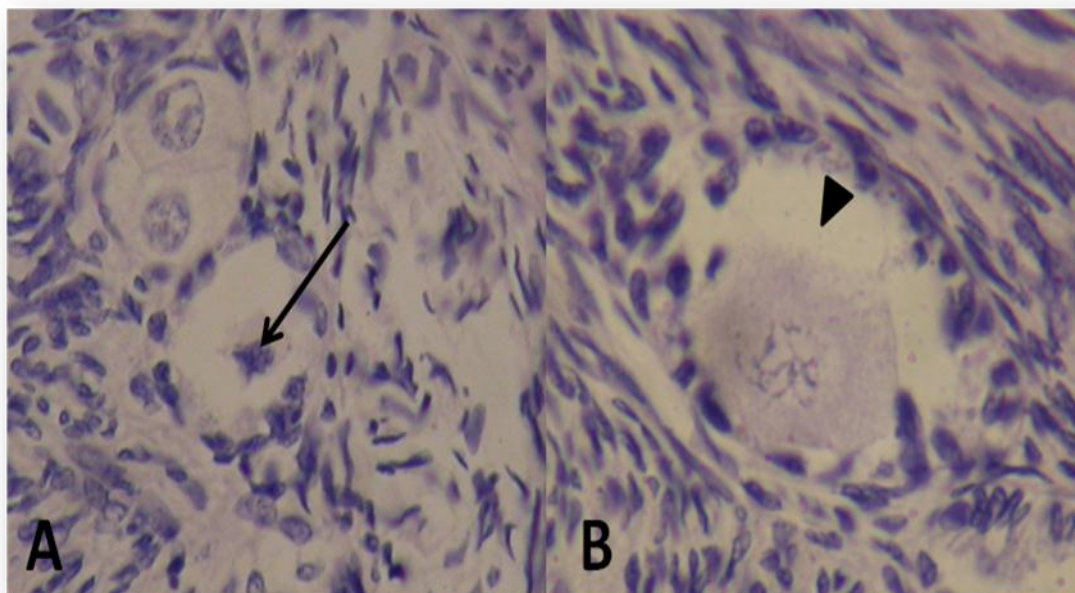


Figura 8: Folículos em atresia. (A) Seta mostrando picnose nuclear. (B) Cabeça de seta mostrando retração do citoplasma oocitário.

Fonte: LAMOFOPA modificado.

A atresia pode ocorrer por degeneração (SAUMANDE, 1991) ou apoptose (IRELAND, 1987). A degeneração é uma morte celular passiva, que ocorre após uma agressão com dano severo das membranas, induzida por fatores externos, como a ação degradativa progressiva de enzimas sobre a célula letalmente lesada, de maneira que ocorre uma degradação progressiva, com ativação da resposta imunológica. A isquemia é uma das principais causas do desencadeamento da morte celular por degeneração (FARBER, 1982). A redução da oxigenação celular durante a isquemia resulta em

diminuição da produção de ATP afetando o funcionamento da bomba de Na^+/K^+ presente na membrana celular. As mudanças na permeabilidade membranária provocam alterações nos níveis intracelulares de Na^+ , K^+ e Ca^{++} . O aumento do influxo de Na^+ para o citoplasma, que ativa a Na^+/K^+ ATPase, associado com modificações na distribuição de Ca^{++} e com aumento de água intracelular podem levar ao aumento do volume celular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (JENNINGS et al., 1975; BARROS et al., 2001). Com a evolução da degeneração, a morte celular é identificada histologicamente como necrose.

Com relação às alterações nucleares neste tipo de atresia, estas aparecem sob três padrões distintos. Primeiro ocorre diminuição da basofilia da cromatina (cariólise), uma alteração que supostamente se reflete na atividade da DNase. Um segundo padrão é a picnose, caracterizada pela retração nuclear e aumento da basofilia, quando o DNA aparentemente se condensa em uma massa sólida e basofílica. No terceiro padrão, conhecido como cariorrexe, o núcleo picnótico ou parcialmente picnótico sofre fragmentação. Com o tempo (um dia ou dois), o núcleo na célula necrótica desaparece totalmente (BRASILEIRO FILHO et al., 1993).

No tocante à apoptose, esta é altamente dependente da expressão de genes. É um processo ativo que ocorre em resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos, nos quais a célula participa de sua própria destruição, seguindo passos pré-determinados. Esse processo é controlado geneticamente e remove células danificadas, que expressam modificações em seu código genético, evitando assim a transmissão de erros, culminando com a fragmentação e fagocitose dos restos celulares, sem ocasionar uma resposta inflamatória (KERR et al., 1972).

O balanço estabelecido entre o produto dos genes pró apoptóticos e anti apoptóticos pode determinar a morte celular através deste processo (HURWITZ, ADASHI, 1992). Quando a apoptose é desencadeada ocorre um desequilíbrio iônico celular que leva a ativação de endonucleases, sendo esta ativação dependente de Ca^{++} e Mg^{++} . Esta ativação causa a fragmentação da molécula de DNA a cada 180 pares de bases nitrogenadas (HUGHES, GOROSPE, 1991; HURWITZ, ADASHI, 1992).

A primeira característica da apoptose é a condensação periférica da cromatina nuclear (HURWITZ, ADASHI, 1992). Em seguida, ocorre compactação da célula e fragmentação citoplasmática e nuclear, resultante da formação de múltiplos corpos apoptóticos (HURWITZ, ADASHI, 1992), bem como, redução do conteúdo protéico (BLONDIN et al., 1996).

Independentemente da fase na qual ocorre, e apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal, fazendo com que o potencial reprodutivo da fêmea diminua significativamente (MARTINS, 2004).

Até o momento não há estudos sobre a população folicular total, bem como acerca da percentagem de folículos morfologicamente normais na espécie *Tayassu tajacu*. Estas informações serão úteis para a aplicação futura de biotécnicas reprodutivas nesta espécie, principalmente para maturação, cultivo e fertilização *in vitro* de oócitos.

1.2.3 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA

Folículos ovarianos pré antrais representam 90% da população folicular do ovário. Métodos para a manipulação dos oócitos inclusos nestes folículos têm sido desenvolvidos em muitas espécies, como o objetivo de resgatar estes folículos do ambiente ovariano e cultivá-los *in vitro*, prevenindo-os da atresia (SILVA et al., 2000). Adicionalmente, técnicas criobiológicas têm sido recentemente empregadas na preservação destes folículos em várias espécies animais (SCHELLANDER et al., 1994; AMORIM et al., 2003). Além disso, o resgate, criopreservação e cultivo dos oócitos inclusos nestes folículos poderiam auxiliar na conservação de espécies, com o objetivo de manter a biodiversidade (LIMA et al., 2006).

Visando evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, foi desenvolvida a biotécnica de MOIFOPA. Esta biotécnica tem como objetivo resgatar os folículos pré-antrais (FOPA) do ambiente ovariano antes que eles se tornem atrésicos, conservá-los visando sua estocagem por curto (resfriamento) ou longo (criopreservação) período e cultivá-los *in vitro* até o estágio de maturação, prevenindo-os da atresia (SILVA et al., 2007).

A MOIFOPA é uma biotécnica de grande importância tanto para a pesquisa fundamental ou básica, quanto para a reprodução animal. Com relação à pesquisa fundamental, essa biotécnica contribui para a elucidação dos mecanismos implicados na foliculogênese na fase pré-antral. No tocante à reprodução animal, o isolamento de milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário e posterior cultivo *in vitro* dos oócitos neles inclusos até o estágio de maturação poderá contribuir para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção. Esse objetivo

será alcançado por meio do fornecimento de grande número de oócitos oriundos de um único animal, que seriam crescidos e maturados *in vitro* e utilizados posteriormente nas biotécnicas de fertilização *in vitro* e clonagem. O fornecimento de uma população homogênea de oócitos oriundos de um mesmo animal proporcionado pela MOIFOPA contribuirá também para a padronização de técnicas como clonagem, fertilização *in vitro* e transgenia (FIGUEIREDO et al., 2008).

A MOIFOPA apresenta ainda inúmeras outras vantagens, como aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico ou perigo de extinção, redução do intervalo entre gerações, recuperação de animais eliminados por problemas sanitários, uso de animais que não respondem a tratamentos de superovulação, obtenção de descendentes de um animal mesmo após sua morte, otimização e padronização de outras biotécnicas como a fertilização *in vitro*, tecnologia de embriões, clonagem e transgenia (SILVA et al., 2007).

Em especial para os catetos, estudos acerca da aplicação desta biotécnica são praticamente inexistentes, e poderiam contribuir tanto para a aquisição de maiores conhecimentos acerca da morfofisiologia ovariana nesta espécie, bem como para a formação de bancos de gametas femininos, os quais poderiam ser utilizados tanto objetivando a preservação de biodiversidade, como também para a manutenção e intercâmbio de material de alto valor para a produção comercial desta espécie.

A MOIFOPA consiste em: I. Isolamento e resgate de folículos pré-antrais a partir dos ovários; II. Conservação visando a estocagem por curto (resfriamento) ou longo (congelamento) período; III. Cultivo folicular que tem como finalidade bloquear a atresia, promover o crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* dos oócitos previamente incluídos em folículos ovarianos pré-antrais (FIGUEIREDO et al., 2008).

1.2.4 Isolamento de folículos pré-antrais

Como a maioria dos oócitos (cerca de 90%) presentes no ovário encontra-se incluída em FOPA (CAHILL; MAULÉON, 1981; GOUGEON et al., 1994), com o objetivo de aproveitar esta grande reserva de folículos pré-antrais presente no ovário, diversos métodos de isolamento e cultivo folicular *in vitro* têm sido desenvolvidos (SANTOS et al., 2004).

O isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano, através de instrumentos

mecânicos, associados ou não com os métodos químicos ou enzimáticos (FIGUEIREDO et al., 2008).

Esta recuperação folicular pode ser realizada *post mortem* ou em seguida ao processo de ovariectomia, podendo os oócitos serem recuperados até depois de 36 h a partir de ovários armazenados *ex situ* em meio fisiológico (JOHNSTON et al., 1991), ou ainda por punção folicular via laparoscopia. Antes de proceder a laparoscopia, faz-se um tratamento hormonal para induzir a atividade dos ovários, tendo sido obtido êxito em tigres (DONOGHUE et al., 1990), suçuarana (BARONE et al., 1994) e jaguatirica (SWANSON et al., 1995). No entanto, tratamentos consecutivos com eCG/hCG podem diminuir progressivamente a sensibilidade dos ovários devido à formação de imunoglobulinas que as neutralizam (SWANSON et al., 1995).

Utilizando procedimentos mecânicos foi possível a realização de isolamento de folículos em diversas espécies. Em bovinos foram obtidos 70075 folículos (FIGUEIREDO et al., 2008). Em felinos, Jewgenow e Stolte (1996) conseguiram isolar 2892 folículos, estes mesmos autores adaptaram para as espécies felídeas não-domésticas os métodos descritos para o gato doméstico, e realizaram o isolamento e a caracterização ultraestrutural de folículos pré antrais oriundos de guepardos (*Acinonyx jubatus*), onça pintada (*Panthera onca*), leões (*Panthera leo*) e tigres de Sumatra (*Panthera tigris sumatrae*), Siberianos (*Panthera tigris altaica*) e de Bengala (*Panthera tigris tigris*) que haviam morrido em zoológicos locais. Esses autores constataram a similaridade entre os folículos pré antrais dos felinos domésticos e não-domésticos (LIMA, 2006). Posteriormente, Jewgenow et al. (1997) recuperaram uma média de 1867 ± 1144 folículos pré antrais por ovário de várias espécies de felinos não-domésticos.

Em ovinos e caprinos foram obtidos 6368 (AMORIM et al., 2000) e 9664 (LUCCI et al., 1999b) folículos, respectivamente, utilizando o método mecânico através do tissue chopper. Estes últimos autores reportaram que os folículos primordiais formaram 93.8% dos folículos totais isolados, seguido de 5.2% de folículos primários e 1.0% de folículos secundários, em caprinos. Em contraste, Hulshof et al. (1994), utilizando fórceps para o isolamento de folículos bovinos, obtiveram uma baixa percentagem de folículos primordiais isolados, 12.5%, quando comparados com primários (57.2%) e secundários (20.7%). Estes autores sugeriram que os resultados foram devido ao fato dos folículos primordiais estarem fortemente ligados a túnica albugínea do ovário.

Nos procedimentos mecânicos, os equipamentos mais comumente utilizados são o *tissue chopper*, *mixer*, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes (FIGUEIREDO et al., 2008) (Figura 9). A técnica de isolamento folicular, utilizando o método mecânico permitiu o isolamento de dezenas a milhares de folículos que poderão ser utilizados em programas de maturação e fecundação in vitro e/ou destinados à constituição de bancos de germoplasma animal (SANTOS et al., 2004) (Figura 10).

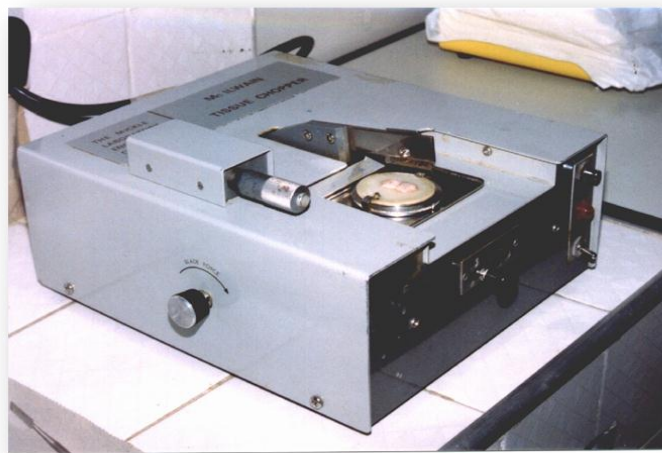


Figura 9: *Tissue chopper*.

Fonte: LAMOFOPA



Figura 10: Foliculo isolado (caprino).

No que se referem aos procedimentos enzimáticos, as enzimas proteolíticas mais utilizadas são a colagenase, a tripsina e a pronase. Os métodos enzimáticos de isolamento de folículos pré-antrais foram descritos não apenas em animais de laboratório, mas também em suínos, gatos, fetos bovinos, ovinos e humanos

(GREENWALD et al, 1989; CANDY et al., 1991a; CANDY et al., 1991b; DANIEL et al., 1989; ROY et al., 1985; NICOSIA et al., 1975; CARAMBULA et al., 1996a; CARAMBULA et al., 1996b; ROY et al., 1993).

Em suínos, o número de folículos primordiais isolados a partir da dissociação enzimática foi de 185 000 folículos por ovário (GREENWALD; MOORE, 1981), estando de acordo com o número encontrado em secções histológicas (420 000 por par de ovários) (GOSDEN; TELFER, 1987)

1.2.5 Conservação de ovários por curtos períodos - resfriamento

Os animais doadores de ovários destinados as biotécnicas ligadas à reprodução comumente encontram-se em locais distantes dos laboratórios especializados (SILVA, et al., 1999). A conservação de folículos pré-antrais de mamíferos é de grande importância para preservar os mesmos durante o transporte dos ovários do local de colheita até o laboratório, garantindo, portanto, o fornecimento de folículos pré-antrais de boa qualidade para criopreservação e/ou cultivo (FIGUEIREDO et al., 2008).

Tem sido sugerido que a preservação de gametas femininos pode ser melhor alcançada pelo armazenamento de fragmentos ovarianos, contendo inúmeros oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais (PAYNTER, 2000). Estes oócitos são menos diferenciados, possuem menor número de organelas, ausência de zona pelúcida e grânulos corticais e são menos ativos metabolicamente. Todas estas características são potencialmente benéficas ao processo de congelação e descongelação (OKTAY et al., 1997; OKTAY et al., 1998; LIU et al., 2000).

Muitos estudos têm demonstrado que a qualidade dos oócitos depende da eficiência do meio de preservação, toda temperatura e tempo de incubação durante o transporte dos ovários do local em que foi colhido até o laboratório de reprodução e que isto é um fator limitante na manutenção da qualidade folicular (MATOS et al., 2004). Adicionalmente, há uma necessidade de avaliar a efetividade dos métodos de preservação utilizados no transporte de ovários que serão criopreservados ou utilizados como fonte de folículos pré antrais para o cultivo *in vitro* (LUCCI et al., 2004b) ou de oócitos para fertilização *in vitro* (FIGUEIREDO et al., 2007).

Geralmente ovários coletados de abatedouros são utilizados como fonte de oócitos para estudos de cultivo *in vitro*. O armazenamento de ovários sem o suprimento

sanguíneo pode afetar a qualidade oocitária, influenciando o desenvolvimento extracelular em torno do oócito (WONGSRIKEAO et al., 2005). Em geral a hipotermia é aplicada para a preservação de órgãos no intuito de minimizar a taxa de energia consumida e diminuir a taxa de autólise. Durante longos períodos de armazenamento e sob isquemia, há uma rápida depleção dos estoques energéticos, resultando na acidificação do meio (SALEHI et al., 2004).

A autólise celular pode ocorrer em ovários durante um longo período de transporte a 35-38°C (HOLT et al., 1999). Contudo, tanto oócitos de animais como de humanos e embriões são muito sensíveis ao resfriamento e congelamento (MASSIP et al., 2002). O metabolismo celular diminui e proteínas específicas que promovem a maturação oocitária são suprimidas a temperaturas abaixo da temperatura corpórea. Estas proteínas são ativadas quando os oócitos são colocados em meios adequados (SMITZ et al., 2004).

As caixas isotérmicas de poliestireno expandido têm sido utilizadas amplamente como uma alternativa viável e de baixo custo para a conservação visando o transporte de sêmen (LINDE-FORSBERG, 2001, SILVA et al., 2004a) (Figura 11). Com relação à conservação de oócitos, tais caixas já foram também demonstradas como um equipamento eficiente para o transporte do material em curtos períodos (LIMA et al., 2010).



Figura 11: Caixa isotérmica de poliestireno expandido.

A utilização do tampão salina fosfato (PBS) foi descrita na conservação de ovários a 4°C a serem destinados a biotecnologias tais como cultivo *in vitro*, em diversas espécies (OTOI et al. 2000; SOLANO et al., 1994). Além disso, foi também demonstrada sua utilização na conservação *in situ* de folículos pré-antrais de caprinos e

ovinos, a 4°C por até 24h e a 20°C por 4h (ANDRADE et al., 2002; SANTOS et al., 2002b).

Silva et al. (1999) relataram que folículos ovarianos pré-antrais de caprinos podem ser conservados com sucesso no interior de ovário inteiro, metade ou fragmento de ovário mantidos em solução a base de água de coco a 4°C por até 24 h. A redução do metabolismo celular durante a conservação tem um efeito benéfico na manutenção da viabilidade folicular. A utilização deste protocolo facilita o transporte de ovários oriundos de animais de alto valor zootécnico, vivos ou mortos, até os laboratórios especializados em biotécnicas de reprodução animal, facilitando também a troca de germoplasma entre laboratório.

A água proveniente do fruto do coqueiro *Cocos nucifera* L. (membro da família Palmae) é uma solução estéril, ligeiramente ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (MARQUES, 1982) e muito pouco fosfolípídio (LAGUNA, 1996), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhes conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sangüíneo (BLUME; MARQUES Jr., 1994). A composição química da água de coco maduro, variedade anão, é mostrada na Tabela 1.

A água de coco sofre mudanças na sua composição durante o desenvolvimento do fruto. Fatores como grau de maturação, variedade, região e época do ano de produção têm influência sobre as suas características físico-químicas (MAGALHÃES et al., 2005). A fim de solucionar os problemas relacionados à estocagem e impulsionado pelos excelentes resultados obtidos com os primeiros estudos com a água de coco in natura na conservação, principalmente de células espermáticas, levou-se à elaboração do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP®). O coco é obtido numa seqüência de procedimentos iniciada pela rigorosa seleção e higienização do produto, seguida de colheita da água de coco de forma asséptica. Então, é realizada a filtração e o líquido é bombeado de forma contínua para o sistema de secagem, denominado de spray dryer. A amostra seca é transformada em pó fino e uniforme, amorfo, destituído de água livre, com alta solubilidade (NUNES et al., 2005). A uniformidade do produto, obtida mediante rigoroso controle de processamento, em condições específicas, leva à manutenção dos valores agregados do endosperma líquido do coco (NUNES et al., 2005). O pó resultante final, registrado como ACP® (ACP Biotecnologia®, Fortaleza - Ceará, Brasil), é ajustado quanto ao pH e osmolaridade a cada espécie a ser utilizado

(Figura 12). Ele deve ser reconstituído em água destilada, segundo as recomendações do fabricante.



Figura 12: Água de coco em pó, padronizada para conservação de ovário de cateto (*Tayassu tajacu*).

O ACP® foi testado com diferentes aplicações para o sêmen de diversas espécies, como: em eqüinos para a refrigeração (SAMPAIO-NETO et al., 2002), diluição para inseminação artificial em caprinos (SALGUEIRO et al., 2002) e ovinos (BRAZ et al., 2003), e também em peixes (VIEIRA et al., 2007). Em cães, para congelação com variações nos protocolos (CARDOSO, 2005; BARBOSA, 2007; MADEIRA, 2007), resfriamento a 4°C (MADEIRA et al., 2004; CARDOSO, 2006) e na inseminação artificial com sêmen a fresco (UCHOA et al., 2004) e refrigerado (UCHOA et al., 2007). Ferreira et al., (2001) demonstraram que o IAA pode ser utilizado com sucesso para conservação de folículos pré-antrais caprinos a 4° C por até 24 h.

A solução à base de água de coco foi utilizada com sucesso no cultivo de embriões murinos (BLUME et al., 1994), bem como foi eficiente para a maturação de oócitos (BLUME et al., 1997a) e cultivo de embriões bovinos (BLUME et al., 1997b). Em caprinos, a utilização de água de coco mostrou-se eficiente no cultivo *in vitro* de folículos, promovendo ativação de folículos primordiais (MARTINS et al., 2005). Também foi eficiente no cultivo *in vitro* de folículos pré antrais ovinos (ANDRADE et al., 2002).

Tabela 1: Composição da água de coco anão maduro.

1. Aminoácidos	(µg/ml)
Alanina	177,1
Aminobutírico	168,8
Arginina	16,8
Asparagina	10,4
Aspártico	5,4
Fenilalanina	10,2
Glicina	13,9
Glutâmico	78,8
Glutamina	13,4
Histidina, Metionina e Hidroxipolina	Traços
Homoserina	5,2
Leucina	31,7
Lisina	22,5
Prolina	21,6
Serina	65,8
Tirosina	3,1
Treonina	26,3
Valina	15,1
2. Açúcares	(µg/ml)
Frutose	8,9
Glicose	2,46
Sacarose	2,51
3. Vitaminas	(µg/ml)
Ácido fólico	0,003
Ácido nicotínico	0,64
Ácido pantotéico	0,52
Biotina	0,02
Tiamina e Piridoxina	0,01
4. Minerais	(µg/ml)
Cálcio	Traços
Cloro	183,0
Cobre	0,04
Enxofre	24,0
Ferro	0,10
Fósforo	37,0
Magnésio	30,0
Potássio	312,0
Sódio	105,0

Fonte: (NUNES; COMBARNOUS, 1995)

Seu uso também foi demonstrado na preservação de folículos pré antrais caprinos (SILVA et al., 2000), ovinos (ANDRADE et al., 2001) e bovinos (LUCCI et al., 2004).

Recentemente a solução à base de água de coco em pó foi utilizada com sucesso na conservação de folículos pré antrais de cadela por até 24 horas, sob baixas temperaturas (LIMA et al., 2010).

Estudos a respeito da utilização da água de coco em pó na conservação de oócitos em outras espécies como o cateto são de grande importância, uma vez que poderia consistir em uma alternativa na conservação de gametas por períodos diversos, possibilitando o intercâmbio de material genético entre regiões distantes.

1.2.6 Métodos para avaliação da qualidade dos folículos

Atualmente não existem critérios bem definidos para avaliar a eficiência dos procedimentos de refrigeração ou criopreservação. Entretanto, de acordo com a estrutura, há vários parâmetros que podem ser utilizados para auxiliar na análise dos protocolos empregados (LIMA, 2006). Várias técnicas são disponíveis para avaliar a morfologia e a ultra-estrutura dos folículos ovarianos pré-antrais (MATOS et al., 2007).

Uma vez que os oócitos maduros são muito sensíveis à baixas temperaturas, análises mais acuradas das suas características citológicas devem ser realizadas. Para analisar as alterações ocorridas na cromatina, tubulina e actina dos oócitos mantidos em baixas temperaturas, O'NEIL et al. (1997) utilizaram microscopia de fluorescência e de contraste de fase. Além disso tem sido utilizada a microscopia confocal para avaliação da viabilidade folicular (BARRET; SHEA; WOODRUFF, 2010; REYNOUD et al., 2009; BOISO et al., 2002). Entretanto, para uma análise mais precisa, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) tem sido empregada com sucesso no intuito de identificar mudanças ultraestruturais ocorridas (FUKU et al., 1995). No entanto, o método mais largamente empregado para avaliar os protocolos de refrigeração e/ou criopreservação dos oócitos maduros tem sido a fecundação *in vitro* e cultivo de embriões (FUKU et al., 1992, GEORGE et al., 1994).

Para os procedimentos de criopreservação de tecido ovariano, a avaliação dos oócitos imaturos tem sido realizada principalmente utilizando-se a histologia clássica (HOVATTA et al., 1996) e o transplante autólogo e heterólogo (CORTVRINDT et al.,

1996). Muitos trabalhos empregam ambas as metodologias, uma vez que visam o reimplante do tecido após criopreservação (NEWTON et al., 1996; SALLE et al., 1998; BAIRD et al., 1999). A histologia clássica e a MET possibilitam resultados mais imediatos no que diz respeito a avaliação da integridade morfológica dos folículos, no entanto, somente o transplante ou o cultivo *in vitro* permite a avaliação da viabilidade dos oócitos submetidos a protocolos de baixas temperaturas (MATOS et al., 2007).

A histologia é um método clássico que avalia a morfologia do citoplasma e do núcleo. É uma técnica importante por permitir a análise da integridade morfológica do oócito e das células da granulosa. Entretanto, essa técnica não permite avaliar a integridade das organelas citoplasmáticas. Para procedimentos de criopreservação, Gosden (2000) observou que a histologia clássica é relativamente pouco precisa se realizada imediatamente após a descongelação do tecido ovariano, pois algumas alterações das organelas podem se manifestar somente algumas horas após este processo. Por outro lado, ela apresenta uma grande vantagem, que é a de possibilitar que um grande número de folículos seja avaliado, o que a torna uma técnica importante quando se deseja realizar uma análise quantitativa (MATOS et al., 2007) (Figura 13).

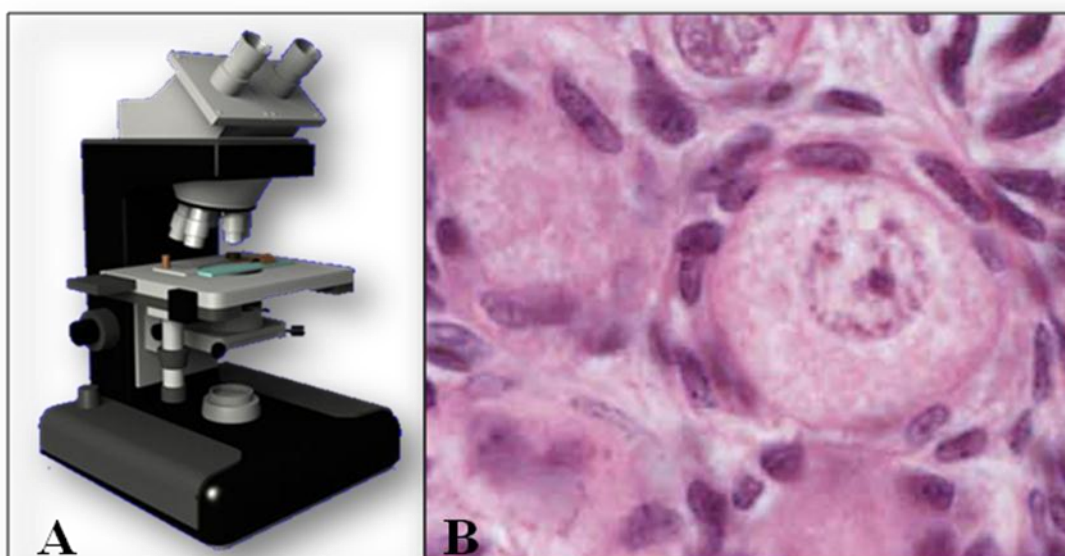


Figura 13: (A) Microscópio de Luz. (B) Fotomicrografia de folículo primordial caprino sob microscopia de luz.

A histologia pode ser realizada tanto em folículos isolados como naqueles inclusos em tecido ovariano. Estudos mostram que, na análise histológica, as alterações

indicativas de atresia em folículos pré-antrais ocorrem primariamente no oócito (JORIO et al., 1991; WOOD et al., 1997).

O processo de histologia clássica para inclusão em parafina compreende as seguintes etapas: fixação, desidratação, diafanização ou clarificação, infiltração, inclusão, microtomia e coloração das lâminas (Figura 14). Em geral, nos protocolos-padrão de histologia, os fixadores mais utilizados são: paraformaldeído a 4% (SILVA et al., 2004b, c), bouin (CUSHMAN et al., 2001; NILSSON; SKINNER, 2002) e carnoy (MATOS et al., 2004). As colorações mais comumente empregadas são: hematoxilina-eosina (HE) (VENDOLA et al., 1999; NILSSON; SKINNER, 2002) e Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina (PAS-hematoxilina) (CUSHMAN et al., 2001; SILVA et al., 2004b). Em amostras incluídas em resina há ainda a possibilidade de coloração com azul de toluidina (ABIR et al., 1997; WANDJI et al., 1996; YU; ROY, 1999) ou Giemsa (HEMAMALINI et al., 2003).



Figura 14: Micrótomo.

No tocante a microscopia eletrônica de transmissão esta é considerada uma boa técnica para avaliação das organelas celulares e das mudanças ultra-estruturais (SALEHNIA et al., 2002) ocorridas durante a atresia folicular, sendo, portanto, um método mais preciso e eficiente do que a histologia clássica para avaliar os folículos pré-antrais após o cultivo in vitro. Ao contrário da histologia clássica, a microscopia eletrônica de transmissão também é eficiente logo após a descongelação do tecido

ovariano, pois é possível detectar alterações súbitas nas organelas, tais como o aumento de volume das mitocôndrias (Figura 15) (GOSDEN, 2000). Alguns autores destacaram a importância da análise ultra-estrutural após conservação *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos, mostrando que folículos considerados normais após avaliação histológica poderiam apresentar alterações degenerativas na sua ultra-estrutura, tanto após o isolamento (LUCCI et al., 1999), como após resfriamento (SILVA et al., 2000; CARVALHO et al., 2001; LUCCI et al., 2004a; MATOS et al., 2004) e criopreservação (RODRIGUES et al., 2004; LUCCI et al., 2004b).

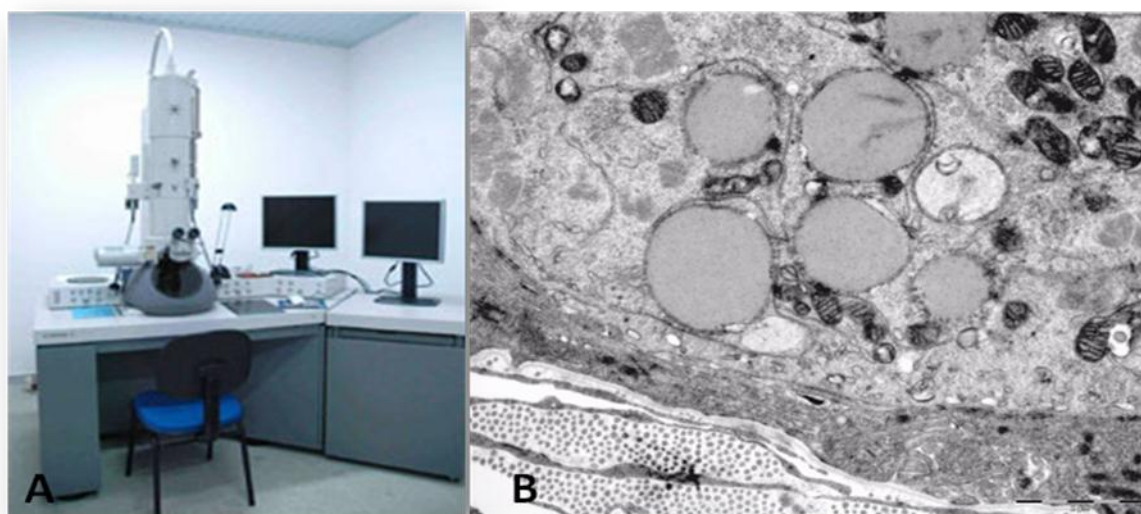


Figura 15: (A) Microscópio Eletrônico de Transmissão. (B) micrografia de folículo de cateto (*Tayassu tajacu*) sob microscopia eletrônica de transmissão.

Em cadelas esta técnica foi associada a histologia clássica para avaliação da integridade folicular de fragmentos de ovários mantidos em diferentes meios, temperatura e tempo de transporte (LOPES et al., 2009). Foram verificadas alterações ultraestruturais compatíveis com degeneração em folículos considerados normais através da histologia clássica.

No tocante à avaliação dos protocolos de resfriamento e criopreservação empregados em oócitos inclusos em folículos pré-antrais isolados, os pesquisadores têm empregado, além da histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão (OKTAY et al., 1998), para avaliação da integridade morfológica, corantes vitais, tais como o azul de Trypan (JEWGENOW; STOLT, 1996; JEWGENOW et al., 1998) e o cultivo *in vitro* (JEWGENOW; PITRA, 1993), para análise da viabilidade e crescimento folicular.

A coloração com azul de Trypan tem sido utilizada para avaliar a viabilidade de folículos isolados em diferentes espécies (felinos: JEWGENOW et al., 1998; bovinos: SAHA et al., 2000; caprinos: SANTOS et al., 2007; caninos: LOPES et al., 2009). Esse corante avalia a integridade da membrana celular. Nos folículos não viáveis, com membranas danificadas, ocorre penetração do corante, que pode ser visualizada em microscópio invertido (JEWGENOW et al., 1998), constituindo uma maneira rápida de analisar a viabilidade de folículos cultivados (Figura 16) (JEWGENOW; GORITZ, 1995).

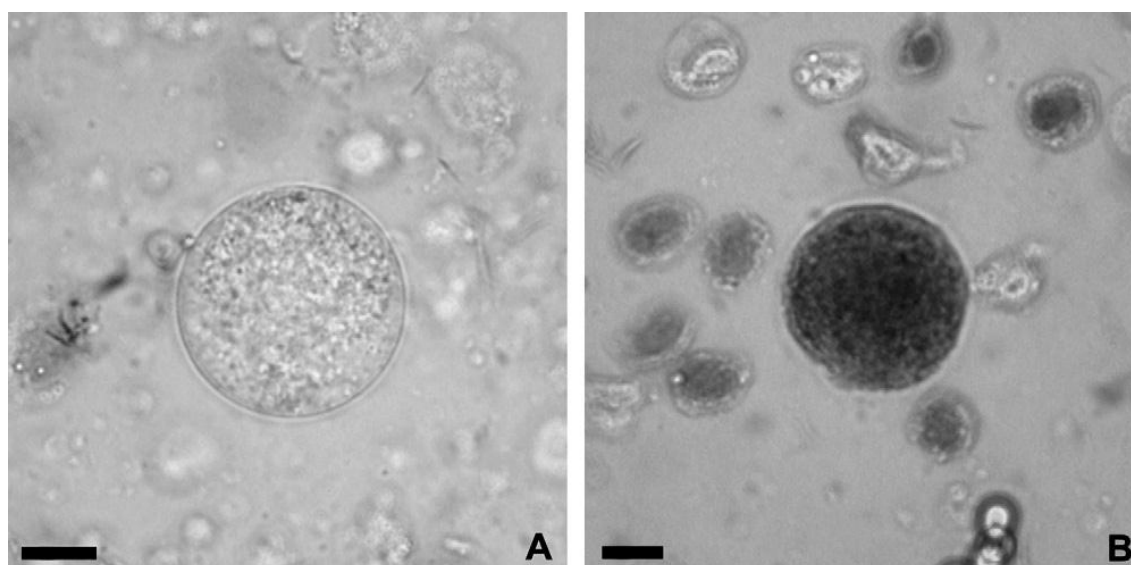


Figura 16: Avaliação da viabilidade de folículos caninos utilizando teste com Azul de Trypan. (A) folículo viável (não corado). (B) folículo não viável (corado). Barra de escala representa 10 μ m. Fonte: LOPES et al., 2009.

LOPES et al. (2009) utilizaram marcadores fluorescentes para a avaliação da viabilidade folicular em folículos de cadelas, comparando este método com o azul de Trypan e verificou que os resultados de ambos os testes foram bastante similares. Poeschmann et al. (2008) observou uma correlação significativa entre estes dois métodos para a análise da viabilidade folicular em felinos.

Nenhum estudo foi feito até o presente momento sobre a avaliação da integridade e viabilidade folicular em catetos, sendo estes estudos de grande importância para o estabelecimento de métodos complementares para avaliação da eficiência do uso de biotécnicas nesta espécie.

1.2.7 Objetivos

1.2.7.1 Gerais

Estudar a população folicular de catetos (*Tayassu tajacu*);

Conservar o material genético feminino oriundo de folículos pré-antrais de catetos (*Tayassu tajacu*).

1.2.7.2 Específicos

Caracterizar a população folicular do ovário de catetos, sob o ponto de vista quantitativo e qualitativo;

Estabelecer um protocolo eficiente para a conservação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de catetos sob resfriamento a curto prazo;

Testar o efeito do PBS e da solução a base de água de coco em pó (ACP®) como meios de conservação para folículos ovarianos pré-antrais de catetos.

1.2.8 Referências

ABIR, R.; FRANKS, S.; MOBBERLEY, M. A.; MOORE, P. A.; MARGARA, R. A.; WINSTON, R. M. L. Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. **Fertil Steril**, v.68, p.682-688, 1997.

ADAMS, E.C.; HERTIG, A.T. Studies of guinea pig oocytes. I. Electron microscopic observations on the development of cytoplasmic organdies in oocytes of primordial and primary follicles. **J Cell Biol.** v. 21. p. 397- 427, 1964.

ALBUQUERQUE, N.I.; OHASHI, O.M.; GUIMARÃES, D.A.; PENDU, Y.L.; DIAS, H. **Alternativas de sistemas de produção de catitu (*Tayassu tajacu*) para pequena agricultura na Amazônia**. Manaus: Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em [HTTP://ftp.mct.gov.br/prog/ppg7/pdf/livro107.pdf](http://ftp.mct.gov.br/prog/ppg7/pdf/livro107.pdf) Acesso em: 08 Out. 2010.

AMORIM CA, RODRIGUES APR, RONDINA D, GONÇALVES PBD, FIGUEIREDO JR, GIORGETTI A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethylsulfoxide. **Fertil Steril** n.79, p. 682–6, 2003.

AMORIM, C.A., LUCCI, C.M., RODRIGUES, A.P.R., CARVALHO, F.C.A., FIGUEIREDO, J.R., RONDINA, D., CECCHI, R., GIORGETTI, A., MARTINI, A., GONÇALVES, P.B.D. Quantitative and qualitative analysis of the efficiency of the mechanical method for the isolation preantral follicles from ovine ovaries. **Theriogenology**, v. 53, p. 1251-1262, 2000.

ANDRADE, E. R.; AMORIM, C. A.; MATOS, M. H. T. et al. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles *in situ*. **Small Rum. Res.**, v. 43, p 235-243, 2002.

ANDRADE, E. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; CARVALHO, F. C. A.; DODE, M. A. N.; FIGUEIREDO, J. R. Short term maintenance of sheep preantral follicles *in situ* in 0.9% saline and Braun-Collins solutions. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 141-143, 2001.

AURICHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis 168p, 1995.

BAKER, T. G. A quantitative and cytological study of oogenesis in the rhesus monkey. **J. Anat.** v. 100, p. 761- 766, 1966.

BAIRD, D. T.; WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; HARKNEWS, L. M.; GOSDEN, R. G. Longterm ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at - 196 °C. **Endocrinology** v. 140, p. 462-471, 1999.

BARBELLA, S.L. Determinación del ciclo estral en el báquiro de collar (*Tayassu tajacu*). **Revista da Facultad de Agronomía** (Maracay). v.19, n. 2, p. 167 - 174, 1993.

BARROS, L.F., HERMOSILLA, T. & CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 130:401-409, 2001.

BARBOSA, C. C. **Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®): Efeito da temperatura de adição do glicerol e da adição de antibiótico**. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

BARONE, M. A., WILDT, D. E., BYERS, A. P., ROELKE, M. E., GLASS, C. M., HOWARD, J. G. Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). **J. Reprod.Fertil.** v. 101, p. 103–108, 1994.

BECKERS, J.F.; DRION, P.V.; FIGUEIREDO, J. R.; GOFFIN, L.; PIROTTIN, D.; ECTORS, F.J. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 31, p. 543-548, 1996.

BELLANTONI, E. Habitat use by mule deer and collared peccaries in an urban environment. Tucson: **University of Arizona press**. v. 43, p. 2-33, 1991.

BLODIN, P., DUFOUR, M. & SIRARD, M.A. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 631-637, 1996.

BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murédeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 18, p 97-104, 1994.

BLUME, H.; VALE FILHO, V. R.; MARQUES, A. P.; SATURNINO, H. M. Avaliação da água de coco na maturação de oócitos bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 21, p. 72-75, 1997a.

BLUME, H.; VALE FILHO, V. R.; MARQUES, A. P.; SATURNINO, H. M. Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 1, p. 78-81, 1997b.

BODMER, R.E.; SOWLS, L.K. **Status survey and conservation action plan: Pigs, Peccaries and Hippos**. (Oliver, W.L.R. ed.) IUCN: Gland, Switzerland, 1993. 202p.

BODMER, R.E.; BENDAYAN, N.Y.; MOYA, L.; FANG, T.G. Manejo de ungulados en la Amazonia Peruana: Analisis de su caza y comercializacion. **Boletin de Lima**, v. 70, p. 49-56. 1990.

BOISO, I.; MARTÍ, M.; SANTALO, J.; PONSÁ, M.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. **Human Reproduction**. v. 17, p. 1885-1891, 2002.

BRASILEIRO FILHO, G., PEREIRA, F.E.L., PITTELLA, J.E.H., BAMBIRRA, E.A., BARBOSA, A.J.A. **Bogliolo - Patologia Geral**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 220 p., 1993.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on te iniciation of follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fert.**, v. 109. P. 65-171. 1997.

BRAZ, V. B.; ARAÚJO, A. A.; NUNES, J. F.; MACHADO, V. P.; MOURA, A. A. A.; OLIVEIRA, K. P. L. Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.27, n.3, p.328-329, 2003.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**. v. 66, p. 5–13, 2006.

CAHILL, L.P.; MAULÉON, P. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 61, p. 201-206, 1981.

CAHILL, L. P., MARIANA, J. C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 55, p. 27-36, 1979.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAN, D.G. Effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gels. **J. Reprod. Fert.**, v. 92, p. 197-207, 1991a.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAN, D.G. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. **J. Reprod. Fert.**, v. 93, p. 71-79, 1991 b.

CARAMBULA, S.F.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIERDO, J.R. et al. Dissociação mecânica e enzimática de ovários de fetos bovinos para o isolamento de folículos pré-antrais. **Arq. Fac. Vet. UFRGS** (Porto Alegre), v. 24, p. 235., supl., 1996a.

CARAMBULA, S.F.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIERDO, J.R. Estudo preliminares sobre o resgate de folículos pré-antrais de ovários de fetos bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS** (Porto Alegre), v. 24, p. 236, supl. 1996b.

CARDOSO, J. F. S. **Uso do diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®) para o resfriamento a 4 °C do sêmen canino**. 2006. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

CARDOSO, R.C.S. **Características in vitro do espermatozóide canino criopreservado em água de coco**. 2005. 197f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005

CARVALHO, F. C. A.; LUCCI, C. M.; SILVA, J. R. V.; ANDRADE, E. R.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of Braun-Collins and Saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. **Anim Reprod Sci**, v.66, p.195-208, 2001.

CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A. P.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology** v.74, p.1060-1065, 2010

CAVALCANTE FILHO, M. F. **Morfologia dos estômagos do queixada (*Tayassu pecari*) e do cateto (*Tayassu tajacu*) (Linnaeus, 1789)**. 1996. Dissertação (Mestrado em Anatomia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo – SP, São Paulo, 1996.

CHAPIM III, F.S., ZAVALITA, E.S., EVINER, V.T., NAYLOR, R.L., VITOUSEK, P.M., REYNOLDS, H.L., HOOPER, D.U., LAVOREL, S., SALA, O.E., HOBBIE, S.E., MACK, M.C., DIAZ, S. Consequences of changing biodiversity. **Nature** v. 504, p. 234- 242, 2000.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; van STEIRTEGHEM, A. C. A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in vitro maturation of primary mouse ovarian follicles. **Hum. Reprod.** v.11, p. 2648-2655, 1996.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Coleta e avaliação de sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*). **Biota Neotropica**, v.5, n.2, 2005.

CUSHMAN, R. A.; DE SOUZA, J. C.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J. H. Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. **Biol Reprod**, v.65, p.581-586, 2001.

DA SILVA, J.V.; CARDOSO, D.; GIMARAES, D.A.; ALBUQUERQUE, N.; LE PENDÚ, Y.; OHASHI, O. Biologia reproductive de fêmeas de catitu (*Tayassu tajacu*)

criadas em cativeiro na Amazônia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** Suppl. v. 5, p. 180-2, 2002.

DANIEL, S.A.J.; ARMSTRONG, D.T.; GORE-LANGTON, R.E. Growth and development of rat oocytes in vitro. **Gamete Research**, v. 24, p. 109-121, 1989.

DE SOUZA- MAZUREK, R.R.; PEDRINHO, T.; FELICIANO, X.; HILARIO, W.; GERONCIO, S.; MARCELO, E. Subsistence hunting among the Waimiri Atroari Indians in central Amazonia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 9, p. 579-596, 2000.

DEUSTSCH L. A., PUGLIA L. R. R. Os animais silvestres: Produção e manejo. Rio de Janeiro: **Globo**, 1988. p.69-72.

DOLEŽEL, R.; KYLIÁNKOVÁ, R.; KUMMER, V.; MAŠKOVÁ, J.; VITÁSEK, R. Follicular population and oestrogen receptor alpha in ovary of the bitch. **Acta Vet Brno**, v.73, p.37-43, 2004.

DOMINGUES, S. F. S. **Isolamento mecânico e estudo histológico de folículos ovarianos em primatas não-humanos da espécie Cebus apella (macaco-prego)**. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 83 p (Dissertação de Mestrado) 2000.

DONOGHUE, A.M., JOHNSTON, L.A., SEAL, U.S, ARMSTRONG, D.L., TILSON, R.L., WOLF, P., PETRINI, K., SIMMONS, L.G., GROSS, T., WILDT, D.E. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger *Panthera tigris*. **Biol. Reprod.** v. 43, p. 733–744, 1990.

DRIANCOURT M. A, CAHILL L. P, BINDON B. M. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. **J Reprod Fertil.** v. 73, p. 93-107, 1985.

DURRANT, B. S.; PRATT, N. C.; RUSS, K. D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, p. 917-32, 1998.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. The pelvis and reproductive organs of the pig. In: DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. Eds. **Textbook of veterinary Anatomy**. W. B. Saunders Company, Philadelphia, p. 759-767, 1987.

EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.H. **Mammals of the neotropics**. The central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. University of Chicago Press, Chicago: Illinois. 1999.

ERICKSON, B. H; REYNOLDS, R. A; MURPHREE R. L. Late effects of 60 Co gamma radiation on the bovine oocyte as reflected by oocyte survival, follicular development, and reproductive performance. **Radiat Res.** v. 68, p. 132-137, 1976a.

ERICKSON, B. H; REYNOLDS, R. A; MURPHREE, R. L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biol Reprod.** v. 15, p. 555-560, 1976b.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. In: **Seminars in Reproductive Endocrinology**, San Diego – California, p. 233-254, 1986.

FARBER, J.L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Lab. Invest.**, n. 47, p 114-123, 1982.

FERREIRA, M.A.L., BRASIL, A.F., SILVA, J.R.V., ANDRADE, E.R., RODRIGUES, A.P.R. & FIGUEIREDO, J.R. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**, v. 55, p 1607-1617, 2001.

FIGUEIREDO JR, RODRIGUES APR, AMORIM CA, SILVA JRV. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Préantrais-MOIFOPA. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF, editors. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Editora Roca; 2008. p. 303–27.

FIGUEIREDO, J. R., CELESTINO, J. J. H., RODRIGUES, A. P. R., AND 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.** 31, 143–152. 2007.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction** v. 50 p. 225-232, 1994.

FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine**. 5.ed. St. Louis: Saunders, 2003. 782p.

FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology** v. 32, p.139–156, 1995.

FUKU, E.; KOJIMA, T.; SHIOYA, Y.; MARCUS, G. J.; DOWNEY, B. R. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. **Cryobiology**. v. 29, p. 485-92, 1992.

GARCIA, A.R., OHASHI, O.M. Aspectos reprodutivos de caíaitu (Tayassu tajacu). **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.71-81, abr./jun. 2009.

GETTY, R. **The anatomy of the Domestic Animals**. W.B. Saunders Company, Philadelphia PA, 1982.

GEORGE, M. A.; JOHNSON, M. H.; HOWLETT, S. K. Assessment of the developmental potential of frozen-thawed mouse oocytes. **Hum. Reprod.**, v. 9, p.130-136, 1994.

GOSDEN R. G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Mol Cell Endocrinol**. v.163, p.125-129, 2000.

GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. **J. Zool, Lond.** v. 211, p. 169-175, 1987.

GOTTDENKER, N.; BODMER, R. Reproduction and productivity of white-lipped and collared peccaries in the Peruvian Amazon. **J. Zool.** v. 245, p. 423-430, 1998.

GOUGEON, A.; ECOCHARD, R.; THALABARD, J.C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 653-663, 1994.

GREENWALD, G.S.; MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **J. Reprod. Fert.**, v. 87, p. 561-571, 1989

HELLGREN, E.C.; SYNTZKE, D.R.; OLDELBERG, P.W.; GUTHERY, F.S. Demography of a collared peccary population in South Texas. **J. Wildlife Manag.** v. 59, p.153-163, 1995.

HEMAMALINI, N. C.; RAO, B. S.; TAMILMANI, G.; AMARNATH, D.; VAGDEVI, R.; NAIDU, K. S.; REDDY, K. K.; RAO, V. H. Influence of transforming growth factor- α , insulin like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of preantral follicles in sheep. **Small Rumin Res**, v.50, p.11-22, 2003.

HENRY, O.; DUBOST, G. Premiers resultants sur la saisonnalité de la reproduction des mammifères Guyanais. In: Gestion de l'Ecosystème Forestier et Aménagement de l'Espace Régional. Cayenne, French Guiana: **Congrès SEPANGUY**; p. 161-166, 1990.

HIRSHFIELD, A.N. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biol. Reprod.** v. 38, p. 1181-1188, 1988.

HOLT, W.V.; PICARD, A.R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Rev. Reprod.**, v. 4, p 143-150, 1999.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; KRAUSZ, T.; ABIR, R.; MARGARA, R.; TREW, G.; ASS, A.; WINSTON, R. M. L. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. **Hum. Reprod.** v.11, p.1268-1272, 1996.

HUGHES, F.M. & GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**, n. 129, p.2415-2422, 1991.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, n. 16, p. 78-80, 1994.

HURWITZ, A. & ADASHI, E.Y. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. **Mol. Cell Endoc.**, 84:19-23, 1992.

IBAMA (Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis e do Meio Ambiente). **Lista oficial de animais ameaçados de extinção.** Disponível em: [HTTP://www.ibama.gov.br/](http://www.ibama.gov.br/). Acessado em: 08 Out. 2010.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertility** v. 24, p. 39-54, 1987.

JENNINGS, R.B., GANOTE, C.E. & REIMER, K.A. Ischemic tissue injury. **Amer. J. Pathol.**, n 81, p 179-198, 1975.

JEWGENOW, K.; PENFOLD, K.L.; MEYER, H.H.D.; WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **J. Reprod. Fertil.** 112, 39–47, 1998..

JEWGENOW, K.; WOOD, T. C.; WILDT, D. E. DNA degradation in mural granulosa cells of non-and slightly atretic follicles of fresh and cold-stored domestic cat ovaries. **Mol. Reprod. Dev.**v. 48, p. 350-355, 1997.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats—viability and ultrastructural investigations. **Anim. Reprod. Sci.** v. 44, p. 183–193, 1996.

JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. **Anim Reprod Sci**, v.39, p.285-297, 1995.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**. v. 39, n. 2, p. 527-535, 1993.

JOHNSTON, L.A., DONOGHUE, A.M., O'BRIEN, S.J., WILDT, D.E. Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilization and embryo development in the domestic cat. **J. Exp. Zool.**, v. 2057, p. 350–359, 1991.

JORIO A, MARIANA JC, LAHLOU-KASSI A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. **Anim Reprod Sci**, v.26, p.239-250, 1991.

KERR, J. R. F., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer** v. 26, p. 239- 257, 1972.

LAGUNA, L.E.; NUNES, J.F. Avaliação físico-química da água de coco proveniente de frutos das variedades da praia e anão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n 21, p 156, 1997.

LEWINSOHN, T.M., PRADO P.I.. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual de conhecimento.** Ministério do Meio Ambiente (MMA), Conservação Internacional do Brasil. Editora contexto, São Paulo. 2002.

LIMA, G.L.; COSTA, L.L.M.; CAVALCANTI, D.M.L.P.; RODRIGUES, C.M.F.; FREIRE, F.A.M.; Fontenele-Neto, J.D.; Silva, A.R. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP1)-based medium. **Theriogenology** v. 74 , p. 46–152, 2010.

LIMA, A. K. F. **Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica.** 2006. 69f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

LIMA, A. K. F.; SILVA, A. R.; SANTOS, R. R.; SALES, D. M.; EVANGELISTA, A. F.; FIGUEIREDO, J. R., SILVA, L. D. M. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. **Theriogenology**. n 66, p. 1664-1666, 2006.

LINDE-FORSBERG, C. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In: CONCANNON, P.W., ENGLAND, G., VERSTEGEN, J., LINDE-FORSBERG, C. **Recent advances in Small Animal Reproduction.** New York: International Veterinary Information Service, 2001. DOI: A1209.0501.

LIU, J. VAN der ELST, J.; VAN der BROECKE, R.; DUMORTIER, F.; DHONT, M. Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and in vitro culture. **Biol. Reprod.**, v. 62, p 1218-23, 2000.

LIVA, H.; MORAES, L. F. D.; NOGUEIRA FILHO, S. L. G.; LAVORENTI, A. Aspectos da alimentação do caititu (*Tayassu tajacu*) em cativeiro. In: Congresso Paulista de Iniciação Científica, 1, 1989, Piracicaba, SP. **Anais...** Piracicaba, SP: FEALQ, 1989.

LOCHMILLER, R.L.; HELLGREN, E.D.; GRANT, W.E. Selected aspects of collared peccary *Dicotyles tajacu* reproductive biology in a captive Texas herd. **Zoo. Biol.** v. 3, p. 145-149, 1984.

LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A. P.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N. JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J.R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. **Animal Reproduction Science.** v. 115, p. 201-214 2009.

LOPES, A. L. B.; MANTOVANI, J. E. **Determinação da área de vida e do uso de habitats pela jaguatirica (*Felis pardalis*) na região nordeste do Estado de São Paulo.** Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil, 16-21 abril 2005, INPE, p.3129-3135.

LUCCI, C. M.; KACINSKIS, M. A.; RUMPF, R.; BÁO, S. N. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, v.61, p.461-472, 2004a.

LUCCI, C. M.; KACINSKIS, M. A.; LOPES, L. H. R.; RUMPF, R.; BÁO, S. N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1101–1114, 2004b.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**. v. 57, p. 1467 – 1483, 2002.

LUCCI, C.M., AMORIM, C.A., RODRIGUES, A.P.R., FIGUEIREDO, J.R., BÁO, S.N., SILVA, J.R.V., GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**. v. 56, p. 223-236, 1999a.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. D. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v.56, p.39-49, 1999b.

MADEIRA, V. L. H. **Criopreservação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP - 106®)**: efeito do tempo de equilíbrio e da taxa de descongelamento. 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

MADEIRA, V. L. H.; SILVA, L. D. M.; CARDOSO, J. F. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D.C.; CARDOSO, R. C. S.; OLIVEIRA, C. M. Uso da água de coco em pó (ACP®) como diluidor para conservação do sêmen de cães a 4°C. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA - UECE, 9, 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, UECE, 2004.

MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F. S.; MODESTA, R. C. D.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 1, p.72-77, 2005.

MARTINS, F. S.; VAN DER HURK, R.; SANTOS, R. R.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M.H. T.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; PESSOA, C.; FERREIRA, F. V. A.; FIGUEIREDO, J. R. Development of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. **Anim. Reprod.**, v.2, n.2, p.106-113, April/June, 2005.

MARTINS, F.S. **Efeito da solução à base de água de coco e do meio essencial mínimo sobre a ativação e crescimento in vitro de folículos primordiais caprinos**. 82f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2004.

MARQUES, A.L.V. Água de coco. **Informativo Socego**, n. 2, p 92, 1982.

MASSIP, A.; LEIBO, S. P. Factors influencing cryopreservation of domestic animal embryos. In: VAN SOOM, A.; BOEIJAN, M. (Eds.), **Assesment of mammalian embryo quality**. Dordrecht: Kluwer academic Publishers, 2002. p. 121-138.

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.4, p.433-442, out./dez. 2007.

MATOS, M. H. T.; ANDRADE, E. R.; LUCCHI, C. M.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, v.62, p.65-80, 2004.

MAUGET, R.; FEER, F.; HENRY, O.; DUBOST, G.; Hormonal and behavioural monitoring of ovarian cycles in peccaries. In: Proceedings of the First International Symposium on Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals, **Supplement 248 II**, Berlin, Germany, p. 145-149, 1997.

MAYER, J.J.; WETZEL, R.M. *Tayassu pecari*. **Mammalian Species**. v. 293, p. 1-7, 1987.

MAYOR P, GUIMARÃES DAA, LE PENDU Y, DA SILVA J, JORI F, LOPEZ-BEJAR M. Reproductive performance of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Anim Reprod Sci**, v.102, p.88-97, 2007a.

MAYOR, P.; GALVEZ, H.; GUIMARAES, D.A.; LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Serum estradiol-17beta, vaginal cytology and vulval appearance as predictors of estrus cyclicity in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the eastern Amazon region. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 97, p.165-174, 2007b.

MAYOR, P.; LE PENDU, Y.; GUIMARÃES, D.A.; DA SILVA, V.; TAVARES, H.L.; TELLO, M.; PEREIRA, W.; LÓPEZ-BEJAR M.; JORI, F. A health evaluation in a colony of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Research in Veterinary Science**. v. 81, p. 246-256, 2006a.

MAYOR, P.; FENECH, M.; BODMER, R.E.; LOPEZ-BEJAR, M. Ovarian features of the wild collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the northeastern Peruvian Amazon. **General and Comparative Endocrinology**. v. 147, p. 268-275, 2006b.

MAYOR, P.; LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Integrating ultrasonography within the reproductive management of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). **Theriogenology**, v. 63, p. 1832-43, 2005.

MAYOR, P.; JORI, F.; LOPEZ-BEJAR, M. Anatomicohistological characteristics of the tubular genital organs of the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from Northeast Amazon. **Anat. Histol. Embryol**. v. 33, p. 65-74, 2004.

MENA, P.V.; STALLINGS, J.R.; REGALADO, J.B.; CUEVA, R.L. The sustainability of current hunting practices by the Huaorani. In: **Hunting for sustainability in tropical forests** (J. G. Robinson e E.L. Bennett, eds.). Columbia University Press, New York. 2000, p. 57-78.

MILLER P. B., CHARLENSTON J. S., BATTAGLIA D. E., KLEIN N. A. & SOULES M. R. Morphometrics analysis of primordial follicle number in pigtailed monkey ovaries: symmetry and relationship with age. **Biology of Reproduction** v. 61, p. 553-556, 1999.

MITTERMEIER, R. A.; DA FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**. v. 1, n. 1, julho 2005.

MOSSMAN, H.W.; DUKE, K.L. **Comparative Morphology of the Mammalian Ovary**. University of Wisconsin Press, Madison, 1973.

MURPHY, B.D. Models of luteinization. **Biol. Reprod.** 63, 2–11, 2000.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** v. 403, p. 853-858, 2000.

NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A.; SHARMA, V.; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Hum. Reprod.** v. 11, p. 1487- 1491, 1996.

NICOSIA, S.V.; EVANGELISTA, I.; BATTÀ, D.K. Rabbit ovarian follicles. I- Isolation technique and characterization at different stages of development. **Boil. Reprod.**, v.13, p. 423-447, 1975.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Bio. Reprod**, v.67, p.1018-1024, 2002.

NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; CUNHA-NOGUEIRA, S.S.; TAKECHI, S.A. Estrutura social de pecaris (Mammalia, Tayassuidae) em cativeiro. **Revista de Etologia**, n. 1, p. 89-98, 1999.

NUNES, J. F., SALGUEIRO, C. C. M., GONDIM, J. M. Novos produtos com base na água de coco em pó. In: 12ª SEMANA INTERNACIONAL DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA - FRUTAL 2005, 2005, **Anais...** Fortaleza, 2005.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas funções ativas como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, 1, 1995, **Anais...** Fortaleza: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação da UECE, p. 57-63, 1995.

NUTTINCK, F., MERMILLOD, P., MASSIP, A., DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral follicles: A preliminary study. **Theriogenology** v. 39, n. 4, p. 811- 82, 1993.

O'NEIL, L.; PAYNTER, S. J.; FULLER, B. J.; SHAW, R. W. Murine oocyte cytoskeletal changes, fertilisation and embryogenic development following exposure to a vitrification solution. **Cryo-Letters** v. 18, p. 17-26, 1997.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUSBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R.G. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? **Fertility and Sterility** v. 354, p. 1-7, 1998.

OKTAY, K.; NUGENT, D.; NEWTON, H.; SALHA, O.; CHATTERJEE, P.; GOSDEN, R. G. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fert. Steril.**, v. 67, p 481-486, 1997.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, A.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v. 54, p. 535 – 542, 2000.

ORR, R.T. **Biologia dos Vertebrados**. 5. ed. San Francisco, California: Academy of Sciences, 1986. 242 p.

PAYNTER, S. J. et al. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. **Cryobiology**. v. 38, p. 301- 309. 1999.

POESCHMANN, M.; FASSBENDER, M.; LOPES, C.; DORRESTEIJN, A.; JEWGENOW, K. Viability assessment of primordial follicles of domestic cats to develop cryopreservation protocols for ovarian tissue. In:41st Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction and 33rd Mutual Conference on Veterinary and Human Reproductive Medicine. **Reprod. Domest. Anim.** v. 43, 25p. 2008.

REDFORD, K.F. The Empty Forest. **Bioscience**. v. 42, p. 412-422, 1992.

REYNAUD, K.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Follicle population, cumulus maturation, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. **Theriogenology**. v. 72, p. 1120–1131, 2009.

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; OHASHI, O. M.; FIGUEIREDO, J. R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v.61, p.1009-1024, 2004.

ROY, S.K.; TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fert. Ster.**, v.59, p. 783-790, 1993.

ROY, S.K.; GREENWALD, G.S. Na enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. **Biol. Reprod.**, v. 32, p. 203-215, 1985.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl. Anat.**, v. 24, p.77-92, 1983.

SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v.63, p.27-39, 2000.

SALEHI, P., SPRATLIN, J., CHONG, T. F., AND CHUCHILL, T. A. Beneficial effects of supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage. **Cryobiology** n. 48, p. 245–253, 2004.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. **Fertil Steril**, v.78, p.644-645, 2002.

SALLE B.; LORNAGE, J.; FRANCK, M.; ISOARD, L.; RUDIGOZ, R.C.; GUERIN, J.F. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. **Fertility and Sterility**, v. 70, p. 124-128, 1998.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K. L. P.; VIEIRA, V. E.; GONDIM, J. M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Rev. Bras. Reprod. Anim., Supl.**, n.5, p.96-98, 2002.

SAMPAIO NETO, J. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. Utilization of ACP 105® extender in the refrigeration of stallion semen. **Brazilian Journal of Animal reproduction**, v. 5, p137-139, 2002.

SANTOS, R. R.; VAN DEN HURK, R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of cryopreservation, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Anim Reprod Sci**, v.99, p.53-64, 2007.

SANTOS, R.R., RODRIGUES, A.P.R., MARTINS, F.S., MATOS, M.H.T., CELESTINO, J.J.H., FIGUEIREDO, J.R., Preservação de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes. **Ciência Animal**, n. 14, p. 7-19, 2004.

SANTOS, T.C. A **relação materno-fetal em Tayassuidae: catetos (Tayassu tajacu, Linnaeus, 1758) e queixadas (Tayassu pecari Link, 1795)**. 2002. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de cirurgia, São Paulo, 2002a.

SANTOS, R. R.; SILVA, J. R. V.; COSTA, S. H. F. et al. Effect of 0.9% saline solution and Phosphat Buffer Saline at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, p 254-259, 2002b.

SAUMANDE, J. La folliculogénèchez les ruminants. **Rec. Méd. Vét.**, n. 167, p. 205-218, 1991.

SCARAMUZZI R. J, ADAMS N. R, BAIRD D. T, CAMPBELL B. K, DOWNING J. A, FINDLAY J. K, HENDERSON K. M, MARTIN G. B, MCNATTY K. P, MCNEILLY A. S, TSONIS C. G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reprod Fertil Dev**. v. 5, n. 5, p. 459-78, 1993.

SCHELLANDER K, PELI J, SCHMOLL F, BREM G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. **Theriogenology** n. 42, p. 909–15, 1994.

SCHWARZE, C. **Compendio de Anatomia Veterinaria**. Acribia, Zaragoza, p. 277-289, 1984.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p. 59-72, 2000.

SILVA, J.R.F., CELESTINO, J.J.H., RODRIGUES, A.P.R.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**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.143-152, abr./jun. 2007.

SILVA, A. R.; MORATO, R. G.; SILVA, L. D. M. The potential of gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal Reproduction Science**, v.81, p 159-175, 2004a.

SILVA JRV, VAN DEN HURK R, COSTA SHF, ANDRADE ER, NUNES APA, FERREIRA FVA, LÔBO RNB, FIGUEIREDO JR. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Anim Reprod Sci**, v.81, p.273-286, 2004b.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1691-1704, 2004c.

SILVA, J. R. V.; LUCCI, C. M.; CARVALHO, F. C. A.; BÃO, S. N.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in situ. **Theriogenology**, v.54, p.809-822, 2000.

SILVA, J. R. V.; CARVALHO, F. C. A.; LUCCI, C. M.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. Conservação de Folículos Pré-Antrais Caprinos *In Situ* Em Solução À Base de Água de Coco. **Ciência Animal**, n. 9, p 27-36, 1999.

SIMPSON, G.G. **Tempo and Mode in Evolution**. Columbia: Columbia University Press, 1984.

SMITZ, J.; NOGUEIRA, D.; VANHOUTTE, L.; GUSTAVO de MATOS, D.; CORTVRINDT, R.N., 2004. Oocyte in vitro maturation. In: GARDNER, D.K.; WEISSMAN, A.; HOWLES, C.M.; SHOHAM, Z. (Eds.), **Textbook of Assisted Reproductive Techniques**, 2 ed. Taylor & Francis Group, London, pp. 125-161

SOLANO, R.; ARMAS. R.; PUPO, C.A. et al. Short term preservation of intrafollicular oocytes at 4° C. **Theriogenology**, v.41, p.299, 1994.

SOUZA, A.L.P.; CASTELO, T.S.; QUEIROZ, J.P.A.F.; BARROS, I.O.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. **Animal Reproduction Science**. v. 116, n. 3, p. 370 – 375, 2009.

SOWLS, L.K. **Javelines and other peccaries: Their biology, management and use**. 2. ed. Tucson, Arizona: University of Arizona Press, 1997.

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

SOWLS, L.K. Gestation period of collared peccary. **Journal of mamology**, v.42, n.3, p.425-426, 1961.

SWANSON, W.F.; HOROHOV, D.W. & GODKE, R.A. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. **Journal of Reproduction and Fertility** v. 105, p. 35-41, 1995.

UCHOA, D. C. SATZINGER, S.; AMARAL, M.C, SILVA, L.D.M. O uso de diferentes diluidores para inseminação artificial com sêmen canino refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais ...** Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007.

UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; ARAUJO, A.A.; SILVA, L.D.M. Uso da água de coco em pó (ACP 106®) na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA – UECE, 9, 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, UECE, 2004

VEIGA, J.B.; TOURRAND, J.F.; QUANZ, D. Agropecuária na Transamazônica. O caso do Município de Uruará. **Documento de Pesquisa**. Belém, PA: EMBRAPA. p. 54. 1995.

VENDOLA, K.; ZHOU, J.; WANG, J.; FAMUYIWA, O. A.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expresión and initiation of follicle development in the primate ovary. **Biol Reprod**, v.61, p.353-357, 1999.

VENTURIERI, B., LE PENDU, Y. Padrões de Atividades de Caititus (*Tayassu tajacu*) em Cativeiro. **Revista de Etologia**. v. .8, n. 1, p. 35-43, 2006.

VIEIRA, M. J. A .F.; CARVALHO, M. A. M.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ROMÃO, J. M.; VASCONCELOS, R. O.; SILVA NETO, R. O. A. R.; SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Fertilização de óvulos de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), com uso de solução à base de água de coco em pó (ACP-104) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais...** Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007, p.67.

WALLACH, J.P.; BOEVER, W.J. Diseases of Exotic Animals: Medical and surgical management. **Philadelphia, W.B. Saunders**. p.631-632, 1983.

WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; VOSS, A. K.; EPPIG, E. E.; FORTUNE, J. E. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biol Reprod**, v.55, p.942-948, 1996.

WANDJI, S.A., FORTIER, M.A. & SIRARD, M. Differential response to gonodotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 46, p.1034-1041, 1992.

WONGSRIKEAO, P., OTOI, T., KARJA, N.W. K., AGUNG, B., NII, M., AND NAGAI, T. Effects of ovary time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **J. Reprod. Dev.** n. 51, p.87-97, 2005.

WOOD TC, MONTALI RJ, WILDT DE. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Mol Reprod Dev**, v.46, p.190-200, 1997.

YU, N.; ROY, S. K. Development of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary in vitro: effect of insulin. **Biol Reprod**, v.61, p.1558-1567, 1999.

2 CAPÍTULO 2 - ESTIMATIVA E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA DE CATETOS (*Tayassu tajacu* LINNAEUS, 1758)

Estimativa e caracterização da população folicular ovariana de catetos (*Tayassu tajacu* linnaeus, 1758)

2.1 RESUMO

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi estimar a população folicular ovariana e descrever as características foliculares utilizando microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Pares de ovários foram coletados de seis fêmeas adultas de *T. tajacu*, e foram fixados para análise histológica e ultraestrutural. Um total de 33273.45 ± 3019.30 folículos pré antrais (FOPA) foram estimados para a população em cada ovário. A maioria dos folículos encontrados pertencia a categoria de primordial (91.56%), seguido de primários (6.29%) e secundários (2.15%). A maioria dos FOPA apresentava-se como morfológicamente normal (94.4%) e apenas poucos deles eram atresícos (5.6%). Na análise histológica, uma grande quantidade de gotas de lipídios foi observada no citoplasma oocitário, apresentando-se como vacúolos, os quais foram confirmados através da análise ultraestrutural. Este trabalho mostra pela primeira vez a estimativa da população de FOPA do ovário, total e por categoria, e também a caracterização destes folículos em catetos (*Tayassu tajacu*). As características gerais dos folículos primordial, primário e secundário são bastante similares às descritas para outras espécies.

Palavras chave folículos pré antrais, microscopia de luz, ultraestrutura

2.2 INTRODUÇÃO

O uso sustentável de animais silvestres adaptados a certas condições ambientais poderia contribuir para a conservação de florestas, uma vez que não seria necessário modificar o ambiente para manter estas espécies. Esta atividade poderia se constituir em uma alternativa para diversificação de produtos causando menores danos ao meio ambiente do que outras atividades pecuárias (Nogueira-Filho; Nogueira 2000). A exploração de catetos (*Tayassu tajacu*) pode promover a preservação e o manejo da

biodiversidade local. O interesse econômico por carne de animais silvestres, especialmente aquela derivada do cateto e do queixada (*T. pecari*), tem estimulado produtores a investirem em criações de cativeiro destas espécies (Santos, 2002). Além da apreciação pela sua carne, outro produto derivado do *Tayassu tajacu* bastante valorizado é a sua pele. Esta é utilizada na fabricação de luvas, cintos e correias de relógios, e tem uma demanda estável no mercado internacional. Países como Alemanha, Itália e Japão são os principais compradores (Bodmer; Pezzo, 1999).

Apesar de pertencerem a uma família separada daquela à qual pertencem os suínos domésticos (*Sus scrofa*), devido a similaridades gerais com esta espécie, muitas informações a respeito do comportamento e fisiologia reprodutivos destes últimos têm sido extrapoladas aos catetos (Mayor et al. 2006; Gottdenker e Bodmer 1998). Para a introdução da espécie em cativeiro e obtenção de resultados positivos, seja para conservação ou melhoramento genético, se faz necessário o conhecimento de sua biologia reprodutiva. Infelizmente, esta última ainda é pouco conhecida e práticas de manejo apropriadas ainda não foram desenvolvidas para esta espécie.

Entretanto, esforços consideráveis têm sido feitos para aumentar o conhecimento acerca da biologia reprodutiva dos catetos nos últimos anos (Mauget et al. 1997; Dutertre et al. 2001; Mayor et al. 2005, 2006, 2007). Além disso, estas informações são escassas e direcionadas principalmente aos machos (Costa & Paula 2005; Souza et al. 2009; Castelo et al. 2010).

O uso de biotécnicas reprodutivas, em especial no tocante à conservação de gametas, favorece a manutenção e intercâmbio de material genético de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção (Silva et al., 2004).

Nesse contexto, o conhecimento das propriedades morfológicas e funcionais dos folículos ovarianos representa o objetivo de pesquisas recentes em muitas espécies animais. Isso ocorre porque a quantidade e a qualidade da população folicular determinam o potencial reprodutivo de uma fêmea (DOLEŽEL et al., 2004).

Mayor et al. (2006) descreveram as características dos ovários desta espécie, salientando aspectos relacionados aos folículos ovarianos, tais como classificação e diâmetro, porém até o presente momento não existem informações a respeito da quantificação e qualificação da população folicular nas fêmeas de catetos (*Tayassu tajacu*), bem como taxa de atresia nesta espécie.

Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi quantificar a população folicular total e nas diferentes categorias foliculares na espécie *Tayassu tajacu*, descrever as

características dos folículos através da microscopia de luz bem como caracterizá-los ultraestruturalmente de acordo com cada categoria, assim como realizar a morfometria dos mesmos.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal da Universidade Federal Rural do Semi – Árido (UFERSA), Campus de Mossoró, no Estado do Rio Grande do Norte; bem como no Laboratório de Manipulação de Folículos Ovarianos Pré-Antrais da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará.

2.3.1 Animais

Os animais usados neste estudo foram provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-árido, localizado no nordeste do Brasil (Mossoró, RN, Brasil; 5°10'S, 37°10'O). O clima desta região é tipicamente semi árido, com uma média anual de temperatura de 27°C. O CEMAS está registrado no IBAMA como criadouro científico sob o número 1478912. Atualmente, o referido centro é constituído por uma população de, aproximadamente, 300 catetos (*Tayassu tajacu*), e um abate programado é realizado anualmente para o controle desta população. Sendo os animais destinados, então a vários experimentos.

Para o presente experimento foram utilizadas seis fêmeas com idade entre 3 – 4 anos, pesando 21.67 ± 2.08 Kg (mínimo 17.3 e máximo 24.0 Kg). O protocolo experimental e uso dos animais foram aprovados pelo comitê de ética da UFERSA, Mossoró, Brasil.

2.3.2 Coleta e processamento dos ovários

Após o abate dos animais, os pares de ovários foram assepticamente coletados. Após a remoção da bursa ovárica, os ovários foram lavados uma vez em álcool 70%

durante 10 s, duas vezes em solução salina fosfatada tamponada (PBS) e eventuais corpos lúteos encontrados foram retirados com o auxílio de um bisturi. O número de corpos lúteos por ovário foi registrado.

Foi realizada a mensuração dos ovários através de um paquímetro, onde foi verificada a largura, espessura e comprimento dos ovários. Além disso, foi realizada a pesagem dos mesmos utilizando uma balança digital (FA 2104N, Bioprecisa, São Paulo, Brasil).

Um dos ovários foi dividido longitudinalmente ao meio e uma das metades foi imediatamente fixada em Carnoy durante 4 horas para a realização da estimativa da população folicular e uma pequena porção deste foi fixada em glutaraldeído para a análise em microscopia eletrônica de transmissão.

2.3.3 Análise Histológica

Após a fixação da metade de um dos ovários em Carnoy durante 4 horas, foi realizada desidratação em concentrações crescentes de etanol, diafanização utilizando xilol e inclusão em parafina histológica. Após confecção dos blocos de parafina estes foram seccionados seriadamente à espessura de 7 μm . A cada 120° secção foram montadas lâminas, as quais foram coradas utilizando-se Hematoxilina - Eosina. As secções foram analisadas por meio de microscopia óptica com aumento de 1000 x (Zeiss, Alemanha). Na ocasião da avaliação, as imagens foram armazenadas através da realização de microfotografias.

2.3.4 Estimativa da população folicular

Para avaliação quantitativa da população folicular ovariana, em todas as lâminas confeccionadas, foram contados os folículos pré-antrais (FOPA) classificados em primordial, primário e secundário que apresentaram o núcleo do oócito visível. A população de folículos (PF) pré-antrais foi estimada segundo a fórmula: $PF = \frac{\text{n}^\circ \text{ de folículos} \times \text{n}^\circ \text{ de secções} \times \text{espessura do corte}}{\text{n}^\circ \text{ de secções observado} \times \text{diâmetro médio do núcleo do oócito}}$ (LUCCI et al., 1999). As dimensões foliculares foram medidas com o auxílio de uma ocular micrométrica, sendo medidos os diâmetros do núcleo do oócito, do oócito e do folículo.

Os FOPA que apresentavam núcleo visível foram classificados como primordial, primário e secundário, de acordo com Hulshof et al. (1994), e contados para análise quantitativa em todas as lâminas. A população de FOPA foi estimada utilizando a seguinte fórmula: $PF = n^{\circ} \text{ de folículos} \times n^{\circ} \text{ de secções} \times \text{espessura do corte} \div n^{\circ} \text{ de secções observado} \times \text{diâmetro médio do núcleo do oócito}$ (LUCCI et al., 1999). As dimensões foliculares foram medidas com o auxílio de uma ocular micrométrica, sendo medidos os diâmetros do núcleo do oócito, do oócito e do folículo.

2.3.5 Análise da integridade dos folículos pré antrais

A morfologia dos folículos foi avaliada baseada na integridade do oócito e células da granulosa. Os FOPA foram classificados e contados como morfologicamente normais quando continham um oócito de formato regular e citoplasma uniforme, bem como células da granulosa organizadas; ou como degenerados quando o oócito exibia núcleo picnótico e/ou retração do citoplasma oocitário e, ocasionalmente, desorganização das células da granulosa. Para evitar a avaliação e contagem de um mesmo folículo mais de uma vez, os FOPA foram analisados apenas nas secções nas quais o núcleo do oócito era observado (LOPES et al., 2009).

2.3.6 Análise ultraestutural

No intuito de melhor examinar a morfologia folicular, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada. Uma porção com no máximo 1mm^3 de dimensão foi retirada do ovário e fixada em glutaraldeído 0.1 M (pH 7.2) durante 3 h a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Em seguida, a amostra foi pós fixada em 2% de tetróxido de ósmio em 0.1 M de tampão cacodilato de sódio durante 2 h a temperatura ambiente. As amostras foram então desidratadas em séries graduais de etanol (três banhos de 15 minutos de duração, cada), seguida de 2 banhos de 15 minutos em óxido de propileno. Após este procedimento, as amostras foram inclusas em uma solução constituída de óxido de propileno e resina Spurr (1:1) durante 8 h, após este período foram mantidas em resina Spurr pura, *overnight*. Em seguida, os fragmentos foram inclusos em resina Spurr a 60°C durante 48h, após as quais foram mantidos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizados cortes semi finos ($0.5\text{ }\mu\text{m}$) que foram corados com azul de toluidina e analisados em microscópio de luz sob aumento de

400 x. Logo após foram realizados cortes ultra finos (60 – 70 nm) os quais foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268 D, FEI Company, Hillsboro, EUA).

2.3.7 Análise estatística

Foram realizadas seis réplicas. As comparações da população folicular entre as classes foliculares, assim como as comparações entre os diâmetros foliculares, oocitários e nucleares entre as categorias foliculares foi feita através da ANOVA one way. Os resultados foram expressos em média e erro padrão. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0.05$.

2.4 RESULTADOS

Os pares de ovários pesavam 2.73 ± 0.63 g (mínimo 2.12 e máximo 3.64 g). O comprimento, largura e espessura de cada ovário foram mensurados, os valores encontrados foram 1.26 ± 0.22 , 1.04 ± 0.1 e 0.98 ± 0.1 mm respectivamente.

Os ovários dos catetos apresentavam-se como corpos ovóides, relativamente simétricos, com uma superfície lisa, exceto quando havia corpos lúteos. Em todos os animais havia presença de corpo lúteo. Dois animais apresentaram um corpo lúteo em cada um dos ovários e quatro deles apresentavam dois corpos lúteos em um mesmo ovário. Um total de 12 corpos lúteos foi observado. Esta estrutura apresentava-se como um corpo ovóide protrusa na superfície do ovário (Figura 17).

Na histologia, os ovários apresentavam uma camada externa de células cubóides, caracterizando o epitélio germinativo. Imediatamente abaixo, uma região formada por tecido conjuntivo denso, apresentando poucos vasos sanguíneos, a túnica albugínea, foi observada. Abaixo desta havia uma camada de tecido conjuntivo formando o estroma, a qual continha os folículos. Fibras musculares lisas foram observadas no estroma, circundando os folículos (Figura 18).

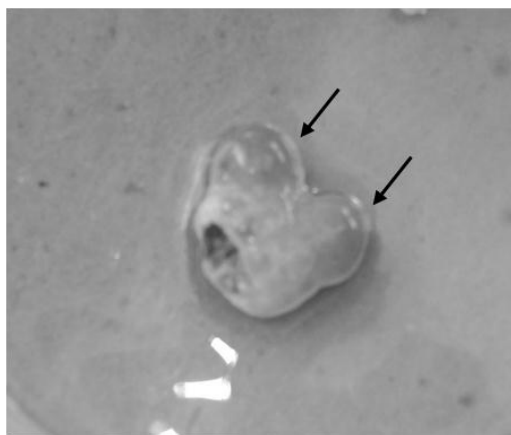


Figura 17. Ovário de cateto, exibindo dois corpos lúteos (setas)

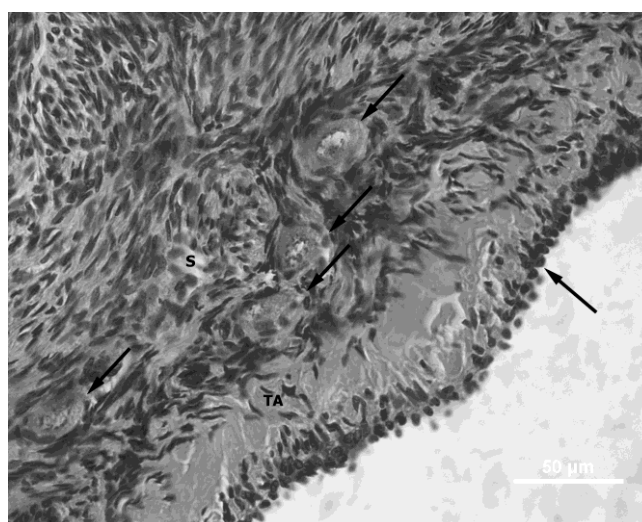


Figura 18: Análise histológica de ovário de *Tayassu tacaju*. Epitélio germinativo (seta), túnica albugínea (TA), estroma (S) e folículos (setas cheias).

A análise histológica *in situ* mostrou que os folículos primordiais eram encontrados no córtex, logo abaixo da túnica albugínea. Estes eram caracterizados como um oócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso – cúbico, que se encontrava sobre a membrana basal. Folículos primários estavam situados na periferia do córtex, apresentando uma camada de células da granulosa de formato cúbico ao redor do oócito. Folículos secundários tinham um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico ao redor do oócito, entre estas estruturas, a zona pelúcida podia ser observada, apresentando espessura de $2.72 \pm 0.28 \mu\text{m}$ (variando de 2.5 a $3.2\mu\text{m}$). A teca interna era formada por células fusiformes alongadas, aparecendo como camadas concêntricas.

Folículos pluriovulares foram observados em todos os animais e eram mais freqüentes em folículos primordiais. Eles representavam 2.76% do total de folículos contados (Figura 19).

Um total de 33273.45 ± 3019.30 FOPA foi estimado para a população folicular de cada ovário do *T. tajacu*. A população folicular em cada categoria também foi estimada e os resultados são mostrados na Tabela 2.

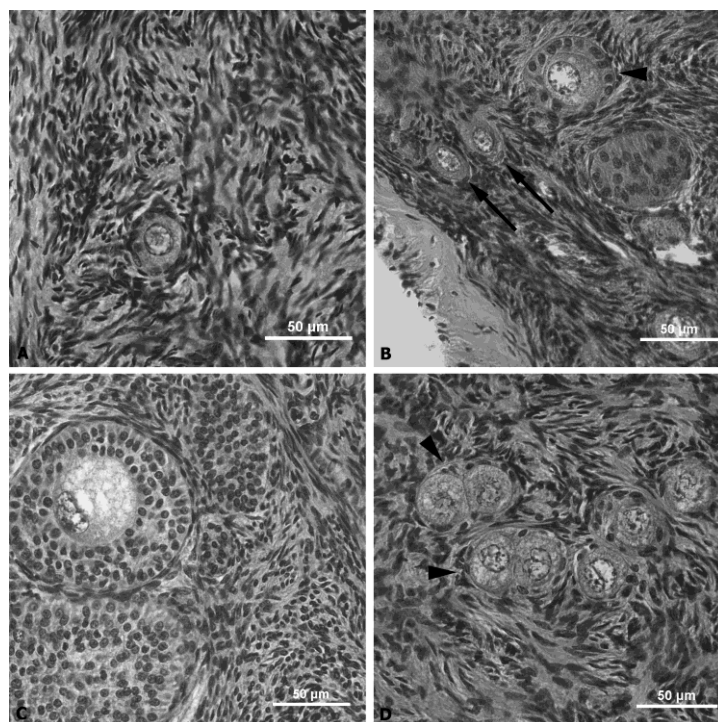


Figura 19: características histológicas de folículos pré antrais de cateto (*Tayassu tajacu*).

Folículo primordial (A) exibindo um oócito com núcleo grande, circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso e alguns vacúolos no citoplasma, indicativo de gotas de lipídios. (B) folículos primordiais (setas) e folículos primários (cabeça de seta). Folículos primários são caracterizados por um oócito exibindo núcleo grande e citoplasma homogêneo circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico. (C) Folículo secundário mostrando duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico. Note que a teca interna é formada por células alongadas e fusiformes aparecendo como camadas concêntricas externas às camadas da granulosa. (D) folículos pluriovulares (cabeça de setas) contendo dois oócitos circundados por uma única camada de células da granulosa.

Tabela 2: População de folículos pré antrais dos ovários (Média $\pm$ erro padrão) de catetos (*Tayassu tajacu*) em diferentes categorias foliculares.

Categoria Folicular	População Folicular (Média $\pm$ erro padrão)	Porcentagem de folículos (%)
Primordial	30466.59 $\pm$ 3019.30 ^a	91.56
Primário	2093.93 $\pm$ 3019.30 ^b	6.29
Secundário	712.93 $\pm$ 3019.30 ^b	2.15
Total	33273.45 $\pm$ 3019.30	100.00

^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

A maioria dos folículos pertencia à categoria de primordial (91.56%), seguido de primário (6.29%) e secundário (2.15%).

A grande maioria dos FOPA era morfológicamente normal ($94.4\% \pm 1.54$) e apenas uma pequena proporção apresentava atresia (5.6%) *in situ*. Os FOPA morfológicamente normais mostravam oócito esférico ou elíptico com um grande núcleo central e citoplasma uniforme. As células da granulosa sem picnose nuclear e células da granulosa bem organizadas em camadas circundando o oócito, e uma membrana basal intacta foi observada (Figura 20). Folículos degenerados apresentavam retração oocitária com ou sem picnose nuclear. As células da granulosa permaneceram inalteradas ou apresentavam desorganização e, algumas vezes, destacadas da membrana basal. A ocorrência de corpos picnóticos nas células da granulosa ou ruptura da membrana basal não foi observada (Figura 21).

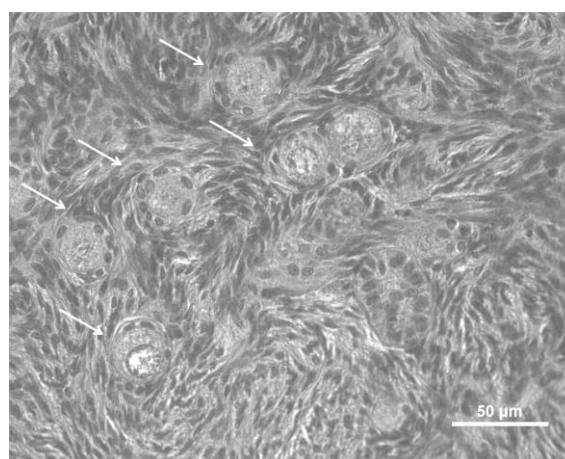


Figura 20: Folículos morfológicamente normais (setas) exibindo núcleo excêntrico e citoplasma uniforme. Células da granulosa sem núcleo picnótico estão bem organizadas em camadas circundando o oócito

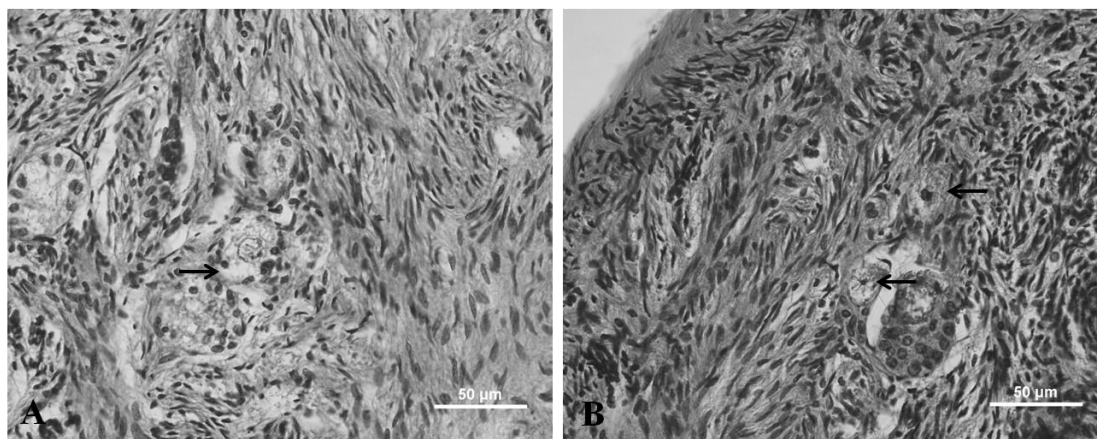


Figura 21: folículos degenerados exibindo retração do ooplasma e desorganização das células da granulosa (A) e núcleo oocitário picnótico (B).

Os diâmetros dos folículos, oócitos e núcleos em cada categoria folicular são mostrados na Tabela 3. Uma diferença significativa foi observada entre os diâmetros dos folículos secundários e as demais categorias, contudo não foi observada diferença entre folículos primordiais e primários. Adicionalmente, na análise histológica, grandes quantidades de gotas de lipídios foram verificadas no interior do citoplasma oocitário, apresentando-se como vacúolos, os quais foram confirmados através da análise ultraestrutural.

Tabela 3. Diâmetro dos folículos, oócitos e núcleo em cada categoria folicular (Média $\pm$ erro padrão) de folículos de catetos (*Tayassu tajacu*).

Categoria folicular	Diâmetro do folículo (Média $\pm$ erro padrão)	Diâmetro do oócito (Média $\pm$ erro padrão)	Diâmetro do núcleo (Média $\pm$ erro padrão)
Primordial	31.82 $\pm$ 9.95 ^a	25.43 $\pm$ 3.08 ^a	14.34 $\pm$ 0.97 ^a
Primário	40.90 $\pm$ 9.95 ^a	28.96 $\pm$ 3.08 ^a	15.04 $\pm$ 0.97 ^a
Secundário	196.21 $\pm$ 9.95 ^b	72.77 $\pm$ 3.08 ^b	21.77 $\pm$ 0.97 ^b

^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A microscopia eletrônica revelou que folículos primordiais exibem um núcleo evidente. Apresenta aspecto irregular devido à invaginações na carioteca. A cromatina estava disposta como eucromatina, contudo, poucas inclusões de heterocromatina eram encontradas ao longo do núcleo. O nucléolo apresentava-se bem visível e com aspecto granulado. Os poros nucleares estavam evidentes e exibiam aspecto elétron denso em ambos os lados da membrana nuclear (Figura 22).

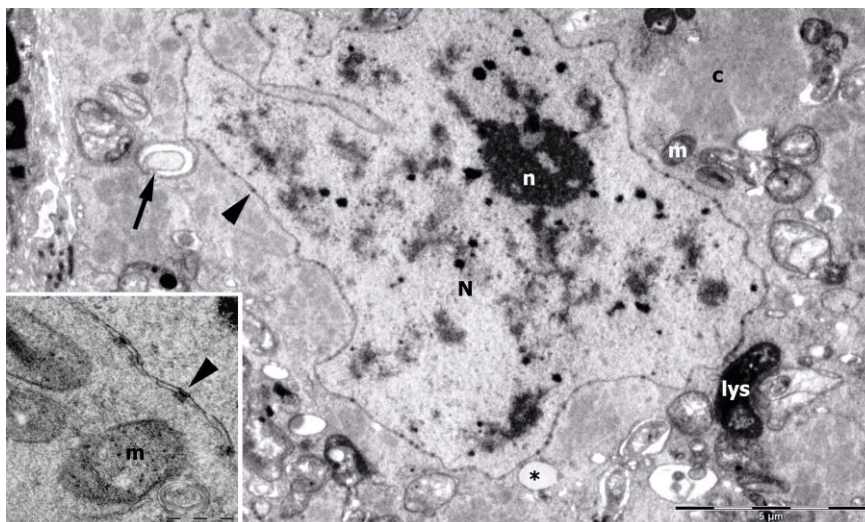


Figura 22: Micrografia eletrônica de folículo de *Tayassu tajacu* mostrando o núcleo oocitário. N, núcleo do oócito; n, nucléolo; poro nuclear (cabeça de seta); m, mitocôndria; lys, lisossomo; c, cristaloíde; inclusão multilamelar (seta); * vacúolo.

O citoplasma oocitário apresentou várias mitocôndrias dispersas em toda sua extensão; muitos vacúolos e lisossomos foram, também, frequentemente observados. Poucos perfis de retículo endoplasmático foram encontrados; o Complexo de Golgi apresentou-se bem desenvolvido e concentrado em um dos pólos da célula. Inclusões protéicas organizadas como cristaloídes foram frequentemente observadas. Gotas de lipídios também foram achados comuns (Figura 23).

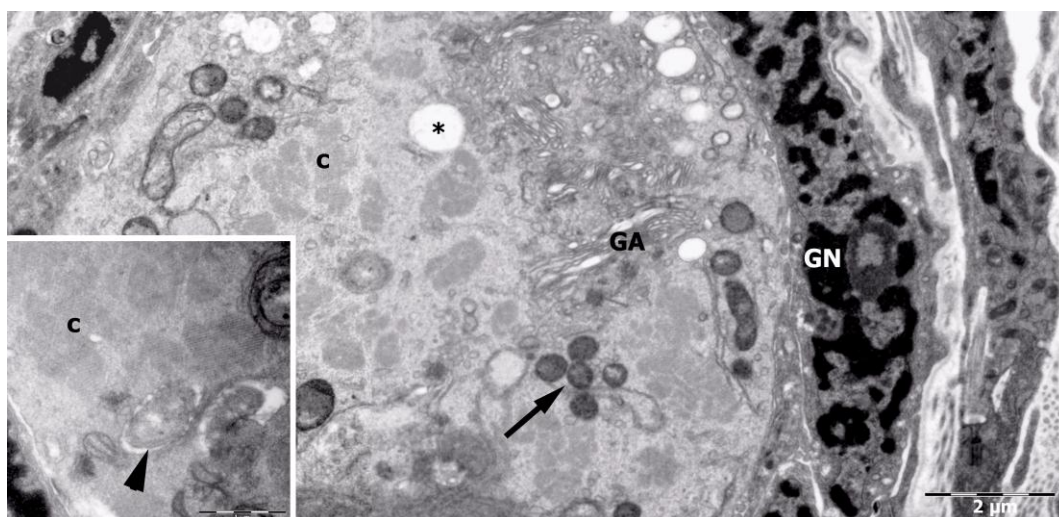


Figura 23: Micrografia eletrônica de folículo de *Tayassu tajacu* mostrando complexo de Golgi e cristaloídes. GN, núcleo da célula da granulosa; GA, complexo de Golgi; mitocôndrias (seta); inclusões protéicas organizadas em cristaloídes (c); * vacúolos; inclusões multilamelares (cabeça de seta).

Células da granulosa de formato pavimentoso associadas ao oócito apresentavam núcleo alongado e escuro, onde a heterocromatina era abundante; o citoplasma era escuro devido a presença de grandes quantidades de ribossomos. Junções aderentes foram encontradas entre as células da granulosa e o oócito (Figura 24).

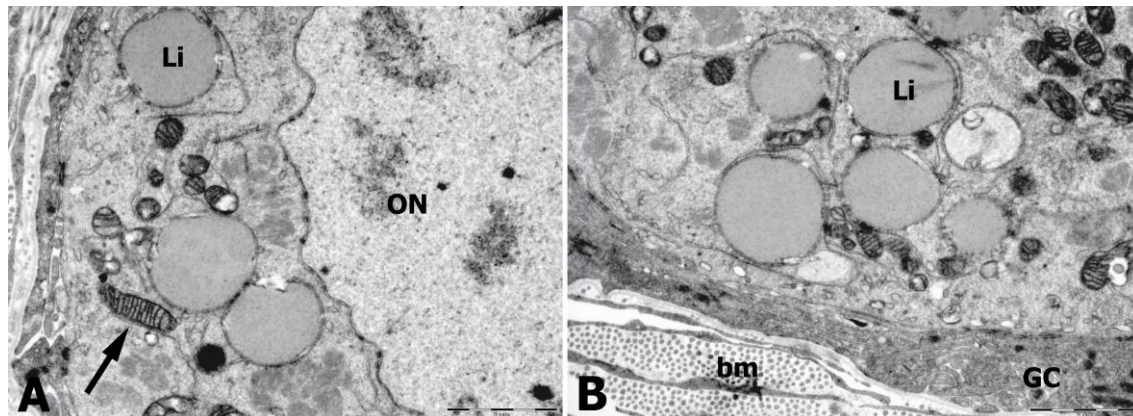


Figura 24: Micrografias eletrônicas de folículos de *Tayassu tajacu*. (A) ON, núcleo do oócito; Li, gotas de lipídios; mitocôndrias (seta). (B) GC, células da granulosa.

2.5 DISCUSSÃO

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho acerca da estimativa e caracterização da população folicular ovariana em catetos. Este tipo de pesquisa é importante para a aquisição de mais conhecimentos sobre a biologia reprodutiva desta espécie e juntamente com outras biotécnicas como cultivo *in vitro*, maturação e fertilização de oócitos poderiam contribuir para a conservação de gametas femininos, permitindo a formação de criobancos e contribuindo na preservação, e ainda para o desenvolvimento de novas técnicas de manejo desta espécie.

A maioria das características ovarianas encontradas neste estudo está de acordo com as descritas por Mayor et al. (2006) para a mesma espécie. De fato, folículos em crescimento foram vistos como corpos transparentes na superfície do ovário, como descrito pelos autores. Por outro lado, estes aspectos diferem dos apresentados em porcos domésticos, nos quais os ovários são descritos como corpos ovóides apresentando superfície irregular devido à presença de folículos em crescimento e corpos lúteos protrusos (DYCE et al. 1987; GETTY 1982; SCHWARZE 1984; HAFEZ 1995).

Adicionalmente, os tipos celulares constituintes, assim como a estrutura histológica do ovário dos catetos foram bastante similares a descrita em outras espécies de mamíferos (MOSSMAN; DUKE 1973; HAFEZ 1995; CELESTINO et al. 2004).

A população de folículos pré antrais por ovário em catetos foi similar a descrita em caprinos, nos quais $45,127 \pm 7,784$ folículos foram descritos para fêmeas pré púberes, $32,204 \pm 4,583$ para fêmeas adultas não gestantes e $35,608 \pm 9329$ para adultas gestantes (LUCCI et al., 1999). Os resultados também foram similares aos descritos para fetos ovinos, nos quais $32\,961 \pm 16,627$ folículos foram encontrados por ovário, mas apenas $16\,627 \pm 4,178.1$ folículos foram encontrados em ovelhas não gestantes (AMORIM et al., 2000), utilizando a mesma metodologia descrita no presente estudo. Em suínos, uma população de 420 000 folículos primordiais por par de ovários foi descrita (GOSDEN; TELFER 1987), o qual é um valor muito maior do que o encontrado para a população folicular total de *Tayassu tajacu*, incluindo todas as categorias foliculares. Estes resultados evidenciam que há grandes discrepâncias entre os catetos e os suínos domésticos com relação aos aspectos reprodutivos, e nem todas as informações podem ser extrapoladas de uma espécie para a outra.

Em muitas espécies mamíferas a população de FOPA pode ser afetada por vários fatores como idade, níveis hormonais e estágio reprodutivo e nutrição (ERICKSON 1966a; 1966b; ERICKSON et al. 1976; SCARAMUZZI et al. 1993). Outros estudos são requeridos no intuito de se investigar a influencia destes fatores na população folicular dos catetos.

Mayor et al. (2006) estimou a taxa media de ovulação da desta espécie em 2.3 ± 0.6 folículos, o que é um número baixo quando comparado com os suínos domésticos (10-24 folículos). Os autores sugerem que esse baixo valor pode ser um limite biológico para a prolificidade da espécie, uma vez que estas fêmeas têm ninhada de 1.7–1.9 fetos ou neonatos (MAYOR et al. 2005).

Além disso, uma baixa população folicular foi verificada para catetos no presente estudo, o que poderia também contribuir para a baixa taxa de ovulação e o baixo número de fetos por gestação nesta espécie, contudo, a relação entre estes fatores poderia ser o objeto de investigações futuras.

Adicionalmente, a população folicular ovariana dos catetos é heterogênea, apresentando folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, a qual é uma característica descrita em outras espécies como ovelhas (CAHILL; MAULÉON, 1981), ratas (MARIANA, 1978), camundongas (LINTERN-MOORE; MOORE, 1979), cadelas

(MCDUGALL et al. 1997), gatas (JEWGENOW; GÖRITZ, 1995), porcas (GREENWALD; MOOR, 1989) e ovelhas (LUCCI et al. 1999).

Com relação às categorias de FOPA nos catetos, a maioria dos folículos observados consistia em uma grande reserva de folículos primordiais quiescentes e um número muito menor de folículos em fase de crescimento. É conhecido que nas espécies mamíferas, antes da puberdade, assim como em idades mais avançadas da reprodução, a maioria dos folículos é primordial, como consequência de estímulos adequados, estes folículos são ativados. Os folículos entram em fase de crescimento a qual é caracterizada por modificações morfológicas e funcionais (MARTELLI et al. 2009). As características histológicas verificadas para cada categoria folicular são similares as informações previamente descritas para a mesma espécie (MAYOR et al. 2006), assim como para os suínos domésticos (GREENWALD; MOOR, 1989). Adicionalmente, análises histológicas mostraram que a maioria dos folículos pré antrais de catetos eram morfolologicamente normais e apenas uma pequena quantidade apresentava atresia, como também foi descrito para suínos domésticos por Borges et al. (2009). A taxa de atresia observada neste estudo foi similar a descrita para caprinos ($4.8\% \pm 0.4$) por Lucci et al. (1999), mas foi superior a descrita por Amorim et al. (2000) para ovinos (0.2%). Similar ao descrito em ovinos (AMORIM et al., 2000), espaços irregulares foram verificados entre as células da granulosa dos folículos secundários *in situ*. Hirshtield (1983) sugere que espaços irregulares observados entre as células da granulosa de folículos secundários é um sinal de formação prematura do antro.

A presença de folículos pré antrais pluriovulares foi verificada em catetos. Este tipo de folículos foi previamente descrito em suínos como grupos com uma camada incompleta de células da pré granulosa circundando ninhos de oócitos, alguns dos quais estavam justapostos, sem células da pré granulosa entre eles (GREENWALD; MOOR, 1989). Em bovinos e ovinos, a oogônia foi encontrada lado a lado durante a vida fetal, formando grupos nas gônadas. O acompanhamento de células somáticas, as quais provavelmente são precursoras das células foliculares, são também incluídas nestes grupos. A partir de dois terços da gestação, o isolamento dos oócitos é iniciado com um aumento no número de células somáticas que os acompanham (RUSSE, 1983). Em ruminantes, acredita-se que o isolamento incompleto dos oócitos origina os folículos pluriovulares que persistem após o nascimento (LUCCI et al. 1999). Este fenômeno poderia também ocorrer em outras espécies como o cateto. Embora este tipo de folículo

pareça ser normal em diferentes espécies de mamíferos, nas quais eles são vistos com frequência variável, seu papel permanece desconhecido (LUCCI et al. 2002).

Em catetos, o diâmetro do folículo, oócito e núcleo foram similares entre os folículos primordiais e primários, mas diferentes quando comparados aos secundários. O mesmo padrão não foi observado em caprinos (LUCCI et al. 1999), nos quais houve diferenças nos diâmetros entre todas as categorias foliculares (primordial 20.05 ± 0.31 μm , primário 24.42 ± 0.32 μm , secundário 44.24 ± 3.61 μm). Em cadelas, Lima et al. (2010) encontraram os seguintes valores para os diâmetros foliculares: 12–30 μm para primordiais, 22–48 μm para primários e 40–120 μm para secundários.

Os presentes resultados estão de acordo com os descritos por Mayor et al. (2006) que apresentaram as mensurações dos folículos de *T. tajacu*. Com relação ao diâmetro oocitário, os mesmos autores encontraram 20.5 ± 3.6 μm (16.3-23.1) para folículos primordiais, 22.9 ± 4.3 μm (19.3 – 24.2) para folículos primários e 84.6 ± 24.2 μm (51.9-106.2) para folículos secundários, e não houve diferenças entre os diâmetros oocitários de folículos primordiais e primários.

A microscopia de luz mostrou que há várias gotas de lipídios no citoplasma oocitário dos catetos, e esta informação foi confirmada através da microscopia eletrônica de transmissão. A análise ultraestrutural mostrou que o oócito apresenta um núcleo central grande e bastante irregular, bem delimitado pelo envelope nuclear. Esta irregularidade nuclear foi também verificada em suínos domésticos (GREENWALD; MOOR, 1989), mas estudos posteriores são sugeridos no intuito de esclarecer se isto é um artefato ou uma característica da espécie. Adicionalmente, a distribuição uniforme das organelas ao longo do citoplasma e a presença de mitocôndrias arredondadas como as mais evidentes destas, seguidas de gotas de lipídios, foram também previamente descritas em suínos domésticos (BORGES et al. 2009; GREENWALD; MOOR 1989).

Isachenko et al. (1998) investigaram as modificações ultraestruturais das vesículas intracelulares de lipídios de oócitos imaturos de suínos após resfriamento a 10°C e encontraram dois tipos de gotas de lipídios: vesículas homogêneas “escuras” e vesículas “cinzas” com traços elétron lucentes (ISACHENKO et al. 2001). Os lipídios no interior do oócito estão principalmente envolvidos no armazenamento de energia, e também são importantes compostos estruturais para as membranas citoplasmáticas dos futuros embriões (ISACHENKO et al. 1998), são constituintes das organelas citoplasmáticas, e regulam funções fisiológicas. De acordo com Isachenko et al. (2001), o fato de que o volume da mitocôndria, assim como o das vesículas lipídicas aumenta

durante o desenvolvimento oocitário para o estágio de metáfase II (M-II) (DVORAK, 1989) indiretamente confirma o papel dos lipídios como constituintes das membranas e como fonte de energia. Oócitos suínos tem maiores quantidades de lipídios do que os oócitos de outra espécie (WU et al. 2006), e esta parece ser uma característica dos catetos.

2.6 CONCLUSÕES

Em conclusão este trabalho mostra pela primeira vez a estimativa da população de folículos pré antrais no total e por categorias em ovários de catetos, a qual é pequena quando comparada a do suíno doméstico que foi bem menor do que a encontrada em suínos domésticos. A maioria das características dos folículos primordiais, primários e secundários é similar àquelas descritas para outras espécies de mamíferos. Adicionalmente, a análise ultraestrutural mostrou que os oócitos de catetos tem grandes quantidades de gotas lipídicas. As observações mostraram que, contrário ao que é comumente feito, nem todas as informações podem ser extrapoladas do suíno doméstico aos catetos. E pesquisas mais detalhadas são requeridas para uma melhor compreensão das características reprodutivas nesta espécie.

2.7 REFERÊNCIAS

AMORIM, C.A.; LUCCI, C. M.; RODRIGUES, A. P. R.; CARVALHO, F.C.A.; FIGUEIREDO, J.R.; RONDINA, D.; CECCHI, R.; GIORGETTI, A.; MARTINI, A.; GONÇALVES, P.B.D. Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries **Theriogenology** 53 1251-1262, 2000.

BODMER R.; PEZO, E. Análisis Económico Del uso de fauna silvestre em la Amazonia Peruana. In: **Manejo y Conservación de Fauna Silvestre em América Latina**. (Ed) en: Instituto de Ecología. La Paz – Bolívia, pp171-182, 1999.

BORGES, E.N.; SILVA, R.C.; FUTINO, D.O.; ROCHA-JUNIOR, C.M.C.; AMORIM, C.A.; BÃO, S.N.; LUCCI, C.M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of

different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes **Cryobiology** 59 195-200, 2009.

CAHILL, L.P.; CHAMLEY, W.A. An influence of the number of ovaries on the population of primordial follicles in the sheep **Proc Aust Soc Reprod Biol.** 14 77, Abstr, 1982.

CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; SOUZA, A.L.P.; MOREIRA, M.A.P.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders **Theriogenology** 74 1060-1065, 2010.

CELESTINO, J.J.H.; FIGUEIREDO, J.R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199 **Theriogenology** 62 65-80, 2004.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Coleta e avaliação de sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*) **Biota Neotropica** 5 1-6, 2005.

DOLEŽEL, R.; KYLIÁNKOVÁ, R.; KUMMER, V.; MAŠKOVÁ, J.; VITÁSEK, R. Follicular population and oestrogen receptor alpha in ovary of the bitch. **Acta Vet Brno** 73 37-43, 2004.

DUTERTRE, C.; DUBOST, G.; FEER, F.; HENRY, O.; MAUGET, R. Behaviours of collared and white-lipped peccaries (*Tayassu tajacu* and *Tayassu pecari*) in relation to sexual receptivity of the female **Acta Theriol** 46 305–318, 2001.

DVORAK, M. Ultrastructure and quantitative analysis of mouse and human oocytes. In **Developments in Ultrastructure of Reproduction** (A. Liss, ed.) 273–280. Academic Press, New York, 1989.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. The pelvis and reproductive organs of the pig. In: Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG (ed) **Textbook of Veterinary Anatomy**. W.B. Saunders Company, Philadelphia pp 759–767, 1987.

ERICKSON, B.H.; REYNOLDS, R.A.; MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow **Biol Reprod** 15 555-560, 1976.

ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary **J Reprod Fertil** 10 97- 105, 1966a.

GETTY, R. **The anatomy of the domestic animals**. W.B. Saunders Company, Philadelphia pa, 1982.

GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships **J. Zool**, Lond. 211 169-175, 1987.

GOTTDENKER, N.; BODMER, R. Reproduction and productivity of white-lipped and collared peccaries in the Peruvian Amazon **J. Zool** 245 423–430, 1998.

GREENWALD, G.S.; MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **J Reprod Fertil** 87 561–571, 1989.

HAFEZ, E.S.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Ed. Manole Ltda., 6 ed. 1995.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DER HUCK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries **Vet Quart** 2 78–80, 1994.

ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; MICHELMANN, H.M.; ALABART, J.L.; VAZQUEZ, I.; BEZUGLY, N.; NAWROTH, F. Lipolysis and Ultrastructural Changes of Intracellular Lipid Vesicles after Cooling of Bovine and Porcine GV-oocytes **Anat Histol Embryol** 30 333-338, 2001.

ISACHENKO, V.; SOLER, C.; ISACHENKO, E.; PEREZ-SANCHEZ, F.; GRISHCHENKO, V. Vitrification of Immature Porcine Oocytes: Effects of Lipid Droplets, Temperature, Cytoskeleton, and Addition and Removal of Cryoprotectant **Cryobiology** 36 250–253, 1998.

JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture **Animal Reproduction Science** 39 285-297, 1995.

LEHNINGER, A.L. **Biochemistry: the Molecular Basis of Cell Structure and Function**. New York: Worth Publishers, 1972.

LINTERN-MOORE, S.; MOORE, G.P.M. The initiation of oocyte growth in the mouse ovary **Biol Reprod** 20 773-778, 1979.

LOPES, C.A.P.; SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; MELO, M.A.P.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; BÁO, S.N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J.R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time **Animal Reproduction Science** 115 201-214, 2009.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method **Theriogenology** 57 1467 – 1483, 2002.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science** 56 223-236, 1999.

MARIANA, J.C. Analyse biometrique de l'index de marquage des cellules folliculeuses et de la taille des ovocytes des follicules primordiaux d'ovaire de ratte adulte cyclique **Annls Biol Anim Biochim Biophys** 18 1333-1342, 1978.

MAUGET, R.; FEER, F.; HENRY, O.; DUBOST, G. Hormonal and behavioural monitoring of ovarian cycles in peccaries. In: **Proceedings of the First International Symposium on Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals**, Supplement II, Berlin, Germany, pp 145–149, 1997.

MAYOR, P.; GÁLVEZ, H.; GUIMARÃES, D.A.; LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Serum estradiol-17 β , vaginal cytology and vulval appearance as predictors of estrus cyclicity in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the eastern Amazon region. **Anim Reprod Sci** 97 165–174, 2007.

MAYOR, P.; FENECH, M.; BODMER, R.E.; LOPEZ-BEJAR, M. Ovarian features of the wild collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the northeastern Peruvian Amazon **General and Comparative Endocrinology** 147 268-275, 2006.

MAYOR, P.; LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Integrating ultrasonography within the reproductive management of the collared peccary (*Tayassu tajacu*) **Theriogenology** 63 1832–1843, 2005.

MCDUGALL, K.; HAY, M.A.; GOODROWE, K.L.; GARTLEY, C.J.; KING, W.A. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches **J Reprod Fertil** 51 25–31, 1997.

MARTELLI, A.; BERNABO, N.; BERARDINELLI, P.; RUSSO, V.; RINALDI, C.; DI GIACINTO, O.; MAURO, A.; BARBONI, B. Vascular supply as a discriminating factor for pig preantral follicle selection **Reproduction** 137 45-58, 2009.

MOSSMAN, H.W.; DUKE, K.L. **Comparative Morphology of the Mammalian Ovary**. University of Wisconsin Press, Madison, 1973.

NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; NOGUEIRA, S.S.C. Criação comercial de animais silvestres: Produção e comercialização da carne e subprodutos na região sudeste do Brasil **Revista Econômica do Nordeste** 31 188-195, 2000.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl Anat** 24 77–79, 1983.

SCARAMUZZI, R.J.; ADAMS, N.R.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; FINDLAY, J.K.; HENDERSON, K.M.; MARTIN, G.B.; MCNATTY, K.P.; MCNEILLY, A.S.; TSONIS, C.G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe **Reprod Fertil Dev** 5 459-478, 1993.

SCHWARZE, C. Compendio de Anatomía Veterinaria. **Acribia**, Zaragoza. 277–289, 1984.

SILVA, A.R.; MORATO, R.G.; SILVA, L.D.M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids **Animal Reproduction Science** 81 159-175, 2004.

SOUSA, A.L.P.; CASTELO, T.S.; QUEIROZ, J.P.A.F.; BARROS, I.O.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by eletroejaculation **Anim Reprod Sci** 116 370–375, 2009.

WU, C.; RUI, R.; DAI, J.; ZHANG, C.; JU, S.; XIE, B.; LU, X.; ZHENG, X. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes **Mol Reprod Dev** 73 1454–62, 2006.

3 CAPÍTULO 3 - CONSERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE CATETO (*TAYASSU TAJACU*) EM MEIOS A BASE DE SOLUÇÃO SALINA FOSFATADA TAMPONADA (PBS) OU ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP)

Conservação de tecido ovariano de cateto (*Tayassu tajacu*) em meios a base de solução salina fosfatada tamponada (PBS) ou água de coco em pó (ACP®)

3.1 RESUMO

RESUMO - O cultivo de folículos in vitro vem sendo utilizado para a multiplicação de animais. Os animais doadores muitas vezes encontram-se distantes dos laboratórios especializados. Assim, técnicas de conservação de oócitos durante seu transporte assumem grande importância. O objetivo do trabalho foi desenvolver um método eficiente para a conservação de folículos pré-antrais de catetos (*Tayassu tajacu*) utilizando o tampão salina fosfato (PBS) e água de coco em pó (ACP). Coletaram-se ovários de seis catetos que foram divididos em 9 fragmentos. Um fragmento foi imediatamente destinado à histologia, os demais foram colocados em tubos com PBS ou ACP e acondicionados em caixas de isopor de 5L. As caixas foram lacradas e abertas 4h, 12h, 24h e 36h após o início do experimento e os fragmentos ovarianos foram submetidos à histologia. Foram submetidos ao processamento para microscopia eletrônica de transmissão os tratamentos que não diferiram do controle. A temperatura das caixas e o pH do meio foram aferidos. Os folículos foram classificados como primordiais, primários ou secundários. Foi ainda realizada a análise da viabilidade folicular através do teste com azul de Trypan. Os resultados foram expressos em média e erro padrão, as comparações entre os meios utilizados e o efeito do tempo de conservação sobre a integridade folicular foram analisados através da Two Way Repeated Measures ANOVA ($P < 0.05$), utilizando o Sigmaplot. Verificou-se que a integridade e a viabilidade folicular foram mantidas até as 4 h utilizando-se ACP. O pH dos meios de conservação permaneceu constante. Conclui-se que a ACP® pode ser utilizada como um meio alternativo para conservação de folículos pré-antrais.

Palavras – Chave: Folículos pré antrais, ACP, conservação por curtos períodos, morfologia, viabilidade.

3.2 INTRODUÇÃO

Na América latina, o cateto (*Tayassu tajacu*) está entre as espécies mais caçadas devido à apreciação pela sua carne e o interesse internacional pelo seu couro (BODMER et al., 1990; VEIGA et al., 1995). Em razão dessa procura, programas de criação em cativeiro dessa espécie vêm sendo implantados, visando tanto a produção de bens como a sua conservação (ALBUQUERQUE, 2007). Entretanto as informações acerca da biologia reprodutiva destes animais são ainda escassas e direcionadas,

principalmente aos machos (COSTA; PAULA, 2005; SOUZA et al, 2009; CASTELO et al., 2010).

O uso de biotécnicas reprodutivas, em especial a conservação de gametas, favorece a manutenção e intercâmbio do material genético desses animais. No tocante às fêmeas, a conservação de ovários para posterior utilização nestas biotécnicas, assume grande importância, uma vez que a maioria das doadoras encontra-se distante dos laboratórios especializados (LOPES et al., 2009). Estudos sobre conservação de oócitos são importantes uma vez que estes são fontes de material genético que podem ser estocados constituindo bancos genéticos, auxiliando no processo de preservação de espécies ameaçadas (SILVA et al., 2004a).

A preservação de gametas femininos pode ser melhor alcançada através do armazenamento de fragmentos de tecido ovariano contendo inúmeros oócitos imaturos inclusos em folículos pré antrais (FOPAS) (PAYNTER, 2000). Estes folículos representam mais de 90% da população folicular ovariana total dos catetos (dados não publicados).

A eficiência de um protocolo de conservação através do resfriamento depende principalmente do meio de preservação, temperatura e tempo de incubação durante o transporte do local de coleta até o laboratório de reprodução, podendo afetar a qualidade de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (FOPA) se estes parâmetros não estiverem adequados (MATOS et al. 2004). No que compete a solução de preservação, esta tem um papel fundamental minimizando os danos provocados pela isquemia durante a estocagem (BIGAM; GRANT, 2000). Dentre as substâncias utilizadas para a conservação durante o transporte de tecido ovariano, a solução salina fosfatada tamponada (PBS) tem sido comumente utilizada (ANDRADE et al., 2002; SANTOS et al., 2002). Entretanto, por se tratar de um meio bastante simples, contendo poucos constituintes, tem-se observado a necessidade da utilização de substâncias ou meios mais ricos para a preservação de material genético feminino.

Nesse contexto, meios a base de água de coco (*Cocos nucifera*) tem se mostrado eficientes para o transporte de ovários de cabras (SILVA et al., 2000), ovelhas (ANDRADE et al., 2002) e vacas (LUCCI et al., 2004), permitindo a preservação de FOPAs com sucesso. Este meio é composto de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (MARQUES, 1982) e fosfolípidos (LAGUNA; NUNES 1997), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos (BLUME; MARQUES JUNIOR, 1994).

Entretanto, como a água de coco sofre muitas variações na sua composição, foi desenvolvida a água de coco em pó (ACP®, ACP Biotecnologia®, Fortaleza, CE, Brasil). Esta pode ser facilmente estocada e transportada e, após a sua reconstituição, suas características bioquímicas são bastante similares a água de coco *in natura*. A solução a base de água de coco em pó preservou, com sucesso, a morfologia de folículos pré antrais *in situ* de cadelas (LIMA et al., 2010), porém, os efeitos desse meio sobre a morfologia e viabilidade de folículos pré antrais de catetos não são conhecidos.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a morfologia e viabilidade de FOPA de catetos preservados em PBS ou ACP sob refrigeração por curtos períodos de tempo (4, 12, 24 e 36h).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal – UFERSA, Mossoró, RN, bem como no Laboratório de Manipulação de Oócitos em Folículos Pré Antrais, UECE, Fortaleza, CE.

3.3.1 Animais

Os animais utilizados neste experimento foram provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), da UFERSA, localizado no Nordeste do Brasil (Mossoró, RN, Brasil; 5°10'S, 37°10'O). Nesta região o clima é semi – árido, com temperatura média anual de 27°C. Este centro é registrado junto ao IBAMA como criadouro científico sob número 1478912. Atualmente o referido local possui uma população de catetos (*Tayassu tajacu*) em torno de 300 indivíduos onde, anualmente, é realizado um abate programado para o seu controle. Estes animais são então destinados a vários experimentos.

Para o presente estudo oito fêmeas adultas, com idade entre 3 e 4 anos e peso de 21.67 ± 2.08 Kg (mínimo 17.3 e máximo de 24.0 Kg) foram utilizadas. O protocolo experimental e práticas de manipulação dos animais foram aprovados pelo comitê de ética da UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

3.3.2 Coleta e preparação de ovários

Os pares de ovários oriundos das fêmeas de catetos (n=8) foram assepticamente coletados após o abate dos animais. Após a remoção da bursa ovárica os ovários foram lavados uma vez em álcool 70% durante 10 s, duas vezes em solução salina fosfatada tamponada (PBS) e eventuais corpos lúteos encontrados foram retirados com o auxílio de um bisturi. O número de corpos lúteos por ovário foi registrado.

3.3.3 Delineamento Experimental

Experimento 1: Avaliação morfológica dos folículos pré antrais armazenados de catetos

Nesta etapa do experimento foram utilizados seis ovários. Após a coleta e preparação, um dos ovários foi dividido em 9 (nove) fragmentos dos quais um foi imediatamente fixado em Carnoy durante 4 horas, constituindo o grupo controle (0h). Os demais fragmentos foram colocados em tubos plásticos de poliestireno (2,5 mL) contendo PBS (300 mOsmol/L, pH 7.2; Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) ou água de coco em pó (280 mOsmol/mL, pH 7.3; ACP® - ACP Biotecnologia®, Fortaleza, Ceará, Brasil). Esta última foi obtida através do processo de atomização em *spray dryer* e foi dissolvida em água destilada, segundo as especificações do fabricante. O pH em ambos os meios foi de aproximadamente 7.0, e 20 mg de gentamicina foi adicionada nos meios.

Os tubos foram acondicionados em caixas isotérmicas de 5L (15 x 21 x 17 cm³; Isoplast®, Fortaleza, CE, Brasil) contendo 3 L de gelo biológico (Gelo Eutético®, Campinas, São Paulo, Brasil). As caixas foram lacradas e só foram abertas após 4, 12, 24 ou 36 h (Figura 25), simulando um transporte. As temperaturas, interna e externa às caixas, foram aferidas e registradas.

No momento da abertura das mesmas o fragmento de ovário foi submetido à análise morfológica por histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão, bem como o pH dos meios foi mensurado utilizando fitas de pH (Neutralit®, Merck®, Bucharest, Romênia). Cada tratamento foi repetido seis vezes.

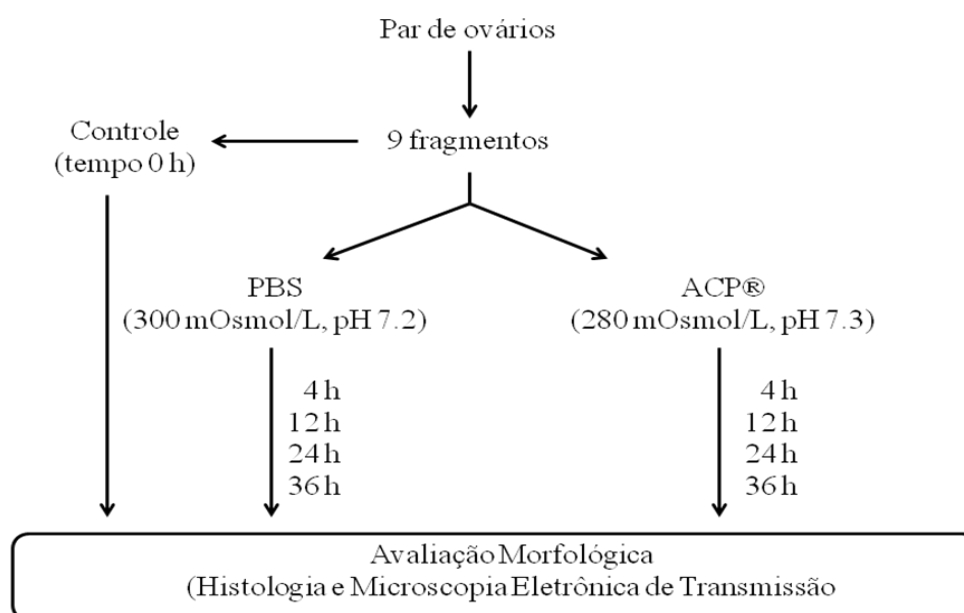


Figura 25: Delineamento experimental: pares de ovários de catetos ($n = 6$) foram divididos em nove fragmentos, um deles foi selecionado como grupo controle enquanto os demais foram acondicionados em tubos contendo PBS ou ACP por 4, 12, 24 ou 36 h. Os fragmentos foram subsequentemente destinados a análise morfológica (histológica e ultraestrutural)

Experimento 2: Análise da viabilidade dos folículos pré antrais armazenados de catetos

Os efeitos do armazenamento sobre os folículos pré antrais de catetos foram analisados posteriormente através da avaliação da sua viabilidade. Para tanto, dois pares de ovários foram divididos em sete fragmentos, dos quais um foi imediatamente submetido ao isolamento mecânico seguido do teste de exclusão com azul de Trypan, como será descrito posteriormente. Os demais fragmentos foram mantidos em PBS ou solução a base de ACP durante 4, 12 ou 24 horas, sob refrigeração em caixas isotérmicas. Após estes períodos os fragmentos foram submetidos a análise da viabilidade como descrito para o grupo controle.

3.3.4 Análise Histológica

Após fixação em Carnoy durante 4 h, os fragmentos de ovários foram desidratados em séries de concentrações crescentes de etanol, diafanizados com xilol, inclusos em parafina histológica e seccionados em séries de 7 μm de espessura. A cada

5ª secção foram montadas lâminas, as quais foram coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas sob microscopia de luz sob aumento de 400x (Zeiss, Germany).

Os FOPA foram identificados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordiais, quando continham um oócito circundado por uma única camada de células da granulosa de formato pavimentoso e/ou algumas células de formato cúbico; primários, quando apresentavam oócito circundado por uma única camada de células da granulosa de formato cúbico; e secundários quando apresentavam duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico, sem a presença de antro (HULSHOF et al., 1994).

A morfologia dos folículos foi avaliada baseada na integridade do oócito e células da granulosa. Os FOPA foram classificados e contados como morfologicamente normais quando continham um oócito de formato regular e citoplasma uniforme, bem como células da granulosa organizadas; ou como degenerados quando o oócito exibia núcleo picnótico e/ou retração do citoplasma oocitário e, ocasionalmente, desorganização das células da granulosa. Para evitar a avaliação e contagem de um mesmo folículo mais de uma vez, os FOPA foram analisados apenas nas secções nas quais o núcleo do oócito era observado (LOPES et al., 2009).

3.3.5 Análise ultraestrutural dos folículos pré antrais

A análise ultraestrutural através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada no grupo controle e no tratamento que não diferiu deste (ACP até 4 h). Uma porção com no máximo 1mm³ de dimensão foi retirada do ovário e fixada em glutaraldeído 0.1 M (pH 7.2) durante 3 h a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Em seguida, a amostra foi pós fixada em 2% de tetróxido de ósmio em 0.1 M de tampão cacodilato de sódio durante 2 h a temperatura ambiente. As amostras foram então desidratadas em séries graduais de etanol (três banhos de 15 minutos de duração, cada), seguida de 2 banhos de 15 minutos em óxido de propileno. Após este procedimento, as amostras foram inclusas em uma solução constituída de óxido de propileno e resina Spurr (1:1) durante 8 h, após este período foram mantidas em resina Spurr pura, overnight. Em seguida, os fragmentos foram inclusos em resina Spurr a 60°C durante 48h, após as quais foram mantidos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizados cortes semi finos (0.5 µm) que foram corados com azul de toluidina e analisados em microscópio de luz sob aumento de 400 x. Logo após

foram realizados cortes ultra finos (60 – 70 nm) os quais foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268 D, FEI Company, Hillsboro, EUA).

3.3.6 Análise da viabilidade dos folículos pré antrais

Os folículos pré antrais de catetos foram isolados, tanto do fragmento do grupo controle como dos fragmentos armazenados, utilizando o método mecânico descrito por Figueiredo et al. (1993), modificado para ovinos. Resumidamente, utilizando um *tissue chopper* (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK) ajustado em intervalos de secção de 87.5µm, as amostras foram divididas em pequenos fragmentos, os quais foram colocados em MEM (Meio Essencial Mínimo, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e pipetados 40 vezes utilizando um pipeta de Pasteur (diâmetro em torno de 1600 µm) e subsequentemente 40 vezes utilizando uma pipeta de Pasteur com menor diâmetro (em torno de 600 µm) no intuito de dissociar os folículos pré antrais do estroma. A suspensão obtida foi submetida a uma filtração através de uma malha de nylon de 500 µm e em seguida de 100 µm, resultando em uma suspensão contendo folículos pré antrais com diâmetro menor que 100 µm. Este procedimento foi realizado dentro de 10 min a temperatura ambiente.

Após este procedimento a viabilidade dos folículos pré antrais foi analisada através do teste com azul de Trypan (Jewgenow et al., 1998). Em resumo, 10 µL de 0.4% de azul de Trypan (Sigma, Deisenhofen, Alemanha) foi adicionado a 90 µL da suspensão de folículos pré antrais isolados, sendo esta amostra incubada durante 5 min a temperatura ambiente. Após este período os folículos foram examinados sob microscópio invertido. Estes foram classificados como viáveis quando o oócito e <10% das células da granulosa permaneciam sem coloração, ou como não viáveis quando o oócito e/ou >10% das células da granulosa ficavam coradas.

3.3.7. Análise Estatística

O delineamento utilizado para a avaliação da morfologia dos folículos pré antrais em função do tempo e meio de conservação sob refrigeração foi o de parcelas subdivididas, sendo os meios utilizados as parcelas, e o tempo as subparcelas. Satisfeita a condição de normalidade dos dados através do teste de Cramer-Von-Mises, estes

foram submetidos à ANOVA. Diferenças entre o controle e os tratamentos (combinações de meio e tempo de armazenamento) em termos de percentagens de folículos pré antrais morfológicamente normais foram determinadas através do teste de Tukey. Com relação a viabilidade folicular em função dos meios e do tempo de conservação, os dados foram submetidos ao teste de qui-quadrado. Valores foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0.05$.

3.4 RESULTADOS

Experimento 1: Avaliação morfológica dos folículos pré antrais armazenados de catetos

Um total de 1627 FOPA foi avaliado. Devido ao pequeno número de folículos secundários encontrados no presente trabalho, os dados acerca dos mesmos não puderam ser analisados estatisticamente, portanto não foi possível avaliar o efeito dos meios e tempos de armazenamento sobre a integridade desta categoria de folículos.

A maioria dos folículos observados foi classificada como primordial (88.2 %, 1435/1627) e apresentava diâmetro médio de 31,82 μm . Havia poucos folículos primários (9.3 %, 152/1627), os quais apresentavam diâmetro médio de 40,9 μm . Os folículos secundários apareceram em ainda menor percentual (2.5 %, 40/1627), com diâmetro médio de 196.21 μm . Quando comparado ao controle somente o tratamento com ACP até 4 h não diferiu significativamente. As percentagens de FOPA normais diminuíram após 12h de conservação do tecido ovariano em ACP. Quando o meio utilizado para conservação foi o PBS esta redução foi observada já a partir das 4h. Quando os meios foram comparados entre si no mesmo tempo de conservação, apenas às 36h os fragmentos tratados com ACP destinaram uma maior percentagem de FOPA morfológicamente normais, como mostra a Tabela 4. O aspecto de FOPA morfológicamente normais e degenerados, na histologia clássica, é mostrado na Figura 26.

Tabela 4: Valores médios da percentagem (normal/total) de folículos pré antrais morfológicamente normais de catetos (*Tayassu tajacu*) preservados sob refrigeração em solução salina fosfatada tamponada (PBS) ou em meio à base de água de coco em pó (ACP) por até 36h.

Categoria folicular	Duração da preservação (h)			
	Controle fresco	4	12	24

		PBS	ACP	PBS	ACP	PBS	ACP	PBS	ACP
Primordial	93.5 ^a (145/155)	79.7 ^{b,c} (126/158)	86.3 ^{a,b} (139/161)	68.7 ^{c,d} (99/144)	76.0 ^{b,c} (124/163)	62.7 ^d (106/169)	67.6 ^{c,d} (117/173)	46.0 ^e (71/152)	63.0 ^d (101/160)
Primário	100.0 ^a (22/22)	94.4 ^a (17/18)	100.0 ^a (14/14)	82.1 ^a (23/28)	100.0 ^a (14/14)	77.8 ^a (7/9)	90.0 ^a (9/10)	58.3 ^b (14/24)	92.3 ^a (12/13)
Secundário*	100.0 (3/3)	100.0 (2/2)	100.0 (5/5)	96.0 (9/10)	83.0 (5/6)	100.0 (2/2)	100.0 (2/2)	83.0 (5/6)	100.0 (4/4)
Total	94.4 ^a	81.5 ^{b,c}	87.8 ^{a,b}	71.9 ^{c,d,e}	78.1 ^{b,c,d}	63.9 ^e	68.9 ^{d,e}	49.4 ^f	66.7 ^e

a – f na mesma linha, sem sobrescrito comum diferiram ($P < 0.05$).

* Valores não possíveis de serem submetidos a análise estatística.

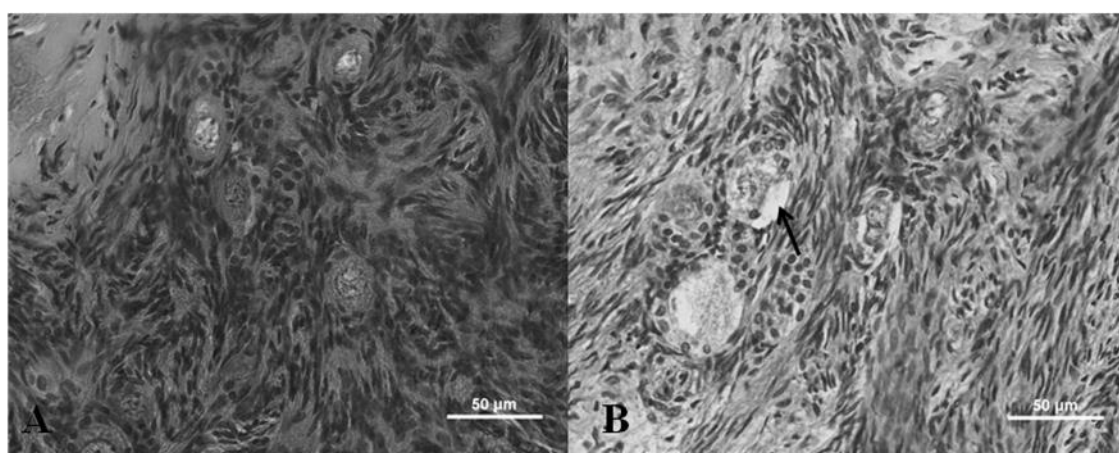


Figura 26. Características histológicas de fragmentos de ovário de cateto (*Tayassu tajacu*) preservados por curtos períodos sob refrigeração. Folículos pré antrais morfologicamente normais (A), exibindo oócito com citoplasma homogêneo e grande núcleo centralizado, circundado por células da granulosa bem organizadas. Folículos pré antrais degenerados (B) exibindo retração do citoplasma oocitário.

No tocante a análise ultraestrutural, os folículos classificados como morfologicamente normais nas avaliações das secções semi finas sob microscopia de luz foram posteriormente analisados sob MET. No grupo controle, os folículos exibiram um núcleo distinto, com aspecto irregular devido à invaginações na carioteca. O nucléolo apresentava-se bem visível e com aspecto granuloso. Os poros nucleares estavam evidentes. O citoplasma oocitário apresentou várias mitocôndrias dispersas em toda sua extensão, lisossomos foram, também, frequentemente observados. Poucos perfis de retículo endoplasmático foram encontrados. Inclusões protéicas organizadas como cristalóides foram frequentemente observadas. Gotas de lipídios também eram comuns. Nos folículos mantidos em ACP por até 4h o núcleo permaneceu inalterado

após a conservação, podendo ser observado o nucléolo bastante evidente. A carioteca permaneceu intacta, apresentando dupla membrana e os poros nucleares puderam ser observados. Gotas de lipídios apresentavam-se em todo o citoplasma oocitário, sem alterações evidentes, quando comparadas as do grupo controle e pôde-se observar retículo endoplasmático liso bem evidente. Cristalóides e inclusões multilamelares também estavam bastantes presentes no ooplasma. As principais alterações observadas foram com relação às mitocôndrias, visto que muitas delas apresentavam rupturas na membrana e nas cristas (Figura 27).

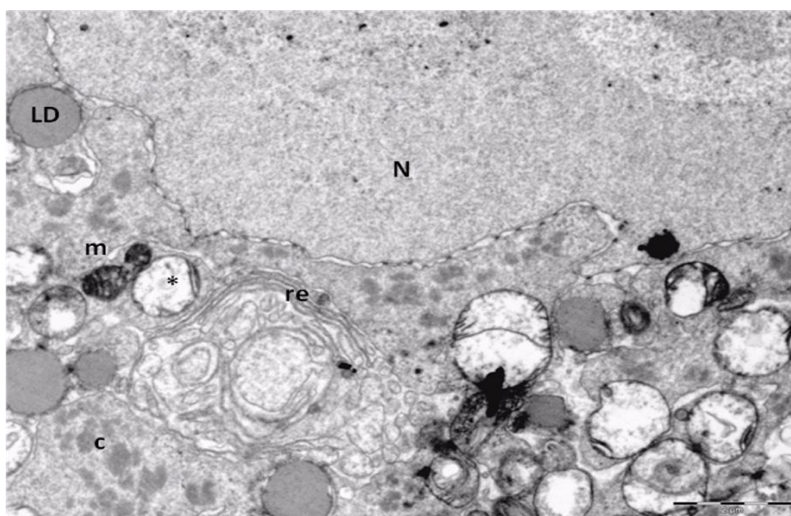


Figura 27: Micrografia eletrônica de folículo pré antral de cateto, conservado em meio à base de ACP® por até 4h. N, núcleo do oócito; LD, gota de lipídio; m, mitocôndria com aspecto normal; * mitocôndria edemaciada e rompida; c, citoplasma oocitário; re, retículo endoplasmático.

Um aumento da temperatura ($P < 0.05$) no interior das caixas isotérmicas foi verificado a partir das 24 horas (Tabela 5), entretanto, a temperatura ambiente permaneceu constante. Para ambos os meios utilizados, o pH permaneceu em aproximadamente 7.0.

Tabela 5: Média dos valores ($\pm$ Erro Padrão) para temperatura ambiente e no interior das caixas isotérmicas durante a conservação de folículos pré antrais de catetos por até 36h.

Duração da preservação (h)	Temperatura
----------------------------	-------------

	Ambiente	Interna às caixas
0 (Controle fresco)	24.6 ± 0.54 ^a	3.4 ± 0.71 ^a
4	25.0 ± 0.54 ^a	3.7 ± 0.71 ^a
12	25.4 ± 0.54 ^a	5.1 ± 0.71 ^{a,b}
24	24.9 ± 0.54 ^a	7.4 ± 0.71 ^{b,c}
36	25.9 ± 0.54 ^a	8.4 ± 0.71 ^c

^{a,b} Dentro da mesma coluna, médias sem sobrescrito comum diferem ($P < 0.05$).

Experimento 2: Análise da viabilidade dos folículos pré antrais armazenados de catetos

Um total de 209 folículos foi examinado quanto a viabilidade, por meio do corante vital azul de Trypan. Foi observado que a viabilidade foi mantida semelhante ao grupo controle quando os FOPA foram mantidos em ACP por até 4h. Quando se comparou os meios entre si, no mesmo tempo de conservação, não foram verificadas diferenças significativas. Os efeitos do meio e tempo de armazenamento sobre as percentagens de folículos pré antrais viáveis são mostrados na Tabela 6.

Devido ao pequeno número de folículos isolados encontrados no tratamento de 36 h sob refrigeração, os dados acerca dos mesmos não puderam ser analisados estatisticamente, portanto não foi possível avaliar o efeito deste tempo de armazenamento sobre a viabilidade folicular.

Tabela 6: Valores médios da percentagem (viáveis/total) de folículos pré antrais viáveis de catetos (*Tayassu tajacu*) preservados sob refrigeração em solução salina fosfatada tamponada (PBS) ou em meio à base de água de coco em pó (ACP) por até 24h.

Duração da preservação (h)	Meio	
	PBS	ACP
0 (Controle fresco)	86.67 ± 22.17 (26/30) ^a	86.67 ± 14.01 (26/30) ^a
4	63.33 ± 22.17 (19/30) ^b	70.00 ± 14.01 (21/30) ^{a,b}
12	46.67 ± 22.17 (14/30) ^b	63.33 ± 14.01 (19/30) ^b
24	36.67 ± 22.17 (11/30) ^b	53.33 ± 14.01 (16/30) ^b

^{a,b} Dentro da mesma coluna, médias sem sobrescrito comum diferem ($P < 0.05$).

3.5 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou pela primeira vez a conservação, durante o transporte, de tecido ovariano de catetos visando uma posterior criopreservação desse tecido ou a

utilização como fonte de FOPA para o cultivo *in vitro* ou de oócitos para fertilização *in vitro*. Nesse contexto, o processo de conservação é de suma importância, uma vez que, os centros criatórios de animais silvestres geralmente se encontram distantes dos laboratórios especializados em reprodução animal, no qual esse material biológico deve ser processado.

É conhecido que a estocagem de ovários sem o suprimento sanguíneo pode afetar a qualidade do oócito (WONGSRIKEAO et al., 2005). Em geral a hipotermia é aplicada globalmente na preservação de órgãos na tentativa de se minimizar a taxa dos processos que envolvem consumo de energia e diminuir a taxa de autólise tecidual. Durante longos períodos de estocagem, e devido à isquemia, há uma rápida depleção dos estoques de energia celular, resultando na acidificação do meio (SALEHI et al., 2004).

Os resultados demonstraram que houve uma melhor preservação da morfologia dos FOPA inclusos no tecido ovariano de catetos, quando estes foram conservados em ACP durante o período de 4 horas. Em cadelas, foi reportado que o uso da água de coco em pó permitiu a manutenção da integridade folicular por até 12 h, enquanto o uso do PBS mostrou uma redução significativa da mesma já neste tempo de armazenamento, sob as mesmas condições do presente estudo (LIMA et al., 2010). Outros estudos mostram que a conservação de folículos pré antrais caprinos em solução a base de água de coco a 4°C por 24 h se manteve semelhante ao controle (SILVA et al., 1999), resultados semelhantes foram observados por outros autores que utilizaram esse mesmo período e temperatura de conservação para FOPA caprinos utilizando meio essencial mínimo (MEM) (CHAVES et al., 2008). Diferentemente, os resultados do presente trabalho mostram que após o período 24h houve uma redução na morfologia e viabilidade desses FOPA quando comparados ao controle.

Em suínos, foi demonstrado que a conservação de fragmentos ovarianos a 4 ou 20°C por até 18 h em solução salina (0.9%), não afetou o percentual de folículos primordiais morfologicamente normais, entretanto houve redução deste percentual nos folículos em crescimento (LUCCI et al., 2007). Estes resultados são diferentes dos obtidos neste estudo, no qual houve redução do percentual de folículos morfologicamente normais de catetos, conservados em PBS já nas primeiras 4 horas de armazenamento, onde a temperatura apresentava-se próxima de 4°C (3.7°C). Os autores descrevem ainda que após a conservação a 4°C por 18 h ou a 20°C por até 6 h, os folículos em crescimento continuaram seu desenvolvimento, quando cultivados *in vitro*

por 3 dias, e apresentaram um padrão de crescimento similar aos folículos não conservados (controle fresco). Estes resultados foram ainda similares aos descritos em trabalho realizado com folículos frescos de suínos (MAO et al., 2002). No presente trabalho, a maior percentagem de folículos primários morfológicamente normais observada em relação aos folículos primordiais pode ser atribuída a pouca quantidade de folículos primários observada nos fragmentos ovarianos, a qual pode ser decorrente do pequeno número de folículos encontrados em cada uma das secções histológicas analisadas. Estudos futuros podem confirmar esta hipótese.

Com relação às soluções utilizadas neste trabalho, é bastante comum a utilização de PBS na conservação, por curtos períodos, de oócitos ovinos (ANDRADE et al., 2002) e caprinos (COSTA et al. 2005). Trabalhos mostraram que este meio foi tão eficiente quanto o TCM-199 na preservação de FOPAs caprinos a 4°C por 12 h (COSTA et al., 2005). Em cadelas o uso de PBS foi eficiente na preservação da morfologia folicular por até 12 h, sob refrigeração (LIMA et al., 2010).

Já solução a base de ACP é um meio rico em aminoácidos, açúcares, vitaminas e minerais (NUNES et al., 2005), a qual foi utilizada com sucesso para conservação de fragmentos (SILVA et al., 1998) e ovários inteiros (SILVA et al., 1999) de caprinos, sendo a sua rica composição atribuída aos melhores resultados obtidos neste trabalho quando comparada ao PBS. O ácido 3-indol-acético (IAA) é o principal hormônio vegetal que compõe a água de coco. Tem sido mostrado que a adição de IAA no meio de cultivo (TCM-199) de FOPAs caprinos é mais efetiva na preservação destes quando comparada ao meio sem esta substância (FERREIRA et al., 2001). Estudos mostram que o IAA possivelmente se liga a fatores de crescimento presentes no tecido ovariano, promovendo a ativação dos mesmos, enquanto, simultaneamente, continua mantendo os padrões de permeabilidade e respiração celular, estas características podem ter contribuído para um melhor desempenho do ACP em relação ao PBS neste estudo (FERREIRA et al., 2001). Lima et al. (2010) atribuíram á composição mais complexa deste meio, os melhores resultados obtidos na manutenção da integridade morfológica folicular de cadelas, sob refrigeração, por curtos períodos.

Já foi demonstrado que a conservação de folículos pré antrais caprinos em solução a base de água de coco a 4°C pode ser realizada por até 24 h, permanecendo a integridade dos mesmos semelhante ao controle (SILVA et al., 1999). Ao contrário, os resultados do presente trabalho mostram que após o período de 4h houve uma redução na morfologia dos FOPA de catetos, quando comparado ao controle, utilizando ACP.

Esta discordância pode ser atribuída à diferença entre os protocolos ou ainda se sugere que FOPA caprinos podem ser mais resistentes ao transporte do que FOPA de animais silvestres como o cateto. Isso poderia ser atribuído a presença de grandes quantidades de gotas lipídicas no citoplasma do oócito dos catetos (dados não publicados), a qual é uma característica presente também nos suínos domésticos (WU et al., 2006).

A MET tem sido utilizada na avaliação de alterações iniciais na estrutura e distribuição de organelas celulares (SILVA et al., 2000; CARVALHO et al., 2001). Nestes estudos, folículos ovarianos classificados como morfolologicamente normais durante a avaliação histológica poderiam apresentar sinais de degeneração na microscopia eletrônica de transmissão (LUCCI et al., 2004). No presente estudo, as principais alterações encontradas foram nas mitocôndrias. Mitocôndrias e retículo endoplasmático edemaciados foram descritos em oócitos (SILVA et al., 2001; VAN DER HURK et al., 1998), células luteais (FIELDS et al., 1992) e em outros tipos celulares (KAASIK et al., 2007), sendo descritas como danos decorrentes de modificações no balanço iônico devido a alterações na permeabilidade da membrana plasmática (BORGES et al., 2009). Estudos mostram que danos nas mitocôndrias são os primeiros sinais de degeneração que ocorrem em folículos ovarianos caprinos durante o armazenamento *in vitro* (SILVA et al., 2001). A isquemia prejudica o metabolismo energético celular, o qual diminui a atividade da bomba Na^+/K^+ - ATPase, com ganho de sódio (BONZ et al., 1998). Durante a isquemia, a matriz mitocondrial fica edemaciada devido ao aumento de sódio (GARLID, 1996). Estas alterações foram ainda descritas em folículos mantidos em baixas temperaturas, com início de degeneração, em outras espécies como caprinos (SILVA et al., 2000), ovinos (MATOS et al., 2004), bovinos (LUCCI et al., 2004; CELESTINO et al., 2008), suínos (BORGES et al., 2009) e cadelas (LOPES et al., 2009).

Investigações sobre as modificações ultraestruturais nas vesículas lipídicas de oócitos imaturos de suínos foram realizadas após seu resfriamento a 10 °C e foram encontrados dois tipos de gotas de lipídios: vesículas escuras e homogêneas e vesículas cinzas com pontos elétron-lucentes (ISACHENKO et al., 1998). Estas vesículas de lipídios estão envolvidas no armazenamento de energia (LEHNINGER, 1972) e são importantes componentes estruturais para a membrana citoplasmática dos futuros embriões (ISACHENKO et al., 2001).

De acordo com McEvoy et al. (2000) os oócitos suínos tem um maior conteúdo de ácidos graxos totais do que os oócitos bovinos e ovinos, refletindo em uma reserva

de triglicerídios mais abundante. Além disso, na fração fosfolipídica, os oócitos suínos mostram um complemento de poliinsaturados muito maior do que os oócitos dos ruminantes, especialmente um conteúdo muito maior de ácido linoléico. É possível que a exposição a baixas temperaturas promova a liberação de ácidos graxos derivados dos triglicerídeos, resultando em uma grande quantidade de ácidos graxos livres, especialmente de ácido linoléico, nos oócitos suínos após o resfriamento. Evidências mostram que altas concentrações de ácidos graxos insaturados livres podem causar toxicidade em vários tipos celulares, e o ácido linoléico parece ser o mais tóxico (ANDRADE et al. 2005; CURY-BOAVENTURA et al. 2006). Isto poderia explicar a alta sensibilidade dos oócitos suínos a baixas temperaturas, o que poderia ser extrapolado aos catetos. Entretanto mais estudos são necessários para confirmar esta teoria no que diz respeito a esta última espécie.

A análise da integridade morfológica folicular tem sido largamente utilizada na avaliação da eficiência de tratamentos aos quais estes folículos são submetidos (CORTVRINDT et al. 1996; SILVA et al. 2000; CARVALHO et al. 2001; ANDRADE et al. 2002; LUCCI et al. 2007; 2004a,b; 2002), contudo, nem sempre a morfologia está correlacionada com a viabilidade folicular, sendo requeridos outros testes para análise desta (SANTOS et al., 2007).

Neste estudo foi realizada a análise da viabilidade folicular através do teste com azul de Trypan, na qual a redução na viabilidade folicular foi observada no mesmo tempo de conservação em que foi verificada a redução do percentual de folículos morfolologicamente normais, para ambos os meios utilizados. Entretanto a redução nas percentagens da viabilidade foi maior do que a observada na morfologia folicular.

Em bovinos, a viabilidade folicular foi mantida semelhante a do controle, mantendo-se os fragmentos de tecido ovariano em solução salina (0.9%) a 4°C por até 24h (CELESTINO et al., 2007). Nesta mesma espécie, ao utilizar solução a base de água de coco como meio de preservação de tecido ovariano a 4°C por até 18 h, não houve diferença entre a percentagem de folículos viáveis em relação ao controle (LUCCI et al., 2004).

Lopes et al. (2009) utilizaram o mesmo teste para avaliação da viabilidade folicular de cadelas e verificaram uma redução desta mesmo nos tratamentos que não diferiram do controle com relação a morfologia folicular. Resultados similares foram obtidos por Luz et al. (2009) na avaliação de tecido ovariano caprino criopreservado.

Vale ressaltar que a avaliação da habilidade folicular em retomar o seu desenvolvimento seria uma maneira mais precisa de se avaliar a viabilidade folicular/oocitária. Esta avaliação não pôde ser realizada no presente estudo uma vez que sistemas de cultivo *in vitro* ainda não foram desenvolvidos na espécie *Tayassu tajacu*.

Sêmen de diferentes espécies tem sido comumente transportado, para entrega, em caixas isotérmicas de poliestireno expandido contendo gelo reciclável no seu interior. Estas caixas, além de ocuparem pouco espaço e de serem leves, não demandam a necessidade de serem devolvidas ao lugar de origem, sendo uma maneira prática e barata de se transportar esse material (LINDE-FORSBERG, 2001). No transporte de sêmen canino verificou-se que as caixas isotérmicas de 5 L foram eficientes na manutenção de uma temperatura constante ($< 5^{\circ}\text{C}$) no decorrer de 30 h de armazenamento, entretanto, no referido estudo a temperatura ambiente foi controlada e mantida constantes durante todo o experimento. Os autores sugerem que em condições reais de transporte existam variações na temperatura ambiente que poderiam promover o aumento da temperatura interna destes recipientes (MOTA-FILHO et al., 2007), o que pode ter ocorrido no presente estudo.

Em cadelas este tipo de container foi utilizado com sucesso na preservação de FOPA, permitindo a manutenção da integridade morfológica semelhante aos FOPA frescos por até 24 h de armazenamento (LIMA et al., 2010). No presente estudo, após 36 h de armazenamento dos FOPA nas caixas isotérmicas, independente dos meios utilizados, houve redução da percentagem de FOPAs morfolologicamente normais, bem como após 24h houve redução da viabilidade folicular em relação ao controle. Entretanto, independente do meio utilizado, a manutenção da morfologia foi verificada em mais de 45% dos FOPAs e a da viabilidade folicular foi mantida em mais de 35% destes até as 24h. Apesar de diferir do controle, essa percentagem ainda proveria um número adequado de folículos a serem utilizados em outras técnicas, tais como cultivo *in vitro* e criopreservação, uma vez que a população folicular nesta espécie foi estimada em 33273.45 ± 3019.30 folículos (dados não publicados). Dados semelhantes foram verificados em cadelas, onde nesta espécie foi realizada a conservação de gametas femininos por curtos períodos em caixas isotérmicas de poliestireno expandido e, independente dos meios utilizados, foi mantida a integridade morfológica de mais de 50 % dos FOPA (LIMA et al., 2010).

3.6 CONCLUSÕES

Em conclusão, o meio a base de água de coco em pó constitui-se um meio mais adequado para o armazenamento de folículos pré antrais de catetos por curtos períodos do que o PBS, preservando a morfologia e viabilidade dos mesmos. Este estudo forneceu dados iniciais importantes à respeito da preservação de FOPAs de catetos, contudo estudos futuros são importantes para o estabelecimento de protocolos cada vez mais adequados de armazenamento dos mesmo, bem como de informações importantes para a utilização futura destes em programas de criopreservação e cultivo *in vitro*.

3.7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, N.I.; OHASHI, O.M.; GUIMARÃES, D.A.; PENDU, Y.L.; DIAS, H. **Alternativas de sistemas de produção de catitu (*Tayassu tajacu*) para pequena agricultura na Amazônia**. Manaus: Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em [HTTP://ftp.mct.gov.br/prog/ppg7/pdf/livro107.pdf](http://ftp.mct.gov.br/prog/ppg7/pdf/livro107.pdf) Acesso em: 03 Abr.2009.

ANDRADE, L.N.S.; LIMA, T.M.; CURI, R.; CARTRUCCI, A.M.L. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. **Toxicology In Vitro**. 19, 553–560, 2005.

ANDRADE, E. R.; AMORIM, C. A.; MATOS, M. H. T. et al. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. **Small Rum. Res.**, v. 43, p 235-243, 2002.

BIGAM, D. L., AND GRANT, D. R. Small bowel transplantation. In ‘Small Bowel Disorders’. (Ed. R.N. Ratnaik.) 508–516. **Oxford University Press: NewYork**, 2000.

BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 18, p 97-104, 1994.

BODMER, R.E.; BENDAYAN, N.Y.; MOYA, L.; FANG, T.G. Manejo de ungulados en la Amazonia Peruana: Analisis de su caza y comercializacion. **Boletín de Lima**, 70, 49-56. 1990.

BONZ, A.; SIEGMUND, B.; LADILOV, Y.; VAHL, C.F.; PIPER, H.M. Metabolic recovery of isolated adult rat cardiomyocytes after energy depletion: existence of an ATP threshold? **J. Mol. Cell. Cardiol.** 30, 2111–2119, 1998.

BORGES, E. N.; SILVA, R. C.; FUTINO, D. O.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; AMORIM, C. A.; BÃO, S. N.; LUCCI, C.M. Cryopreservation of swine ovarian tissue:

Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**. 59(2):195-200, 2009.

CARVALHO, F.C.A.; LUCCHI, C.M.; SILVA, J.R.V.; ANDRADE, E.R.; BÃO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of Braun–Collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. **Anim. Reprod. Sci.** 66, 195–208, 2001.

CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A. P.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology** v.74, p.1060-1065, 2010.

CELESTINO, J. J. H.; SANTOS, R. R.; LOPES, C. A. P.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; MELO, M. A. P.; BÃO, S. N.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Animal Reproduction Science** 108, 309–318, 2008.

CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V.A.; CELESTINO, J. J. H.; LOPESA, C. A. P.; CORREIA, J. C.; LIMA VERDE, I. B. MATOS, M. H. T.; BÃO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, 20, 640–647, 2008.

CORTVRINDT, R., SMITZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in vitro maturation of primary mouse ovarian follicles. **Hum Reprod** 11, 2648–2655, 1996.

COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; OHASHI, O. M.; LOBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Preservation of goat preantral follicles enclosed in small fragments of ovarian tissue in saline solution or TCM 199. **Small Rum Res.** 58:189–93, 2005.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Coleta e avaliação de sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*). **Biota Neotropica**, v.5, n.2, 2005.

CURY-BOAVENTURA, M.F.; GORJÃO, R.; LIMA, T.M.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. **Life Sciences** 78, 1448–1456, 2006.

FERREIRA, M.A.L.; BRASIL, A.F.; SILVA, J.R.V.; ANDRADE, E.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**, v. 55, p 1607-1617, 2001.

FIELDS, M.J.; BARROS, C.M.; WATKINS, W.B.; FIELDS, P.A. Characterization of large luteal cells and their secretory granules during the estrous cycle of the cow, **Biol. Reprod.** 46, 535–545, 1992.

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** 40, 789–799, 1993.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DER HUCK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Vet Quart** 2:78–80, 1994.

GARLID, K.D. Cation transport in mitochondria—the potassium cycle. **Biochim. Biophys. Acta** 1275, 123–126, 1996.

ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; MICHELMANN, H.M.; ALABART, J.L.; VAZQUEZ, I.; BEZUGLY, N.; NAWROTH, F. Lipolysis and Ultrastructural Changes of Intracellular Lipid Vesicles after Cooling of Bovine and Porcine GV-oocytes. **Anat Histol Embryol** 30: 333–338, 2001.

ISACHENKO, V.; SOLER, C.; ISACHENKO, E.; PEREZ-SANCHEZ, F.; GRISHCHENKO, V. Vitrification of Immature Porcine Oocytes: Effects of Lipid Droplets, Temperature, Cytoskeleton, and Addition and Removal of Cryoprotectant **Cryobiology**. 36: 250–253, 1998.

JEWGENOW, K., PENFOLD, K.L., MEYER, H.H.D., WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **J. Reprod. Fertil.** 112, 39–47, 1998.

KAASIK, A.; SAFIULINA, D.; CHOUBEY, V.; KUUM, M.; ZHARKOVSKY, A.; VEKSLER, V. Mitochondrial swelling impairs the transport of organelles in cerebellar granule neurons. **J. Biol. Chem.** 282: 32821–32826, 2007.

LAGUNA, L.E., NUNES, J.F. Avaliação físico-química da água de coco proveniente de frutos das variedades da praia e anão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n 21, p 156, 1997.

LEHNINGER, A.L. Biochemistry: the Molecular Basis of Cell Structure and Function. **New York: Worth Publishers**, 1972.

LIMA, G.L.; COSTA, L.L.M.; CAVALCANTI, D.M.L.P.; RODRIGUES, C.M.F.; FREIRE, F.A.M.; Fontenele-Neto, J.D.; Silva, A.R. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP1)-based medium. **Theriogenology** v. 74 , p. 46–152, 2010.

LINDE-FORSBERG, C. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In: Conannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C, editors. Recent advances in Small Animal Reproduction'. New York: **International Veterinary Information Service**. p. 15. 2001

LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A. P.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N. JEWGENOW, K.;

FIGUEIREDO, J.R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. **Animal Reproduction Science**. v. 115, p. 201-214 2009.

LUCCI, C. M., SCHREIER, L. L., MACHADO, G. M., AMORIM, C. A., BÁO, S. N., AND DOBRINSKY, J. R. Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of preantral follicles. **Reprod. Domest. Anim.** 42, 76–82, 2007.

LUCCI, C.M., KACINSKIS, M.A., RUMPF, R., BÁO, S.N. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology** 61, 461–472, 2004a.

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; LOPES, L.H.R.; RUMPF, R.; BÁO, S.N. Effects of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology** 61, 1101–1114, 2004b.

LUCCI CM, RUMPF R, FIGUEIREDO JR, BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology** 57, 1467–1483, 2002.

LUZ, V. B.; SANTOS, R. R.; PINTO, L. C.; SOARES, A. A. X.; CELESTINO, J. J. H.; MAFEZOLI, J.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Dimethyl sulfoxide perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after cryopreservation. **Fertility and Sterility**. V. 91, No. 4, Supplement. 1512- 1515, 2009.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; MC CAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of Follicle Stimulating Hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. **Biol Reprod** 67, 1197–1203, 2002.

MARQUES, A.L.V. Água de coco. **Informativo Socego**, n. 2, p 92, 1982.

MATOS, M. H. T.; ANDRADE, E. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, v.62, p.65-80, 2004.

MCEVOY, T.G.; COULL, G.D.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.; SPEAKE, B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **J Reprod Fertil**. 118, 163–170, 2000.

MOTA-FILHO, A. C.; CASTELO, T. S.; COSTA, L. L. M.; LIMA, G. L.; SILVA, A. R. Conservação do sêmen canino sob refrigeração em diferentes caixas isotérmicas. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.3, p.78-83, 2007

NUNES, J. F., SALGUEIRO, C. C. M., GONDIM, J. M. Novos produtos com base na água de coco em pó. In: 12ª SEMANA INTERNACIONAL DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA - FRUTAL 2005, 2005, **Anais...** Fortaleza, 2005.

PAYNTER, S. J. et al. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. **Cryobiology**. v. 38, p. 301- 309. 1999.

SALEHI, P., SPRATLIN, J., CHONG, T. F., AND CHUCHILL, T. A. Beneficial effects of supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage. **Cryobiology** n. 48, p. 245–253, 2004.

SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R. Vitrication of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrication methods. **Cell Tissue Res.** 327, 167–17, 2007.

SANTOS, R. R.; SILVA, J. R. V.; COSTA, S. H. F. et al. Effect of 0.9% saline solution and Phosphat Buffer Saline at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, p 254-259, 2002.

SILVA, A. R.; MORATO, R. G.; SILVA, L. D. M. The potential of gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal Reproduction Science**, v.81, p 159-175, 2004a.

SILVA, J.R.V.; BÃO, S.N.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A.; ANDRADE, E.R.; FERREIRA, M.A.L.; FIGUEIREDO, J.R. Morphological and ultrastructural changes occuring during degeneration of goat preantral follicles preserved in vitro. **Anim. Reprod. Sci.** 66, 209–223, 2001.

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C. M.; CARVALHO, F. C. A.; BÃO, S.N.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in situ. **Theriogenology**, v.54, p.809-822, 2000.

SILVA, J. R. V.; CARVALHO, F. C. A.; LUCCI, C. M.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. Conservação de Folículos Pré-Antrais Caprinos *In Situ* Em Solução À Base de Água de Coco. **Ciência Animal**, n. 9, p 27-36, 1999.

SILVA, J. R. V., CARVALHO, F. C. A., LUCCI, C. M., CARVALHO, R. S. M. & SANTOS, R. R., FIGUEIREDO, J. R. 1998. Efeito da água de coco, solução Braun-Collins, temperatura e tempo de incubação sobre a viabilidade de folículos pré-antrais caprinos in vitro. In: **Anais do VII Encontro de Iniciação Científica da UECE**, Fortaleza, CE, v. 1, p. 284, 1998.

SOUZA, A.L.P.; CASTELO, T.S.; QUEIROZ, J.P.A.F.; BARROS, I.O.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by eletroejaculation. **Animal Reproduction Science**. 116, 370-375, 2009.

VAN DEN HURK, R.; SPEK, E.R.; HAGE, W.J.; FAIR, T.; RALPH, J.H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Hum. Reprod. Update** 4, 833–841, 1998.

VEIGA, J.B.; TOURRAND, J.F.; QUANZ, D. Agropecuária na Transamazônica. O caso do Município de Uruará. **Documento de Pesquisa**. Belém, PA: EMBRAPA. P. 54. 1995.

WONGSRIKEAO, P., OTOI, T., KARJA, N.W. K., AGUNG, B., NII, M., AND NAGAI, T. Effects of ovary time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **J. Reprod. Dev.** 51, 87–97, 2005.

WU, C.; RUI, R.; DAI, J.; ZHANG, C.; JU, S.; XIE, B.; LU, X.; ZHENG, X. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. **Mol Reprod Dev** 73, 1454–62, 2006.

ANEXO I – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “ESTIMATIVE AND CHARACTERIZATION OF THE OVARIAN FOLLICULAR POPULATION OF COLLARED PECCARIES (*Tayassu tajacu* LINNAEUS, 1758)” Á REVISTA *REPRODUCTION*

22-Dec-2010

Dear Dr. Silva:

Your manuscript entitled 'Estimative and characterization of the ovarian follicular population of collared peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758)' has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in *Reproduction*.

Your manuscript ID is REP-10-0534.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence with the editorial office. If there are any changes to your contact information, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/rep> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/rep>.

Manuscript submissions are screened against the CrossCheck database to check for originality.

Thank you for submitting your manuscript to *Reproduction*.

Best wishes

Reproduction Editorial Office

Email: reproduction@bioscientifica.com

BioScientifica Ltd., Reg in England no. 3190519, 22 Apex Court, Woodlands, Bradley Stoke, Bristol, BS32 4JT, United Kingdom

ANEXO II - “ESTIMATIVE AND CHARACTERIZATION OF THE OVARIAN FOLLICULAR POPULATION OF COLLARED PECCARIES (*Tayassu tajacu* LINNAEUS, 1758)”

Original do trabalho: Estimativa e caracterização da população folicular de catetos (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). Submetido para publicação na *Reproduction*.

Estimative and characterization of the ovarian follicular population of collared peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758)

Gabriela L. Lima¹, Érica A.A. Santos¹, Diogo M.L.P. Cavalcanti², Valesca B. Luz³, Ana Paula R. Rodrigues³, José R. Figueiredo³, José D. Fontenele-Neto¹, Alexandre R. Silva¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, BR 110, Km 47, Presidente Costa e Silva, 59625-900, Mossoró, RN, Brazil.

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Almeida Prado, 1280, Butantã, São Paulo, SP, Brazil.

³Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré Antrais, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, Itaperi, Fortaleza, CE, Brazil.

⁴Department of Animal Sciences, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, BR 110, Km 47, Presidente Costa e Silva, 59625-900, Mossoró, RN, Brazil .

Correspondence should be addressed to AR Silva; E-mail: legio2000@yahoo.com

Abstract

The aim of this research was to estimate the preantral ovarian follicular population and to describe the follicular features using light microscopy and transmission electron microscopy. Pairs of ovaries were collected from six mature females of *T. tajacu*, and further fixed for histological and ultrastructural analysis. A total of 33273.45 ± 3019.30 preantral follicles (PF) were estimated for the population in each ovary. The majority of the follicles that were found, belong to the primordial category (91.56%), followed by primary (6.29%) and secondary (2.15%) ones. The vast majority of PF were morphologically normal (94.4%) and only a few were atretic (0.6%). At histology assessment, amounts of lipids droplets were observed into the oocyte cytoplasm, shown as vacuoles, which was confirmed through ultrastructural analysis. This work shows for the first time an estimation of the ovarian population of preantral follicles, total and per category, and also the characterization of these follicles in collared peccaries (*Tayassu tajacu*). The general follicles featured at primordial, primary and secondary categories are very similar to those described for other species.

Keywords preantral follicles, light microscopy, ultrastructure

1. Introduction

The sustainable usage of wildlife adapted to certain environmental conditions could help forests' conservation, once there would not be necessary to modify the environment to maintain those species. This activity could become an alternative to diversify the production causing less damage to the environment than others livestock's activities (Nogueira-Filho & Nogueira, 2000). The exploiting of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) can improve the preservation and management of local biodiversity. Economic interest by wild animal meat, especially which derived from collared and white-lipped peccary (*T. pecari*), has stimulated producers to invest in captive breeding of these species (Santos, 2002). Besides the appreciation of its meat, another product from *Tayassu tajacu* quietly valued is its skin. It is used to make gloves, belts and belt watches, and it has a stable demand in the international market. Countries such as Germany, Italy and Japan are the main buyers (Bodmer & Pezzo, 1999).

Although collared peccaries belong to a separate family within the swine forms - the Tayassuidae,- due to general similarities with the domestic pig (*Sus scrofa*); many data regarding their reproductive behavior in the literature, has been extrapolated from this specie (Mayor et al., 2006; Gottdenker & Bodmer, 1998). A deep knowledge of the reproductive biology of the collared peccaries is important to optimize the zootechnical performance of them. Unfortunately this is still poorly known and appropriate management practices have not been developed for this specie yet.

Nevertheless, considerable effort has improved the knowledge of the reproductive biology of the captive collared peccary during the recent years (Mauget et al., 1997; Dutertre et al., 2001; Mayor et al., 2005, 2006, 2007). Besides, those data were rare and focused specially on males (Costa & Paula, 2005; Souza et al., 2009; Castelo et al., 2010).

The use of reproductive biotechniques, especially those focused on gametes conservation, improves the maintenance and exchange of genetic material from animals with high commercial value or in endangered situation (Silva et al., 2004).

The morphological and functional properties of ovarian follicles represent objective of recent research in many species of animals, because quantity and quality parameters of the follicular population define potency in reproduction. In addition, deeper knowledge of follicular development gives an opportunity to increase efficiency in biotechnological methods of reproduction (Doležel et al., 2004).

Mayor et al. (2006) described the ovarian features of *T. tajacu* showing some aspects of ovarian follicles such as classification and measurement, however, there is a lack of information regarding the quantity and quality of preantral follicular population of collared peccaries females, as well as its atresia rate.

The aim of this research was to estimate the preantral ovarian follicular population, at total and per categories, and also to describe the follicular features using light microscopy and transmission electron microscopy, according to the categories of follicles, as well as assess in its morphometry.

2. Material and Methods

The experiment was conducted at Laboratory of Animal Germplasm Conservation – UFERSA, at Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil, as well as at Laboratory of Manipulation of Preantral Ovarian Follicles of UECE, Fortaleza, Ceará, Brazil.

2.1. Animals

The animals used in this research belong to the Centre of Multiplication of Wild Animals – UFERSA, located in the northeast of Brazil (Mossoró, RN, Brazil; 5°10'S, 37°10'W). The climate is typical semi-arid, with an average annual temperature of 27 °C. This centre is registered as a scientific breeding at the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (nº 1478912). Nowadays, this centre shelters a population of 300 collared peccaries (*Tayassu tajacu*), and a programmed slaughter is conducted every year for population control. The animals are destined for several experiments.

For the present research, six mature females, aging 3–4 years old, weighting 21.67 ± 2.08 Kg (minimal 17.3 and maximal 24.0 Kg) were used. Experimental protocols and animal care practices were approved by the research committee of the UFERSA, Mossoró, Brazil.

2.2. Source and preparation of ovaries

Pairs of ovaries from females collared peccaries (n=6) were removed aseptically following slaughtering. After removal from the bursa ovarica, ovaries were rinsed once with 70% ethanol for 10 s, twice in sterile phosphate-buffered saline (PBS) and eventual corpora lutea were excised using a scalpel. The number of corpora lutea was counted per ovary.

The width, thickness and length of each ovary were measured using a caliper rule. Besides, the ovarian weigh was checked, using a digital balance (FA 2104N, Bioprecisa, São Paulo, Brazil). Ovaries were cut longitudinally into two halves. One of the two halves was immediately fixed in Carnoy for 4 hours to perform the estimative of follicular population and one portion of it was fixed in glutaraldehyde for transmission electron microscopy.

2.3. Histological analysis

After fixation in Carnoy for 4 h, the ovarian half was dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene, embedded in paraffin wax and serially sectioned at 7µm. Every 120th section was mounted on glass slides, stained with hematoxylin–eosin and evaluated by light microscopy at a 1000× magnification (Zeiss, Germany) (Carl Zeiss Optical Inc., Chester, USA). At the evaluation moment, images were recorded by microphotographs.

2.4. Follicular population estimative

The preantral follicles (PF) presenting a visible nuclei were classified as primordial, primary and secondary according to Hulshof et al. (1994), and counted for quantitative assessment in all the glass slides. The PF population was estimated by using the following formula: number of follicles x number of sections x thickness of sections ÷ by number of sections observed x range of oocyte nuclei diameter (Lucci et al., 1999). The follicular measurements were done using an ocular micrometer.

2.5. Assessment of preantral follicles integrity

The PFs were identified and classified by optical microscopy (1000x) according to their integrity. Follicular morphology was evaluated based on the integrity of the oocyte, granulosa cells and basement membrane. PFs were classified and counted as morphologically normal, when containing an oocyte with regular shape and uniform cytoplasm, and organized layers of granulosa cells, or 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. To avoid evaluating and counting a follicle more than once, preantral follicles were analyzed only in the sections where oocyte nucleus were observed (Lopes et al., 2009).

2.6. Ultrastructural analysis

In order to better examine the follicular morphology, transmission electron microscopy (TEM) was performed to analyze the PF ultrastructure. A portion with a maximum dimension of 1mm³ was cut from the ovary and fixed in glutaraldehyde solution 0.1 M (pH 7.2) for 3 h at room temperature (RT, approximately 25 °C). Further, specimens were post-fixed in 2% osmium tetroxide, in 0.1M sodium cacodylate buffer for 2 h at RT. The samples were then dehydrated through a graded series of ethanol (three washes of 15 minutes at each one), followed by two washes of 15 minutes at propylene oxide. After this, samples were embedded in a propylene oxide and Spurr's resin solution (1:1) for 8 hours, thereafter maintained in Spurr's epoxy resin, overnight. Then, specimens were embedded in Spurr's resin at 60°C for 48 hours, after that it were kept at room temperature.

Afterwards, semi-thin sections (0,5µm) were cut, stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy at a 400× magnification. Ultra-thin sections (60–70 nm) were obtained from preantral follicles classified as morphologically normal in semi-thin sections, according to the criteria adopted in histology. Subsequently, ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Morgagni 268 D (FEI Company, Hillsboro, USA) transmission electron microscopy operating at 80 kV.

2.7. Statistical analysis

Six replicates were conducted. The comparisons of follicular population among the follicular classes, as well as the comparisons of diameters of follicles, oocytes and oocyte's nuclei among the follicular classes were performed by ANOVA one way. Data were expressed as mean and standard error of means (SEM). Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

The pair of ovaries weighted 2.73 ± 0.63 g (minimal 2.12 and maximal 3.64 g). The length, width, and thickness of each ovary were measured, the values were 1.26 ± 0.22 , 1.04 ± 0.1 and 0.98 ± 0.11 mm respectively.

The ovaries from the sexually mature female collared peccaries were ovoid bodies, relatively symmetric, with a smooth surface except when corpora lutea were present. In all the animals, corpora lutea were present. Two animals presented one corpora lutea in each ovary; and four animals presented the two corpora lutea in the same ovary. A total of 12 corpora lutea were observed. That structure was an ovoid body protruding from the surface of the ovary, which showed an irregular aspect due to the presence of the corpora lutea (Figure 1).

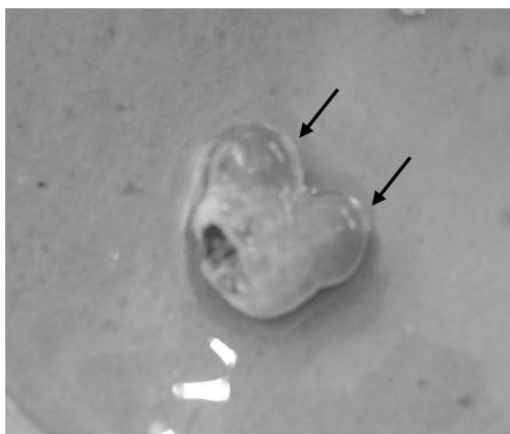


Figure 1. Ovary of collared peccary (*Tayassu tajacu*) showing two corpora lutei (arrows).

At histology, the ovary present one external layer of cuboidal cells, characterizing the germinative epithelium. Immediately below, a region formed by dense conjunctive tissue, with a few blood vessels, the tunica albuginea, was observed. Below this, there is a layer of conjunctive tissue forming the stroma, which contains the follicles. Scattered smooth muscle fibers appeared in the stroma around the follicles (Figure 2).

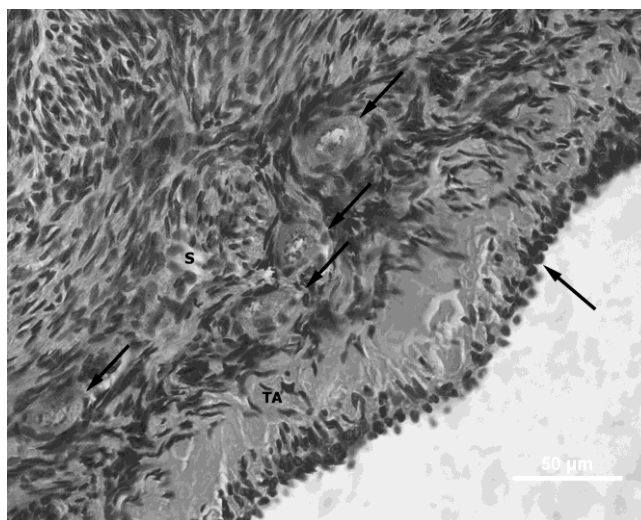


Figure 2. Histological assessment of ovary of *Tayassu tajacu*. Germinative epithelium (arrow), tunica albuginea (TA), stroma (S) and follicles (full narrows).

Histological analysis in situ showed that primordial follicles were found in the cortex just beneath the tunica albuginea. They are characterized by an oocyte surrounded by one layer of squamous or squamous–cuboidal granulosa cells, which are resting on a basement membrane. Primary follicles were situated in the periphery of the cortex, presenting a single layer of cuboidal granulosa cells surrounding the oocyte. Secondary follicles have an oocyte surrounded by two or more concentric layers of cuboidal granulosa cells; between those structures, the zona pelucida was observed, presenting $2.72 \pm 0.28 \mu\text{m}$ (ranging from 2.5 to $3.2\mu\text{m}$). The internal theca was formed by elongated and fusiform cells appearing as concentric layers.

Polyovular PFs were observed in all the animals and they were more frequently present in primordial follicles category. They represented 2.76% of the total PFs counted (Figure 3).

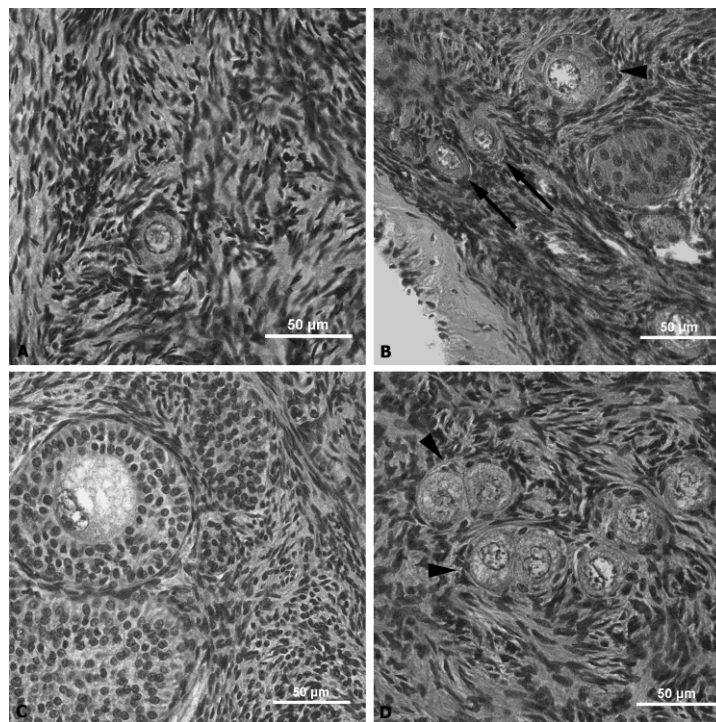


Figure 3. Histological features of collared peccary (*Tayassu tajacu*) ovary. Primordial follicle (A) displaying an oocyte with a large nucleus, surrounded by one layer of flattened cells and some vacuoles into the cytoplasm, indicatives of lipid droplets. (B) Primordial (full arrows) and primary follicles (arrow). Primary follicle is characterized by an oocyte displaying a large nucleus and homogenous cytoplasm surrounded by one complete layer of cuboidal granulosa cells. (C) Secondary follicle showing two or more layers of cuboidal granulosa cells. Note the theca interna formed by elongated and fusiform cells appearing as concentric layers externally at the granulosa layers. (D) polyovular follicles (arrows) containing two oocytes surrounded by only one layer of granulosa cells.

A total of 33273.45 ± 3019.30 PFs were estimated as the population in each ovary of *T. tajacu*. The follicular population in each category was also estimated and the results are shown at Table 1. The most of the follicles found belong to the primordial category (91.56%), followed by primary (6.29%) and secondary (2.15%) ones.

Table 1.

Preantral follicular population (Mean $\pm$ standard error) of collared peccaries'

(*Tayassu tajacu*) ovaries at different categories of follicles.

Follicle category	Follicle population (Mean $\pm$ standard error)	Percentage of follicles (%)
Primordial	30466.59 $\pm$ 3019.30 ^a	91.56
Primary	2093.93 $\pm$ 3019.30 ^b	6.29
Secondary	712.93 $\pm$ 3019.30 ^b	2.15
Total	33273.45 $\pm$ 3019.30	100.00

^{a,b}Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

The vast majority of PFs were morphologically normal ($94.4\% \pm 1.54$) and only a few were atretic (5.6%) *in situ*. Morphologically normal PFs showed a spherical or elliptical oocyte with a large central or eccentric nucleus and uniform cytoplasm. Granulosa cells without pycnotic nuclei were well-organized in layers surrounding the oocyte, and a distinguishable intact basement membrane was observed (Figure 4). Degenerated follicles showed a retracted oocyte with or without a pycnotic nucleus. Granulosa cells remained unaltered or became disorganized, and they were sometimes swollen and/or detached from the basement membrane. Occurrence of pycnotic bodies in granulosa cells or rupture of the basement membrane were not observed (Figure 5).

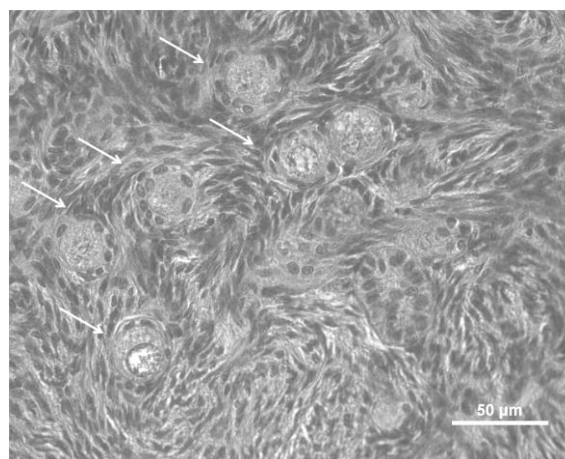


Figure 4. Morphological normal follicles (arrows) displaying eccentric nucleus and uniform cytoplasm. Granulosa cells without pycnotic nuclei are well-organized in layers surrounding the oocyte.

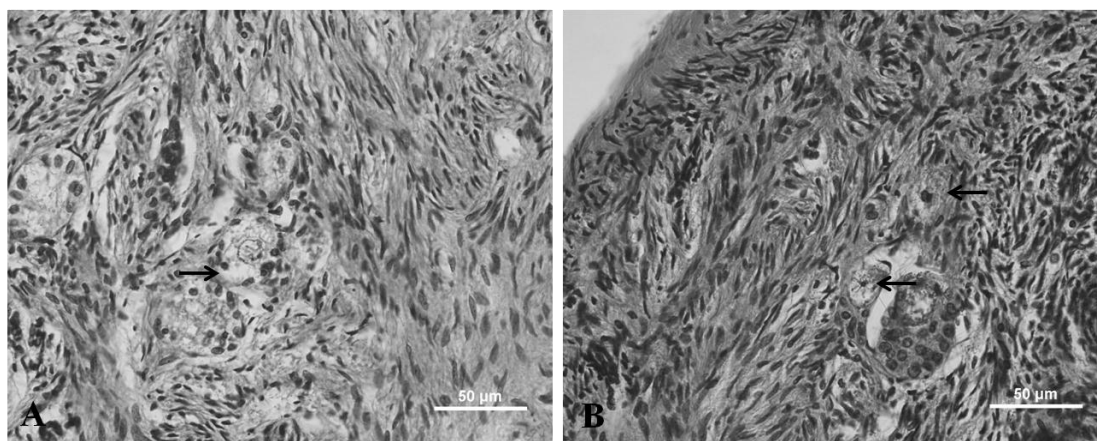


Figure 5. Degenerated follicles displaying ooplasm retraction and disorganization of granulosa cells (A) and pycnotic nuclei of oocyte (B).

Diameters of the follicles, oocytes and nucleus at each follicular category were shown at Table 2. A significant difference was observed among secondary and the others follicular categories diameters, however it was not observed difference between the primordial and primary follicles.

Additionally, at histology assessment, amounts of lipids droplets were verified into the oocyte cytoplasm, shown as vacuoles, which was confirmed through ultrastructural analysis.

Table 2.

Diameters of follicle, oocyte and nuclei at each follicle category (Mean $\pm$ standard error) of collared peccaries' (*Tayassu tajacu*) follicles.

Follicle category	Diameter of Follicle (Mean $\pm$ standard error)	Diameter of Oocyte (Mean $\pm$ standard error)	Diameter of Nuclei (Mean $\pm$ standard error)
Primordial	31.82 $\pm$ 9.95 ^a	25.43 $\pm$ 3.08 ^a	14.34 $\pm$ 0.97 ^a
Primary	40.90 $\pm$ 9.95 ^a	28.96 $\pm$ 3.08 ^a	15.04 $\pm$ 0.97 ^a
Secondary	196.21 $\pm$ 9.95 ^b	72.77 $\pm$ 3.08 ^b	21.77 $\pm$ 0.97 ^b

^{a,b}Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Electron microscopy studies revealed that primordial oocytes show a distinctive nucleus. It has an irregular aspect due to deep invaginations. The chromatin is arranged

as euchromatin, however, few heterochromatin clumps were found scattered through the nucleus. The nucleolus was distinct and granulated. The nuclear pores were evident and showed an electron dense aspect on both sides of the nuclear membrane (Figure 6).

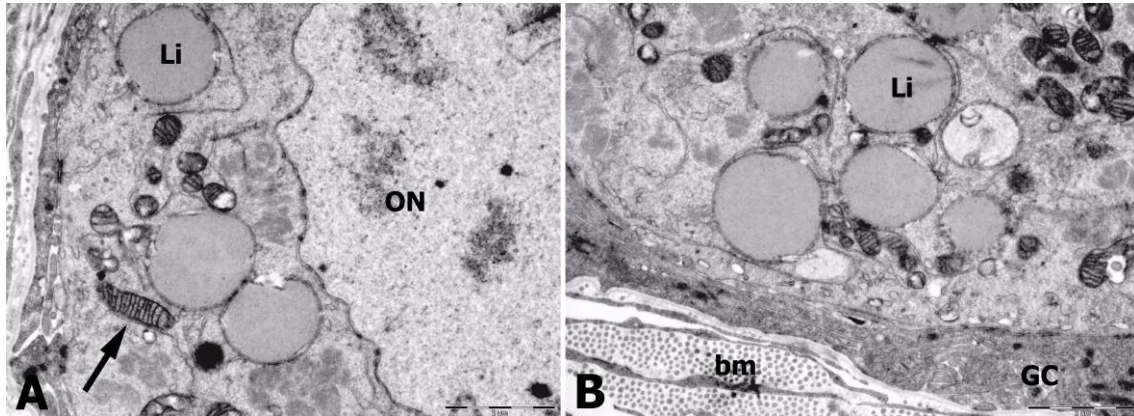


Figure 6. Electron micrographs of *Tayassu tajacu* follicles. (A) ON, nuclei oocyte; Li, lipids droplets; mitochondria (arrow). (B) GC, granulosa cell; bm, basement membrane.

The oocyte cytoplasm showed several mitochondria dispersed through it; many vacuoles and lysosomes were also frequently observed. Few profiles of endoplasmic reticulum were found; the Golgi apparatus was well developed and somehow concentrated in one pole of the cell. Protein inclusions arranged as crystalloid were frequently observed and were a typical structure of this cell type. Lipide droplets were also common (Figure 7).

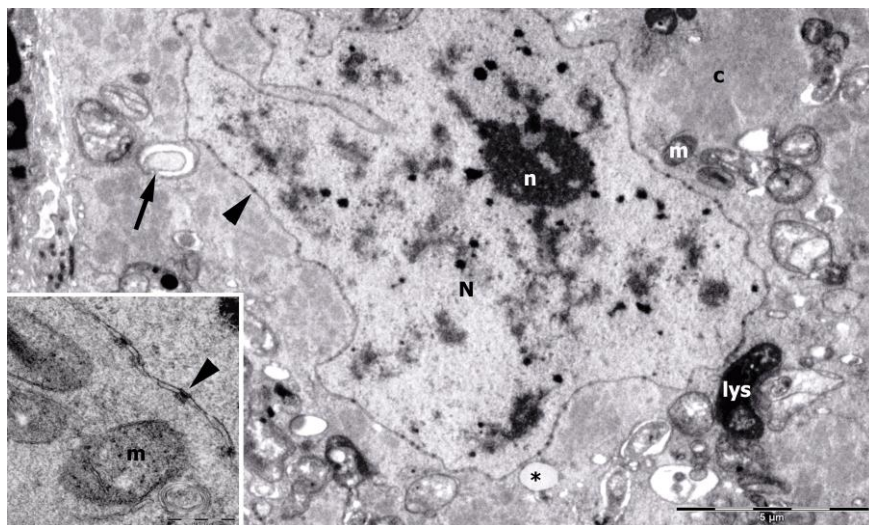


Figure 7. Electron micrograph of *Tayassu tajacu* follicle showing the oocyte nuclei. N, nuclei oocyte; n, nucleoli; nuclei pore (arrowhead); m, mitochondria; lys, lysosome; c, crystalloid; multilamellar inclusion (arrow); * vacuole.

Flattened granulosa cells associated to the oocyte presented a dark elongated nucleus where heterochromatin was abundant; the cytoplasm was dark due to several free ribosomes. Adhesion junction was found between this cell and the oocyte. Underneath the follicular cell, there was a lamina basal-like structure (Figure 8).

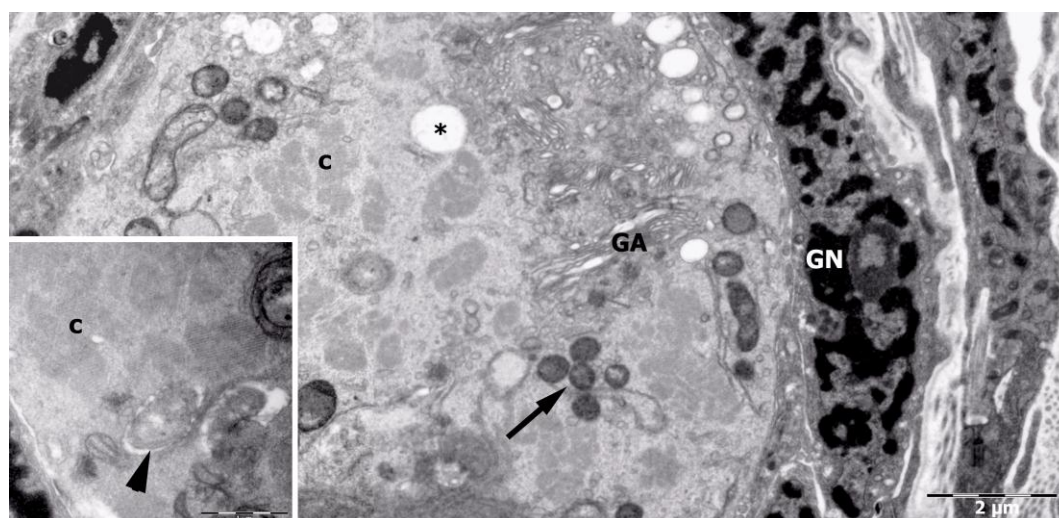


Figure 8. Electron micrograph of *Tayassu tajacu* follicle. GN, nuclei of granulosa cell surround the oocyte; GA, Golgi apparatus; mitochondria (arrow); protein inclusion arranged as crystalloid (c); * vacuoles; multilamellar inclusions (arrowhead).

4. Discussion

To the best of our knowledge, the present is the first research that estimate and characterize the ovarian follicular population in collared peccaries. This kind of research is important to acquire more knowledge about the reproductive biology in this specie and together with other biotechniques such as cryopreservation, *in vitro* culture, maturation and fertilization, could help on the conservation of female gametes, allowing the formation of cryobanks and contributing to the preservation, and also for the development of new management techniques of the species.

The general ovarian features found in this study are according to those described by Mayor et al. (2006) for the same species. In fact, growing follicles were visible as transparent bodies at the surface of ovary as described by the authors. In the other hand, those aspects were different of those presented for domestic pig, in which the ovary was described as an ovoid body with a very irregular surface because of the presence of a lot of salient growing follicles and protrude corpora lutea above the ovarian surface (Dyce et al., 1987; Getty, 1982; Schwarze, 1984; Hafez, 1995).

In addition, the constituent cell types as well as the histological structure of the ovary of the collared peccary were found to be similar to those described for other mammalian species (Mossman & Duke, 1973; Hafez, 1995; Celestino et al., 2004).

The preantral follicle population per ovary found for collared peccaries is similar to that reported for caprine, in which $45,127 \pm 7,784$ follicles were described for prepubertal females, $32,204 \pm 4,583$ for non-pregnant adults and $35,608 \pm 9329$ for pregnant adults (Lucci et al., 1999). Results are also similar to those reported for ovine fetuses, in which $32,961 \pm 16,627$ follicles were found per ovary, but only $16,627 \pm 4,178.1$ follicles were found in non pregnant ewes (Amorim et al., 2000), using the same methodology described in present study. In swine, a population of 420 000 primordial follicles per pair of ovaries is described (Gosden & Telfer, 1987), which is a value higher than that found for total follicular population in *Tayassu tajacu*, including all follicular categories. These results evidence that there are large discrepancies between collared peccaries and domestic swine with regards to reproductive aspects, and not all the data could be extrapolated from one species to the other.

In many mammalian species, PF populations may be affected by factors such as age, hormone levels and reproductive stage and nutrition (Erickson, 1966a; 1966b; Erickson et al., 1976; Scaramuzzi et al., 1993). Further studies are required in order to

investigate the influence of those factors on the ovarian follicular population of collared peccaries.

Mayor et al. (2006) estimated mean ovulation rate in the collared peccaries as 2.3 ± 0.6 follicles, which is a very low value when compared with the domestic swine (10-24 follicles). These authors suggest that the low mean ovulation rate of the collared peccary could act as a biological limit for the prolificacy of the specie, since that the females have a litter size of 1.7–1.9 fetuses or newborns (Mayor et al., 2005).

Furthermore, a low PF population was verified for collared peccaries in the present study, which could also contribute for the low ovulation rate and the low number of fetuses per pregnancy in this species, however, the relationship among those factors should be object of further investigation.

Additionally, the ovarian follicular population of collared peccaries is heterogeneous, presenting follicles at different stages of development, which is a characteristic described for other species such as sheep (Cahill & Mauléon, 1981), rat (Mariana, 1978), mouse (Lintern-Moore & Moore, 1979), bitch (McDougall et al., 1997), cat (Jewgenow & Göritz, 1995), pig (Greenwald & Moor, 1989) and ewe (Lucci et al., 1999).

Regarding to PF categories in collared peccaries, most of the follicles observed consists of a large reserve of quiescent primordial follicles and a much smaller number of follicles are in the growth phase. It is known that in mammalian species, prior to puberty, as well as into more advanced reproductive age, most of the follicles are primordial, as a consequence of adequate stimuli, those follicles are activated. The follicles entering into the growing phase are characterized by morphological and functional modifications (Martelli et al., 2009). The histological characteristics verified for each follicular category are similar to data previously described for the same species

(Mayor et al., 2006), and also for the domestic pig (Greenwald & Moor, 1989). In addition, histological analysis showed that the vast majority of collared peccaries PFs were morphologically normal and only a few PFs were atretic, as also described for pigs by Borges et al. (2009). The atresia rate observed in this study was similar to the described to caprine ($4.8\% \pm 0.4$) by Lucci et al. (1999), but was higher than described by Amorim et al. (2000) to ovine (0.2%). Similar as described in goats (Amorim et al., 2000), irregular spaces were verified between the layers of granulosa cells in secondary follicles in situ Hirshtield (1983) suggested that the irregular spaces observed in granulosa cells of secondary follicles is a sign of premature antrum formation.

The presence of polyovular PFs were verified for collared peccaries. This kind of follicles were previously described in pigs as clusters with an incomplete covering of pregranulosa cells surrounding nests of oocytes, some of which were juxtaposed with no intervening pregranulosa cells (Greenwald & Moor, 1989). In cattle and sheep, the oogonia were found side by side in fetal life, forming clusters in the gonads. The accompanying somatic cells, which are probably the precursors of the follicular cells, are also included in the clusters. Starting from the second third of gestation, the isolation of the oocytes starts with an increase in the number of accompanying somatic cells (Russe, 1983). In ruminants, it is believed that the incomplete isolation of the oocytes originates the polyovular follicles that persist in postnatal life (Lucci et al., 1999). This phenomenon would also happen in other species such as the collared peccary. Although this kind of follicles appears to be normal in different mammalian species, in which they are seen with a variable frequency, their role remains unknown (Lucci et al., 2002).

In collared peccaries, the diameter of follicle, oocyte and nuclei were similar among primordial and primary follicles, but different when compared to secondary

ones. The same pattern was not observed in caprine PFs (Lucci et al., 1999), in which there were differences in the diameter of all follicular categories (primordial $20.05 \pm 0.31 \mu\text{m}$, primary $24.42 \pm 0.32 \mu\text{m}$, secondary $44.24 \pm 3.61 \mu\text{m}$). In bitches, Lima et al. (2010) found the following values for the follicular diameters: 12–30 μm for primordial, 22–48 μm for primary and 40–120 μm for secondary follicles.

Present results are according to the range showed by Mayor et al. (2006) that presented the measures of *T. tajacu* follicles. About oocyte diameters, the same authors found $20.5 \pm 3.6 \mu\text{m}$ (16.3-23.1) for primordial follicles, $22.9 \pm 4.3 \mu\text{m}$ (19.3 – 24.2) for primary and $84.6 \pm 24.2 \mu\text{m}$ (51.9-106.2) for secondary ones, and there were no differences between oocyte diameters of primordial and primary follicles.

Light microscopy showed that there are a lot of lipids droplets among the oocyte cytoplasm in collared peccaries, and this information was confirmed by electron microscopy. The ultrastructural analysis showed that the oocyte presented a large and very irregular central nucleus well-delimited by the nuclear envelope. That irregularly characteristic of nuclei was also verified in domestic pigs (Greenwald & Moor, 1989), but further researches are suggested in order to clarify if it is an artifact or a specie characteristic. In addition, the uniform distribution of the organelles among with the cytoplasm and the presence of round mitochondria as the most evident organelle, followed by lipid droplets, were also previously described for domestic swine (Borges et al., 2009; Greenwald & Moor, 1989).

Isachenko et al. (1998) investigated the ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles of porcine immature oocytes after cooling to 10°C and found two kinds of lipid droplets: “dark” homogeneous vesicles and “gray” vesicles with electron-lucent streaks (Isachenko et al., 2001). Lipids in the oocytes are mainly involved in energy storage (Lehninger, 1972), and are also important building materials for the

cytoplasmic membranes of future embryos (Isachenko et al., 1998), constituting the cytoplasmic organelles, and regulating physiological function. According to Isachenko et al. (2001) the fact that the volume of mitochondria as well as lipid vesicles increases during oocyte development to the M-II stage (Dvorak, 1989) indirectly confirms the role of lipids as constituting membranes and as energetic resource. Porcine oocytes have higher lipid content than oocytes of other species (Wu et al., 2006), and this also seems to be a characteristic for collared peccaries.

In conclusion this work shows for the first time an estimation of the population of preantral follicles at total and per categories in collared peccaries ovaries which is very low when compared to domestic swine. The general follicles features at primordial, primary and secondary categories are very similar to those described for other mammalian species. Additionally, ultrastructural analysis showed that the oocytes of collared peccaries have a lot of lipids droplets. Those observations showed that contrary to what is commonly done, not all the data could be extrapolated from the domestic swine to the collared peccaries. And deeper researches are required for the best understanding of the reproductive features in this specie.

References

- Amorim, C.A., Lucci, C.M., Rodrigues, A.P.R., Carvalho, F.C.A., Figueiredo, J.R., Rondina, D., Cecchi, R., Giorgetti, A., Martini, A., Gonçalves, P.B.D. 2000. Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. *Theriogenology* 53, 1251-1262.
- Bodme, R., Pezo, E. 1999. Análisis Económico Del uso de fauna silvestre em la Amazônia Peruana. In: *Manejo y Conservación de Fauna Silvestre em América Latina*. (Ed) en: Instituto de Ecología. La Paz – Bolívia, pp171-182
- Borges, E.N., Silva, R.C., Futino, D.O., Rocha-Junior, C.M.C., Amorim, C.A., Bão, S.N., Lucci, C.M. 2009. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of

different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes
Cryobiology 59, 195-200.

- Cahill, L.P., Chamley, W.A. 1982. An influence of the number of ovaries on the population of primordial follicles in the sheep Proc Aust Soc Reprod Biol. 14, 77, Abstr
- Castelo, T.S., Bezerra, F.S.B., Souza, A.L.P., Moreira, M.A.P., Paula, V.V., Oliveira, M.F., Silva, A.R. 2010. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders Theriogenology 74, 1060-1065.
- Celestino, J.J.H., Figueiredo, J.R. 2004. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199 Theriogenology 62, 65-80.
- Costa, D.S., Paula, T.A.R. 2005. Coleta e avaliação de sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*) Biota Neotropica 5, 1-6.
- Doležel, R., Kyliánková, R., Kummer, V., Mašková, J., Vitásek, R. 2004. Follicular population and oestrogen receptor alpha in ovary of the bitch. Acta Vet Brno 73, 37-43.
- Dutertre, C., Dubost, G., Feer, F., Henry, O., Mauget, R. 2001. Behaviours of collared and white-lipped peccaries (*Tayassu tajacu* and *Tayassu pecari*) in relation to sexual receptivity of the female Acta Theriol 46, 305–318
- Dvorak, M. 1989. Ultrastructure and quantitative analysis of mouse and human oocytes. In Developments in Ultrastructure of Reproduction (A. Liss, ed.) 273–280. Academic Press, New York
- Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. 1987. The pelvis and reproductive organs of the pig. In: Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG (ed) Textbook of Veterinary Anatomy. W.B. Saunders Company, Philadelphia pp 759–767.
- Erickson, B.H., Reynolds, R.A., Murphree, R.L. 1976. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow Biol Reprod 15, 555-560.
- Erickson, B.H. 1966a. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary J Reprod Fertil 10, 97- 105.
- Erickson, B. H. 1966b. Development and radioresponse of the prenatal bovine ovary J Reprod Fertil 11, 97-105.
- Getty, R. 1982. The anatomy of the domestic animals. W.B. Saunders Company, Philadelphia pa.
- Gosden, R.G., Telfer, E. 1987. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships J. Zool, Lond. 211, 169-175.

- Gottdenker, N., Bodmer, R. 1998. Reproduction and productivity of white-lipped and collared peccaries in the Peruvian Amazon *J. Zool* 245, 423–430.
- Greenwald, G.S., Moor, R.M. 1989. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J Reprod Fertil* 87, 561–571.
- Hafez, E.S.S.E. 1995. *Reprodução Animal*. São Paulo: Ed. Manole Ltda., 6 ed.
- Hulshof, S.C.J., Figueiredo, J.R., Beckers, J.F., Bevers, M.M., Van der Huck, R. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries *Vet Quart* 2, 78–80.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Michelmann, H.M., Alabart, J.L., Vazquez, I., Bezugly, N., Nawroth, F. 2001. Lipolysis and Ultrastructural Changes of Intracellular Lipid Vesicles after Cooling of Bovine and Porcine GV-oocytes *Anat Histol Embryol* 30, 333–338.
- Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E., Perez-Sanchez, F., Grishchenko, V. 1998. Vitrification of Immature Porcine Oocytes: Effects of Lipid Droplets, Temperature, Cytoskeleton, and Addition and Removal of Cryoprotectant *Cryobiology* 36, 250–253.
- Jewgenow, K., Göritz, F. 1995. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture *Animal Reproduction Science* 39, 285–297.
- Lehninger, A.L. 1972. *Biochemistry: the Molecular Basis of Cell Structure and Function*. New York: Worth Publishers.
- Lintern-Moore, S., Moore, G.P.M. 1979. The initiation of oocyte growth in the mouse ovary *Biol Reprod* 20, 773–778.
- Lopes, C.A.P., Santos, R.R., Celestino, J.J.H., Melo, M.A.P., Chaves, R.N., Campello, C.C., Silva, J.R.V., Bão, S.N., Jewgenow, K., Figueiredo, J.R. 2009. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time *Animal Reproduction Science* 115, 201–214.
- Lucci, C.M., Rumpf, R., Figueiredo, J.R., Bão, S.N. 2002. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method *Theriogenology* 57, 1467 – 1483.
- Lucci, C.M., Amorim, C.A., Rodrigues, A.P.R., Figueiredo, J.R., Bão, S.N., Silva, J.R.V., Gonçalves, P.B.D. 1999. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science* 56, 223–236.
- Mariana, J.C. 1978. Analyse biometrique de l'index de marquage des cellules folliculeuses et de la taille des ovocytes des follicules primordiaux d'ovaire de ratte adulte cyclique *Annls Biol Anim Biochim Biophys* 18, 1333–1342.

- Mauget, R., Feer, F., Henry, O., Dubost, G. 1997. Hormonal and behavioural monitoring of ovarian cycles in peccaries. In: Proceedings of the First International Symposium on Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals, Supplement II, Berlin, Germany, pp 145–149.
- Mayor, P., Gálvez, H., Guimarães, D.A., López-Gatius, F., López-Béjar, M. 2007. Serum estradiol-17 β , vaginal cytology and vulval appearance as predictors of estrus cyclicity in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the eastern Amazon region. *Anim Reprod Sci* 97, 165–174.
- Mayor, P., Fenech, M., Bodmer, R.E., Lopez-Bejar, M. 2006. Ovarian features of the wild collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the northeastern Peruvian Amazon. *General and Comparative Endocrinology* 147, 268-275.
- Mayor, P., López-Gatius, F., López-Béjar, M. 2005. Integrating ultrasonography within the reproductive management of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Theriogenology* 63, 1832–1843.
- McDougall, K., Hay, M.A., Goodrowe, K.L., Gartley, C.J., King, W.A. 1997. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. *J Reprod Fertil* 51, 25–31.
- Martelli, A., Bernabo, N., Berardinelli, P., Russo, V., Rinaldi, C., Di Giacinto, O., Mauro, A., Barboni, B. 2009. Vascular supply as a discriminating factor for pig preantral follicle selection. *Reproduction* 137, 45-58.
- Mossman, H.W., Duke, K.L. 1973. *Comparative Morphology of the Mammalian Ovary*. University of Wisconsin Press, Madison.
- Nogueira-Filho, S.L.G., Nogueira, S.S.C. 2000. Criação comercial de animais silvestres: Produção e comercialização da carne e subprodutos na região sudeste do Brasil. *Revista Econômica do Nordeste* 3, 1188-195.
- Rüsse, I. 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat* 24, 77–79.
- Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., Findlay, J.K., Henderson, K.M., Martin, G.B., McNatty, K.P., McNeilly, A.S., Tsonis, C.G. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 5, 459-478.
- Schwarze, C. 1984. *Compendio de Anatomía Veterinaria*. Acribia, Zaragoza. 277–289.
- Silva, A.R., Morato, R.G., Silva, L.D.M. 2004. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Animal Reproduction Science* 81, 159-175.
- Sousa, A.L.P., Castelo, T.S., Queiroz, J.P.A.F., Barros, I.O., Paula, V.V., Oliveira, M.F., Silva, A.R. 2009. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. *Anim Reprod Sci* 116, 370–375.

- Wu, C., Rui, R., Dai, J., Zhang, C., Ju, S., Xie, B., Lu, X., Zheng, X. 2006. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 73, 1454–62.