



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

MATHEUS BARBOSA DO NASCIMENTO

**ESTUDO MORFOLÓGICO, MORFOMÉTRICO, ULTRAESTRUTURAL E
PROLIFERATIVO DO PAVILHÃO AURICULAR APICAL DE CUTIAS, *Dasyprocta
leporina* (LINNAEUS, 1758)**

MOSSORÓ-RN

2019

MATHEUS BARBOSA DO NASCIMENTO

**ESTUDO MORFOLÓGICO, MORFOMÉTRICO, ULTRAESTRUTURAL E
PROLIFERATIVO DO PAVILHÃO AURICULAR APICAL DE CUTIAS, *Dasyprocta
leporina* (LINNAEUS, 1758)**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira

MOSSORÓ-RN

2019

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas
da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, com os dados fornecidos pelo autor

N244e Nascimento, Matheus Barbosa do.
Estudo morfológico, morfométrico,
ultraestrutural e proliferativo do pavilhão
auricular apical de cutias, *Dasyprocta leporina*
(Linnaeus, 1758) / Matheus Barbosa do Nascimento.
- 2019.
63 f.: il.

Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.
Monografia (graduação) - Universidade Federal Rural
do Semi-Árido, Curso de Biotecnologia,
2019.

1. Roedores silvestres. 2. Gênero *Dasyprocta*.
3. Avaliação histológica. 4. Pele. I. Pereira,
Alexsandra Fernandes, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

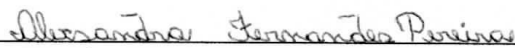
MATHEUS BARBOSA DO NASCIMENTO

**ESTUDO MORFOLÓGICO, MORFOMÉTRICO, ULTRAESTRUTURAL E
PROLIFERATIVO DO PAVILHÃO AURICULAR APICAL DE CUTIAS, *Dasyprocta
leporina* (LINNAEUS, 1758)**

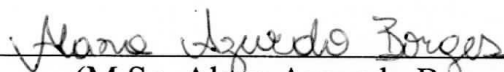
Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Defendida em: 30/07/2019.

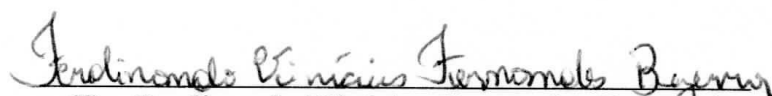
BANCA EXAMINADORA



(Profa. Dra. Alexandra Fernandes Pereira)
Orientadora



(M.Sc. Alana Azevedo Borges)
Examinadora



(Dr. Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra)
Examinador

Dedico a todos aqueles que participaram e estiveram comigo nessa trajetória, que não me permitiram desistir mesmo quando o fardo era pesado demais e me incentivaram a batalhar pelos meus objetivos: Maria das Graças Barbosa do Nascimento, Iran Honório do Nascimento, Mariana Barbosa do Nascimento, Alexsandra Fernandes Pereira, Alana Azevedo Borges e Leonardo Vitorino Costa de Aquino.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria das Graças Barbosa do Nascimento e Iran Honório do Nascimento, exemplos de garra, perseverança, amor, compreensão, renúncias e entrega à nossa família. Obrigado pelas oportunidades de estudo, conversas, carinho, apoio e esforço descomunal para que atingisse meu objetivo. Sem vocês e sua força, nunca conseguiria chegar até aqui. Esse momento não é apenas a realização de meu sonho, mas a concretização do desejo de vocês em ver um filho formado e com um futuro a trilhar. Espero que um dia eu consiga retribuir tudo aquilo que vocês apostaram em mim.

A minha irmã Mariana Barbosa do Nascimento, que você continue sendo essa garota inteligente, perspicaz e com sede de vitória. Ainda me orgulharei muito de ti.

Ao meu tio, Desembargador Francisco Barbosa Filho (*in memoriam*), pessoa de coração imenso e que não pensou duas vezes quando minha mãe lhe procurou e pediu auxílio financeiro para o prosseguimento de meus estudos, cumprindo tal auxílio até o momento de sua dolorosa partida.

Aos meus amigos Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira, Madalena Dantas de Medeiros Neta e Paulo de Tarso de Paula Santiago Filho, vocês tornaram esses cinco anos de graduação mais suportáveis. Guardarei com todo carinho nossos momentos de conversa e descontração entre aulas e nossas despedidas de semestre, espero que nunca percamos o vínculo que criamos e que a nossa amizade perdure por muitos e muitos anos.

Ao meu grande amigo Leonardo Vitorino Costa de Aquino, você foi a maior e melhor amizade que a graduação me trouxe. Muito obrigado por sua ajuda e dedicação na realização dos experimentos, por todas as vezes que lhe perturbei para tirar dúvidas, e você sempre muito solícito esteve disponível e, principalmente, por me escutar nos momentos mais delicados da minha vida sem nunca me julgar, sendo aquele ombro amigo que eu mais precisava no momento. Espero nunca perder a amizade construída com você. Continue sendo essa pessoa esplendorosa que cativa a todos ao seu redor com sua alegria e descontração.

A minha grande amiga Gabriela Pereira de Oliveira Lira, com o tempo nossa amizade e vínculo somente cresceu e amadureceu, nem parecemos aquelas duas pessoas que mal se

falavam assim que eu entrei no laboratório. Você foi evoluindo e tornando-se uma mulher dona de si, decidida, empoderada, dedicada, esforçada e que deseja plantar algo de bom no mundo. Você foi a primeira pessoa que auxiliei em experimento, e isso me deu um sentimento de pertencimento a um lugar e a um grupo de pessoas, sem contar os grandes ensinamentos teóricos e práticos que adquiri e que ficarão guardados para sempre. Nunca perca essa doçura e brilho no olhar que tanto cativa a todos.

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA, responsável: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira), onde realmente gostava de passar grande parte do meu dia, pois chegar ali e auxiliar alguém me fazia sentir verdadeiramente útil. Vocês foram minha segunda família, amigos especiais que terão sempre um lugar no meu coração: Érika Almeida Praxedes, Lucas Emanuel Nascimento, Maria Valéria de Oliveira Santos e em especial Maria Bárbara Silva, por me permitir acompanhar e auxiliar em seus experimentos

A Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira, a melhor orientadora que eu poderia ter. Um exemplo de garra, determinação, força e paixão pelo que faz, mesmo com todas as dificuldades que é ser mulher cientista e fazer pesquisa no nosso país. Sua orientação acadêmica não poderia ter sido melhor, e com seus elogios, broncas, reclamações e confiança depositada em minha pessoa ao longo desse tempo me fez evoluir como ser humano e profissional. Como dizem, existem os alunos que cursam Biotecnologia e aqueles que cursam Biotecnologia e são seus orientados. Sinto que ganhei mais do que uma orientadora, e sim uma amiga que levarei para o resto da vida. Espero um dia possuir 10% de todo seu amor pelo que faz. Serei eternamente grato por sua dedicação e empenho.

A Alana Azevedo Borges, minha “co-orientadora” e responsável por me acompanhar, com o tempo tornou-se uma das minhas mais valorosas amigas. Agradeço pela sua determinação, auxílio, paciência e compreensão em todas as vezes que cometi deslizes. Obrigado por todos os carões e puxões de orelha, sem eles não teria melhorado tanto, e obrigado também pela convivência diária, principalmente durante a realização dos experimentos. Sua alegria, vontade de viver e o esforço de sempre fazer melhor foram meu combustível nos dias mais desafiadores. Tenho muito orgulho de você e sei que terá um futuro brilhante. Gratidão eterna pela pessoa que és.

Ao Dr. Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra pela disponibilidade em avaliar este trabalho e realizar suas contribuições, bem como durante a realização dos experimentos, sua ajuda foi de fundamental importância.

Ao Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira) pela disponibilização de sua infraestrutura laboratorial e de reagentes que possibilitaram a realização deste experimento.

Ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira) pela disponibilidade das cutias e auxílio nas colheitas dos materiais biológicos.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), por permitir minha formação acadêmica, em especial a todos os docentes do curso de Biotecnologia, técnicos administrativos e funcionários terceirizados, que tão bem mantêm essa estrutura em funcionamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Iniciação Científica por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq).

“Nós vamos morrer, e isso faz de nós pessoas de sorte. A maior parte das pessoas nunca vai morrer porque nunca vai nascer. As pessoas que poderiam estar aqui no meu lugar, mas na verdade nunca verão a luz do dia, são muito mais numerosas que os grãos de areia da Arábia. Esses fantasmas não-nascidos incluem poetas maiores que Keats, cientistas maiores que Newton. Nós sabemos disso porque o conjunto de pessoas permitido pelo nosso DNA é muito maior do que o conjunto de pessoas que de fato existem.”

Richard Dawkins, Biólogo.

RESUMO

As cutias (*Dasyprocta leporina*) são importantes roedores silvestres presentes no bioma Caatinga, atuando como dispersores de sementes e inseridos na teia alimentar, auxiliando na manutenção da biodiversidade. Devido sua boa adaptabilidade em cativeiros, esses mamíferos podem ser empregados como modelo experimental para espécies filogeneticamente próximas. Neste contexto, a descrição de tecidos somáticos derivados do pavilhão auricular apical é um valioso parâmetro no desenvolvimento e aprimoramento de protocolos de criopreservação e cultivo *in vitro* desses tecidos, visando à obtenção de células somáticas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar por meio de avaliações morfológicas, morfométricas, ultraestruturais e proliferativas o pavilhão auricular apical de cutias. Para tanto, amostras teciduais de oito cutias pertencentes ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA) foram recuperadas e transportadas ao laboratório em solução tampão fosfato de sódio (PBS) a 4 °C por até 1 h. No laboratório, os fragmentos foram tricotomizados, fragmentados em 9,0 mm³ e fixados em glutaraldeído a 2,5% em PBS tamponado para microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou paraformaldeído a 4% em PBS tamponado para a histologia clássica. Após o período de fixação, os fragmentos foram destinados para MEV onde eles foram pós-fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, secados ao ponto crítico e metalizados. Os outros fragmentos foram preparados de acordo com as etapas padrões da histologia clássica, onde foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, inclusos e emblocados em parafina, microtomizados (5,0 µm) e corados com hematoxilina-eosina, tricrômico de Gomori, hematoxilina de Weigert-Van Gieson e marcação com nitrato de prata das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR). Com as lâminas histológicas foram obtidas imagens aleatórias e analisadas com o software ImageJ. Em todas as análises, os valores foram expressos como média ± desvio padrão (1 animal/1 repetição). Assim, foram obtidas médias de 30,51 ± 6,55 µm e 183,10 ± 44,01 µm para espessura da epiderme e derme, respectivamente, perfazendo uma espessura total da pele de 211,76 ± 46,00 µm. Além disso, foram obtidos médias das espessuras das camadas da epiderme, sendo córnea (5,26 ± 2,46 µm), intermediárias (16,37 ± 6,23 µm) e basal (9,91 ± 2,11 µm). Na derme não foi possível distinguir as camadas papilar e reticular. Na cartilagem, a espessura do pericôndrio foi de 27,57 ± 6,07 µm. Para a quantificação celular, foram obtidas médias de melanócitos (12,59 ± 4,66), queratinócitos (14,74 ± 4,24), células epidermais (61,66 ± 15,22), fibroblastos (103,53 ± 24,73) e condrócitos (32,73 ± 9,04). Por meio da MEV, foi possível observar detalhes da ultraestrutura do tecido, como a junção das camadas, as lacunas da cartilagem, e anexos dermais. Para a quantificação de fibras colágenas na derme, foi obtido um média de 68,00 ± 5,50%. Em virtude de sua baixa concentração, não foi possível realizar a quantificação de fibras elásticas. Para atividade proliferativa, obteve-se um média de 1,69 ± 0,68 AgNOR/célula, 1,86 ± 1,07 como área individual de cada AgNOR e 3,15 ± 1,57 como área de AgNOR/núcleo. Em conclusão, este foi o primeiro trabalho realizando a descrição da morfologia, morfometria, ultraestrutura e atividade proliferativa da região do pavilhão auricular apical de cutias, onde diferenças foram observadas em relação a roedores e outros mamíferos, quanto aos tipos, quantidade e espessura das camadas da epiderme, quantidade de melanócitos e queratinócitos. Além disso, divergências foram observadas para a espessura da derme, quantidade de fibras colágenas e quantidade de fibroblastos, bem como seu potencial proliferativo. A partir dos resultados obtidos, permite-se uma melhor otimização de protocolos de cultivo *in vitro* e criopreservação.

Palavras-chave: roedores silvestres, gênero *Dasyprocta*, avaliação histológica, pele.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cutias (<i>D. leporina</i>) mantidas em sistema intensivo no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA).....	20
Figura 2. Descrição macroscópica do pavilhão auricular de uma paca (<i>C. paca</i>) adulta, evidenciando suas estruturas auriculares.....	30
Figura 3. Obtenção e processamento histológico de fragmentos do pavilhão auricular apical de cutias, visando sua descrição morfológica, morfométrica, ultraestrutural e proliferativa..	35
Figura 4. Colheita, transporte, processamento e armazenamento de fragmentos da pele do pavilhão auricular apical de cutias.....	36
Figura 5. Fotomicrografias da pele de cutia na região do pavilhão auricular apical coradas com hematoxilina-eosina.....	42
Figura 6. Mensuração da epiderme e suas camadas, derme, pele total e do pericôndrio do pavilhão auricular apical de cutias utilizando coloração de hematoxilina-eosina.....	43
Figura 7. Fotomicrografias da pele do pavilhão auricular apical de cutia para quantificação das fibras presentes na matriz extracelular.....	44
Figura 8. Eletrofotomicrografia de varredura da pele do pavilhão auricular apical de cutia..	45
Figura 9. Atividade proliferativa da pele do pavilhão auricular apical de cutia utilizando a marcação por nitrato de prata para a quantificação e mensuração de NORs nos fibroblastos dérmicos.....	46

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Aspectos morfológicos, morfométricos e celulares de amostras somáticas derivadas de diferentes espécies do gênero <i>Dasyprocta</i>	23
--	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Quantificação de diferentes tipos celulares da epiderme e derme do pavilhão auricular apical de cutias.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR	Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
Dr	Doutor
Dra	Doutora
h	Hora
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
iPS	Células-tronco pluripotentes induzidas
IUCN	International Union for Conservation of Nature
LABMORFA	Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada
LBA	Laboratório de Biotecnologia Animal
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg/kg	Miligrama por quilo
mL/kg	Mililitro por quilo
Mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mm ³	Milímetro cúbico
MSc	Mestre
Nm	Nanômetro
nº	Número
NORs	Regiões organizadoras nucleolares
°C	Graus Celsius
PBS	Solução tampão fosfato de sódio

pH	Potencial hidrogeniônico
PIBIC	Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
RGB	Red, Green e Blue
RN	Rio Grande do Norte
RNAr	Ácido ribonucleico ribossomal
SP	São Paulo
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
VSS	Vitrificação em superfície sólida
μm	Micrômetro
μm^2	Micrômetro quadrado

LISTA DE SÍMBOLOS

*	Asterisco
°	Grau
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
x	Veze
vs	Versus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1. Importância ecológica, econômica e científica das cutias	20
2.2. Conservação de cutias utilizando amostras somáticas	21
2.3. Análises descritivas e semi-quantitativas da região de colheita das amostras somáticas	24
2.3.1. Análises morfológicas	25
2.3.2. Análises morfométricas	26
2.3.3. Análises ultraestruturais	27
2.3.4. Análises proliferativas	28
2.4. Descrição do pavilhão auricular apical	29
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. METODOLOGIA	34
4.1. Reagentes e meios	34
4.2. Bioética e locais de execução	34
4.3. Animais experimentais e desenho experimental	34
4.4. Obtenção das amostras somáticas	35
4.5. Processamento histológico	36
4.6. Avaliação morfológica, morfométrica, ultraestrutural e proliferativa	37
4.6.1. Avaliação das camadas da pele, identificação e quantificação de tecidos e células	37
4.6.2. Análise da matriz extracelular	37
4.6.3. Avaliação ultraestrutural	38
4.6.4. Análise do potencial proliferativo celular	39
4.7. Análise dos dados	39
5. RESULTADOS	41
5.1. Avaliação das camadas da pele, identificação e quantificação de tecidos e células	41
5.2. Análise da matriz extracelular	44
5.3. Avaliação ultraestrutural dos tecidos	44
5.4. Análise do potencial proliferativo celular	46
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A investigação por novas ferramentas voltadas para a conservação da biodiversidade, bem como para a produção sustentável de mamíferos é uma corrente crescente da fauna silvestre (PIRES; GALETTI, 2012). Dois princípios importantes regem essa temática, um voltado para o conhecimento fisiológico e morfológico das espécies e suas relações científicas (FORTES et al., 2005), e outro para o estudo de mecanismos de produção econômica associada ao aumento de rendimentos da população humana (MENDONÇA et al., 2006).

Para ambos os princípios, estratégias voltadas para a manutenção do ecossistema global são essenciais para a continuidade da diversidade faunística (SOUZA et al., 2012). Assim, dentre as estratégias que podem ser aplicadas, têm-se àquelas *in situ*, as quais preservam um habitat e as espécies nele existentes (LICHT, 2017). Contudo, sua realização envolve fatores relacionados a espaço, condições ambientais e econômicas que podem inviabilizar tal estratégia (COMIZZOLI et al., 2000).

Já as estratégias *ex situ in vitro* têm sido sugeridas, especialmente por permitir o estabelecimento e manutenção de recursos genéticos pela formação de bancos biológicos (COMIZZOLI, 2017). Em geral, esses bancos envolvem a criopreservação de gametas, embriões, células somáticas, tecidos gonadais e somáticos (LEÓN-QUINTO et al., 2009), e se caracterizam por manter amostras biológicas armazenadas e criopreservadas por um longo período, permitindo também a identificação gênica e de acordo com as finalidades econômicas, ecológicas e filogenéticas (MOREIRA, 2012).

Dentre todos os materiais biológicos que podem ser conservados, as amostras somáticas têm merecido destaque (PRAXEDES et al., 2018) em virtude de alguns fatores, como a obtenção de amostras independente do gênero e estágio reprodutivo do indivíduo, e o emprego das células para a multiplicação da população, usando a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (WANI et al., 2017), e para a produção de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) (VERMA et al., 2012). Adicionalmente, amostras somáticas vêm sendo empregadas para pesquisas voltadas para o comportamento proliferativo e de diferenciação celular *in vitro* e *in vivo* (CARVALHO et al., 2015).

Assim, como etapa importante na manipulação de amostras somáticas, faz-se necessário inicialmente caracterizar a região do animal a ser coletada, quanto à identificação e quantificação do número de células, tecidos, camadas e demais estruturas. Nesse sentido, em se tratando de tecidos derivados do pavilhão auricular apical, a qual tem sido a região mais empregada para a recuperação de células somáticas (PRAXEDES et al., 2018), o seu

conhecimento morfológico, morfométrico, ultraestrutural, bem como o potencial proliferativo de suas células é essencial para o emprego adequado dos protocolos de criopreservação e cultivo *in vitro* dos tecidos (BORGES et al., 2017a).

Nesse contexto, visando aprimorar os estudos voltados para a conservação de roedores silvestres do bioma Caatinga, como as cutias (*Dasyprocta leporina*), a caracterização do pavilhão auricular apical dessa espécie representa um ponto importante para o uso de amostras somáticas em algumas biotecnologias. Embora tenha sua população considerada pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (EMMONS; REID, 2016) como menos preocupante, a importância dessa espécie não se resume apenas na conservação da biodiversidade, mas também em fatores econômicos e ecológicos (JORGE; PERES, 2005; PIMENTEL; TABARELLI, 2004). A cutia tem um papel econômico na produção de carne (JORGE; PERES, 2005) e ecológico pela dispersão de sementes (PIMENTEL; TABARELLI, 2004). Além disso, o conhecimento científico acerca da *D. leporina* permitiria sua aplicação em outras espécies filogeneticamente próximas, como a *D. ruatanica* que se encontra ameaçada de extinção (SCHIPPER et al., 2016) e a *D. mexicana* que está criticamente ameaçada de extinção (VÁZQUEZ et al., 2008). Portanto, esclarecimentos referentes ao pavilhão auricular apical de cutias proporcionaria um conhecimento morfológico dessa região, bem como a aplicação desse conhecimento a outras espécies filogeneticamente próximas e que se encontram ameaçadas de extinção.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Importância ecológica, econômica e científica das cutias

A ordem Rodentia é a mais numerosa dos mamíferos placentários, sendo constituída por mais de 2.000 espécies, e correspondendo a 40% das espécies de mamíferos (PAGLIA et al., 2012). Entre as principais espécies silvestres estudadas na América do Sul, têm-se a cutia (*D. leporina*) em virtude principalmente da sua adaptação em cativeiros e fonte de renda pela produção de carne e couro (LOPES et al., 2004).

Além de pertencerem à ordem Rodentia, as cutias fazem parte da classe Mammalia, família Dasyproctidae e gênero *Dasyprocta*, estando na mesma ordem das pacas (*Cuniculus paca*), do cobaio (*Cavia porcellus*), do ouriço (*Erinaceus europaeus*) e do preá (*Galea spixii*) (ALMEIDA et al., 2003; WOODS; KILPATRICK, 2005). Em geral, as cutias (*Dasyprocta spp.*) são encontradas no sul do México, sul da América Central e em regiões tropicais da América do Sul, principalmente nas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil (FERREGUETTI et al., 2018). No Brasil, são encontradas cinco espécies: *D. azarae*, *D. fuliginosa*, *D. prymnolopha*, *D. punctata* e *D. leporina* (HOSKEN; SILVEIRA, 2001). Ainda, a *D. leporina* (**Figura 1**) ocorre na bacia amazônica ao sul do rio Amazonas, entre os rios Madeira e Tocantins, e no leste do Brasil, nos estados da Paraíba, Pernambuco e Bahia (REIS et al., 2011).



Figura 1. Cutias (*D. leporina*) mantidas em sistema intensivo no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA). Fonte: CEMAS/UFERSA.

Nessas regiões, as cutias vivem em condições naturais, como matas e áreas cultivadas, preferindo tocas subterrâneas, vegetação densa e proximidade com a água (MOLLINEAU et al., 2008). Nessas condições, esses roedores são importantes como dispersores de sementes, inserindo-se naturalmente na teia alimentar e interferindo na vegetação local (PIMENTEL; TABARELLI, 2004; GALETTI et al., 2015). Além disso, as cutias atuam na aeração dos solos em virtude da formação de suas tocas, nas quais por meio da sua urina e defecação auxiliam na reposição de nutrientes e sais inorgânicos para o solo (COSTA et al., 2013). Adicionalmente, auxiliam na fixação de plantas por possuírem hábitos de enterrar seus alimentos (HOSKEN; SILVEIRA, 2001).

No aspecto econômico, as cutias têm atuado como fonte proteica alternativa, em virtude do seu potencial econômico para a produção e venda de carne (JONES et al., 2019). Além disso, o couro e os pelos têm sido empregados para comercialização nacional e internacional (SILVA et al., 2010). Adicionalmente, o comportamento desses animais desperta o interesse do turismo (COSTA et al., 2013). Contudo, em virtude dessa abordagem econômica, a caça predatória tem gerado preocupação em diferentes regiões (RODRIGUES et al., 2003), associada ainda as alterações climáticas e desmatamento, resultando numa redução no quantitativo desses indivíduos (FERREGUETTI et al., 2018).

Já no aspecto científico, as cutias possuem um papel importante, especialmente pela sua adaptação a cativeiros, as quais permitem seu emprego em pesquisas científicas voltadas para a reprodução e conservação (CASTELO et al., 2015), bem como sua utilização como modelos experimentais em pesquisas voltadas para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (CARVALHO et al., 2015), como a *D. ruatanica* (SCHIPPER et al., 2016) e a *D. mexicana* (VÁZQUEZ et al., 2008).

Assim, diante dos seus aspectos ecológicos, econômicos e científicos, faz-se necessário desenvolver estratégias de conservação para as cutias. Nesse contexto, uma alternativa seria a formação de bancos de amostras somáticas, as quais quando preparadas adequadamente permite a conservação de informações genéticas da espécie e seu uso em biotécnicas (LEÓN-QUINTO et al., 2009).

2.2. Conservação de cutias utilizando amostras somáticas

Embora não tenha sua população considerada criticamente ameaçada de extinção (EMMONS; REID, 2016), as cutias têm seu quantitativo reduzido especialmente em virtude da caça predatória e desmatamento de seu habitat (FERREGUETTI et al., 2018). Nesse

sentido, uma das alternativas para conservação consiste na criopreservação (COSTA et al., 2015) e cultivo *in vitro* de amostras somáticas (CARVALHO et al., 2015). Embora poucos estudos sejam ainda relatados nessa temática de amostras somáticas para as cutias, vários outros estudos têm sido desenvolvidos para cobaias (*Cavia porcellus*), mamíferos da mesma ordem das cutias, os quais são amplamente empregados em pesquisas voltadas para humanos (COSTA; MARTINS, 2008). Assim, estudos foram desenvolvidos em cobaias quanto à caracterização de fibroblastos (MEHRABANI et al., 2014) e análises citogenéticas (ROMANENKO et al., 2015).

Nesse sentido, a primeira etapa da implementação de amostras somáticas como estratégias de conservação, consiste no conhecimento morfológico de tecidos e células a serem empregadas (CONDE-JUNIOR et al., 2012; ROCHA et al., 2012; CIENA et al., 2013). Em cutias, estudos voltados para essa temática foram desenvolvidos a partir de amostras coletadas de diferentes regiões do indivíduo (**Quadro 1**), apresentando diferentes finalidades. Assim, Conde-Junior et al. (2012) descreveram a morfofisiologia e morfometria de células sanguíneas de cutias que no mesmo ano permitiu Rocha et al. (2012) identificarem os diferentes estágios de maturação de células progenitoras hematopoiéticas. Ainda, foi possível observar as características estruturais e ultraestruturais da língua de cutias (CIENA et al., 2013). Carvalho et al. (2015) isolaram, expandiram, diferenciaram e caracterizaram por técnicas de cultivo *in vitro* células progenitoras da polpa dentária, usando os conhecimentos anatômicos e histológicos anteriormente obtidos (SILVA et al., 2013). Também foi realizado estudo com a plasticidade estrutural e o isolamento de células progenitoras do cordão umbilical de cutias (CARVALHO et al., 2019). Além disso, Nascimento et al. (2018) realizaram a descrição de parâmetros morfológicos e morfométricos da pele do pavilhão auricular apical desse animal.

Quadro 1. Estudos morfológicos, morfométricos e celulares de amostras somáticas derivadas de diferentes espécies do gênero *Dasyprocta*.

Espécie	Fonte	Finalidade	Referências
<i>D. prymnolopha</i>	Sangue	Morfofisiologia e morfometria de células sanguíneas	Conde-Junior et al. (2012)
	Sangue	Cultivo <i>in vitro</i> de células progenitoras	Rocha et al. (2012)
	Dente	Aspectos anatômicos e histológicos	Silva et al. (2013)
	Polpa dentária	Isolamento, expansão, diferenciação e caracterização de células progenitoras	Carvalho et al. (2015)
	Cordão umbilical	Plasticidade estrutural e isolamento de células progenitoras	Carvalho et al. (2019)
<i>D. leporina</i>	Língua	Características estruturais e ultraestruturais	Ciena et al. (2013)
	Glândulas salivares	Descrição das glândulas salivares maiores	Oliveira Junior et al. (2016)

Uma estratégia interessante do uso de amostras somáticas para a conservação de mamíferos silvestres consiste no seu uso na clonagem por transferência nuclear de células somáticas. Embora ainda não observado em nenhuma espécie do gênero *Dasyprocta*, o uso desta técnica permitiria não somente contribuir para a conservação da biodiversidade, mas também no aumento produtivo de indivíduos de interesse zootécnico (LEÓN-QUINTO et al., 2009; SILVA et al., 2017).

Nessa temática, uma das etapas consiste na criopreservação de amostras somáticas, as quais as células poderiam ser empregadas como doadoras de núcleo (carioplastos) na clonagem por transferência nuclear usando oócitos receptores (citoplastos). Essas amostras têm sido na maioria dos trabalhos recuperadas do pavilhão auricular apical em virtude principalmente da facilidade das condições de colheita (PRAXEDES et al., 2018) e das células obtidas (fibroblastos) serem consideradas modelos interessantes de reprogramação nuclear (PEREIRA et al., 2014).

Nesse sentido, para garantir a qualidade desses fibroblastos, protocolos de criopreservação teciduais devem ser estabelecidos e serem baseados nas informações morfológicas, morfométricas e proliferativas da região coletada. Um exemplo interessante dessa abordagem já foi desenvolvido para catetos (*Pecari tajacu*), mamíferos silvestres do bioma Caatinga, os quais após caracterização da região auricular periférica com a observação de aspectos marcantes dessa região, quando comparada aos demais mamíferos, especialmente quanto ao número de camadas e espessura da epiderme, quantidade de células epidermais, melanócitos e parâmetros proliferativos (BORGES et al., 2017a), protocolos mais específicos de criopreservação foram desenvolvidos, quanto à definição da técnica de criopreservação de amostras somáticas (BORGES et al., 2017b) e escolha dos crioprotetores (BORGES et al., 2018).

Especificamente para cutias, há a necessidade do desenvolvimento de protocolos adequados de criopreservação do pavilhão auricular apical, visando à conservação de células somáticas para diferentes finalidades científicas e reprodutivas. Além disso, essa abordagem se fortalece, uma vez que em regiões externas (pele auricular, pele abdominal e pele caudal), diferenças podem ser observadas quanto à descrição morfológica, morfométrica e ultraestrutural como observado em pacas (ISOLA et al., 2013).

2.3. Análises descritivas e semi-quantitativas da região de colheita das amostras somáticas

As análises semi-quantitativas e descritivas morfológicas, morfométricas, ultraestruturais e proliferativas são desenvolvidas, visando inicialmente conhecer as características celulares e teciduais de uma determinada espécie, e relacionar essas características com as demais espécies filogeneticamente próximas (SILVA et al., 2017). Além disso, quando a região ou órgão do animal silvestre é coletado, objetivando aplicação dessa amostra em procedimentos de cultivo *in vitro* e criopreservação, faz-se necessário caracterizar tal região a fim de otimizar a realização desses procedimentos (BORGES et al., 2017a).

Para essas diferentes finalidades, estudos têm sido realizados em alguns mamíferos silvestres, como em pacas (ISOLA et al., 2013), ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, SILVA, 2015), catetos (BORGES et al., 2017a), preás (AQUNO et al., 2018), onças-pintadas (PRAXEDES, 2019). Enquanto Borges et al. (2017a) caracterizaram a pele de catetos para definição das condições de criopreservação de tecidos dessa região, Isola et al. (2013)

descreveram todo o sistema tegumentar de pacas, a fim de correlacionar com as demais espécies, Silva (2015) analisou a histomorfometria da pele de ratas Wistar e sua relação com a diminuição de estrógeno, Aquino et al. (2018) caracterizaram a região auricular de preás e Praxedes (2019) descreveu a pele do pavilhão auricular apical de onças-pintadas de pelagem amarela e preta, buscando diferenças entre as mesmas.

2.3.1. Análises morfológicas

Estudos por histologia clássica são uma importante ferramenta utilizada das mais diferentes formas, seja na realização de análises morfológicas, fisiológicas, patológicas (LUZ et al., 2017). Esta técnica permite a avaliação de tecidos frescos e após a descongelação para visualizar possíveis danos teciduais em virtude da técnica (BORGES et al., 2018). Algumas características a tornam uma técnica usual na caracterização de tecidos somáticos, em especial do pavilhão auricular apical, como sua facilidade, baixo custo, padronização de réplicas, rapidez na execução, e pouca infraestrutura necessária (LUZ et al., 2017).

Dentre os corantes utilizados nesta metodologia está a hematoxilina, que por possuir caráter básico, tem atração por substâncias ácidas presentes nos tecidos, como os núcleos e ácidos nucleicos, corando-os em azul-púrpura. Já a eosina, sendo ácida, cora predominantemente o citoplasma, as fibras colágenas e outras estruturas compostas por substâncias com caráter básico, corando-as em vermelho (WITTEKIND, 2003). A partir dos resultados obtidos, podem-se delimitar os padrões de pele fina e grossa, espessura da epiderme e suas camadas, as células presentes, bem como avaliar e quantificar parâmetros na derme, cartilagem, hipoderme e anexos da pele, permitindo a avaliação da qualidade deste tecido e estabelecimento de padrões *in vitro* (NUNES; CINSA, 2016).

Contudo, nem sempre as avaliações pela histologia clássica utilizando hematoxilina e eosina são suficientes para as análises (LOPES; MALHÃO, 2016), sendo necessário o emprego de técnicas auxiliares como a avaliação das fibras colágenas e elásticas pela técnica de tricrômico de Gomori e hematoxilina de Weigert-Van Gieson, respectivamente, e a avaliação do potencial proliferativo por meio da marcação com nitrato de prata das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs) irão permitir obter um maior conhecimento do tecido analisado (OSHIMA; FORONES, 2001).

2.3.2. Análises morfométricas

A análise morfométrica é um dos métodos mais utilizados dentro da histologia, já que ela permite a avaliação do tecido, sua morfologia, morfometria, ajudando na determinação de alterações que possam acontecer no tecido, como algumas injúrias ou desprendimento de camadas (MALVASIO et al., 2012). Em geral, essa análise garante uma maior confiabilidade da qualidade do tecido, principalmente quando o mesmo é submetido a técnicas de conservação de amostras somáticas, como a congelação lenta (PRAXEDES et al., 2019), vitrificação (BORGES et al., 2018) e refrigeração (QUEIROZ NETA et al., 2018).

Assim, dentro dos principais parâmetros que podem ser analisados quanto a morfometria de tecidos oriundos da pele, estão a espessura e distribuição de camadas epidérmicas e dérmica com a hematoxilina e eosina, o perfil de fibras colágenas com o tricrômico de Gomori e padrão de fibras elásticas com a hematoxilina de Weigert-Van Gieson. Algumas destas colorações foram realizadas em estudos com roedores como pode ser observado por Bezerra et al. (2018) e Isola et al. (2013), quando realizaram avaliações histomorfométricas da subplacenta de preás (*G. spixii*) e do tegumento de pacas (*C. paca*), respectivamente. Ainda é possível observar estudos de caracterização histomorfológica do pavilhão auricular apical de catetos, visando otimizar protocolos de criopreservação para conservar amostras biológicas desta espécie (BORGES et al., 2017a).

Parâmetros morfométricos, como a distribuição e espessura das camadas celulares, perfil de distribuição das fibras colágenas foram utilizados na descrição da pele do pavilhão auricular apical de catetos por Borges et al. (2017a). Essas análises também foram empregadas em estudo com a pele do pavilhão auricular apical de onça-pintada que objetivou comparar a melhor técnica de criopreservação desse tecido, sendo utilizada a congelação lenta, vitrificação direta em criotubos e vitrificação em superfície sólida (VSS), onde foi realizada a mensuração das camadas da pele e quantificação da matriz de fibras colágenas para concluir que a VSS como a técnica que promoveu menos danos ao tecido (PRAXEDES et al., 2019).

Portanto, estudos morfométricos associados a análises proliferativas das células permitirá um maior conhecimento acerca do tecido que esteja sendo avaliado, permitindo otimizar os protocolos de conservação dessas amostras, bem como para outras aplicações biotecnológicas.

2.3.3. Análises ultraestruturais

Uma das abordagens mais fomentadas atualmente são as análises ultraestruturais, que permitem prever a forma, estrutura e integridade de amostras biológicas, bem como algumas anormalidades e deformações que elas podem apresentar (SILVA et al., 2019). Assim, como principal técnica utilizada para esta abordagem, têm-se microscopia eletrônica de varredura (MEV), que se baseia no uso de feixes de elétrons no lugar de fótons como observados em microscópios ópticos convencionais, permitindo solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (DEDAVID et al., 2007).

Nesse contexto, a MEV se tornou nas mais diversas áreas um instrumento imprescindível para a análise ultraestrutural. Isso porque a técnica possibilita investigar superfícies de amostras com aproximação da ordem de centenas de milhares de vezes (TELES et al., 2017). Assim, à medida que o feixe de elétrons varre a superfície da amostra, em especial, tecido somático do pavilhão auricular da pele, sua interação com o material analisado gera diferentes tipos de sinal que são utilizados para a formação de imagens ou análise da composição da amostra, fornecendo informações quanto a sua morfologia e topografia (DEDAVID et al., 2007).

Esta técnica apresenta inúmeras vantagens, como não requerer grandes etapas para a obtenção de imagens, possuir uma ampla variedade de magnitude, alta profundidade de campo e fácil interpretação das micrografias que são geradas (GOMES et al., 2017). Assim, a partir da MEV, é possível revelar uma riqueza de detalhes podendo ser utilizado em uma infinidade de amostras, à qual pode ser identificado e caracterizado estruturas que compõe o pavilhão auricular apical de cutias, como a epiderme, derme, tecido cartilaginoso e glândulas anexas que o constitui, como observado em estudos realizados com o tegumento de pacas (ISOLA et al., 2013).

Em cutias, a microscopia eletrônica de varredura já foi utilizada na análise da ultraestrutura da língua desses animais, bem como a visualização da sua superfície dorsal e ultraestrutura epitelial (CIENA et al., 2013). Com o auxílio desta técnica, Silva et al. (2013) realizaram a descrição ultraestrutural do dente de cutia (*D. prymnolopha*). Já Oliveira Junior et al. (2016) realizaram com o auxílio da MEV a descrição de toda a morfologia das glândulas salivares maiores de cutias (*D. leporina*), visando a manutenção destes animais em cativeiro.

Contudo, somente estruturas superficiais podem ser examinadas por meio da MEV, sendo necessário então utilizar outras ferramentas, como a microscopia eletrônica de transmissão (MET) caso seja necessário um maior detalhamento do tecido analisado, suas

células (PADILHA, 2013). Em estudo realizado por Rodrigues et al. (2006) com cutia (*D. leporina*), foi realizada a descrição da ultraestrutura da subplacenta deste animal utilizando a MET. Além disso, em cutias (*D. aguti*), Ciena et al. (2013) utilizaram a MET para a visualização das camadas celulares e detalhes das células que constituíam o epitélio dorsal da língua destes animais. Em catetos, Borges et al. (2017a) utilizaram a MET para a visualização das fibras colágenas presentes na derme da pele do pavilhão auricular apical destes animais.

Visando complementar os dados obtidos na descrição da pele do pavilhão auricular apical de cutias, análises do potencial proliferativo podem ser aplicadas visando entender o metabolismo celular.

2.3.4. Análises proliferativas

Uma das técnicas das quais vem sendo empregadas para avaliações do pavilhão auricular de animais silvestres é a técnica de marcação com nitrato de prata das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (TRERÈ, 2000). Essa metodologia utiliza a prata que se liga as regiões organizadoras nucleolares (NORs). Elas são alças de ácido desoxirribonucleico (DNA) que transcrevem o ácido ribonucleico ribossomal (RNAr) e estão localizadas em humanos no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22, podendo ser visualizadas pela técnica de marcação com prata que reconhece as proteínas associadas à alça de DNA, a qual é identificada como pontos pretos intranucleares, que posteriormente podem ser quantificados e mensurados, indicando a atividade transcricional, bem como o potencial proliferativo e o metabolismo celular (GILL et al., 2011; VIEIRA, 2013).

Assim, diferentes abordagens podem ser realizadas acerca desta marcação, principalmente, quando estão relacionados a patologias (VIEIRA, 2013), já que é uma técnica amplamente empregada para estimar o prognóstico de células, como observado em animais domésticos (CHACUR et al., 2015), onde os mesmos avaliaram as células de testículos de ovinos, na busca por linhagens celulares saudáveis. Já em mamíferos silvestres, visando a otimização de técnicas de conservação animal por meio desta ferramenta, destacam-se também estudos realizados com a subplacenta de preás por Bezerra et al. (2018), onde a marcação foi empregada na identificação e avaliação da qualidade de células constituintes desta estrutura. Essa ferramenta também já foi empregada em catetos na caracterização histológica de tecidos somáticos da pele desta espécie, por meio da contagem de NORs de

fibroblastos que são células de grande potencial biotecnológico (BORGES et al., 2017a), bem como em estudos da solução de criopreservação ideal para o tecido (BORGES et al., 2018).

Além disso, estudos do potencial proliferativo têm sido realizados objetivando conhecer a qualidade de tecidos, como por exemplo no realizado por Queiroz Neta et al. (2018) com catetos onde os pesquisadores observaram que houve diminuição na quantidade e na área de AgNOR em fibroblastos dos fragmentos armazenados sob refrigeração durante período de 30 e 50 dias. Essa diminuição influenciou diretamente na qualidade do cultivo *in vitro* destes explantes, onde foi observado um aumento da quantidade de dias de cultivo, de crescimento de células, bem como do seu tempo de duplicação.

Desse modo, é sabido que o uso de ferramentas adicionais, como a técnica de AgNOR são imprescindíveis no conhecimento acerca do tecido e na seleção daqueles com qualidades superiores. Assim, utilizando-se desta metodologia podem-se obter importantes informações quanto à cinética proliferativa de células e assim aplicar posteriormente biotécnicas de conservação ou reprodução.

2.4. Descrição do pavilhão auricular apical

O termo orelha consiste no conjunto de estruturas que constituem o sistema vestibular periférico e auditivo de um animal (LUCAS et al., 2016). Esse órgão é responsável pela percepção de sons e ruídos, sendo o órgão de manutenção do equilíbrio e orientação espacial do organismo inteiro (KÖNIG; LIEBICH, 2011). Externamente, a orelha é composta por duas divisões: o pavilhão auricular e o meato acústico externo. O pavilhão auricular consiste numa porção cartilaginosa revestida pela pele e situada lateralmente à cabeça, enquanto o meato acústico externo consiste no canal de comunicação entre a base auricular e a membrana timpânica por meio de uma abertura do osso temporal (DYCE et al., 2010).

Em mamíferos, o pavilhão auricular possui o formato de funil, sua parte distal é aberta para promover a recepção do som, e sua parte próxima, afunila-se em um tubo que se conecta com o meato acústico externo (EKDALE, 2016b). Em roedores, o pavilhão auricular pode mover-se em direção da origem do som, inclusive de forma independente, de modo que, cada um possa concentrar-se em sons isolados e melhorar sua captação. Esses animais não necessitam movimentar sua cabeça para captar o som, ou seja, movimentam apenas suas orelhas, diferentemente dos humanos, que possuem orelha externa imóvel (BALBANI; MONTOVANI, 2008).

O pavilhão auricular (**Figura 2**), em algumas espécies de animais, tem a forma de um cartucho pontiagudo, e, na superfície interna côncava, a cavidade do cartucho, a escafa é distendida de forma plana (EKDALE, 2016a). Essa superfície interna mostra uma tênue e pouco móvel cobertura de pelos, com longos pelos de proteção (trago), que se posicionam na proximidade do conduto auditivo e que, na profundidade do pavilhão, são mais esparsos e finos (BALBANI; MONTOVANI, 2008).

Além disso, possui várias depressões e elevações, sendo a concha a maior depressão. A margem elevada da orelha é chamada de hélice, e, localizada logo abaixo da hélice encontra-se a ponte ou fossa escafoide, que é uma longa depressão. Abaixo da ponte, se encontra uma elevação chamada anti-hélice, que termina bifurcada em dois ramos, encontrando-se uma fossa entre eles, chamada de fossa triangular ou navicular. O conduto auditivo é um tubo que conecta o pavilhão auricular com o meato acústico externo, permitindo a entrada das ondas sonoras até a orelha média. O lóbulo é uma pequena porção de tecido mole que se encontra na região inferior do pavilhão. Localizados superiormente ao lóbulo, encontram-se o trago e o supra tragos, o primeiro localizado logo na abertura do meato acústico externo e o segundo, logo acima do lóbulo (ALBUQUERQUE et al., 2009; MARTINS et al., 2015).

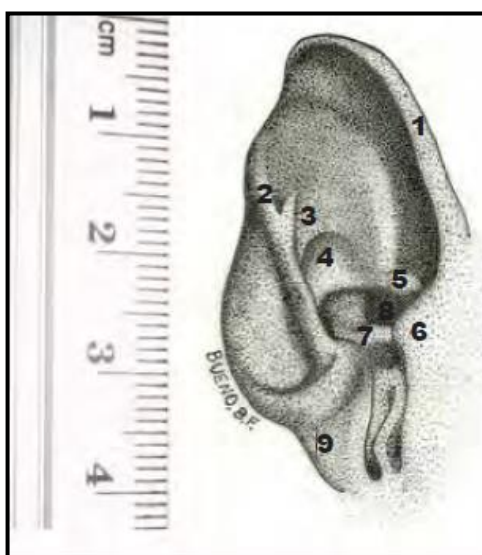


Figura 2. Descrição macroscópica do pavilhão auricular de uma paca (*C. paca*) adulta, evidenciando suas estruturas auriculares: **1)** hélice, **2)** anti-hélice, **3)** ponte, **4)** concha, **5)** supra tragos, **6)** tragos, **7)** incisura intertrágica, **8)** conduto auditivo e **9)** lóbulo. Fonte: MARTINS et al. (2015).

Histologicamente, o pavilhão auricular é constituído por pele, seus anexos e cartilagem. A cartilagem é um fator determinante para o formato do pavilhão auricular, pois a mesma confere rigidez para dar sustentação e manter o pavilhão sempre ereto. A orelha média é caracterizada pela formação da caixa timpânica ou cavidade timpânica, que é preenchida por estruturas ósseas e membranosas. Nesse segmento, são localizados os três ossículos, como o martelo, bigorna e estribo à qual estão suspensos por ligamentos e dois músculos, sendo o músculo estapédio e o tensor do tímpano (MARTINS, 2013). Já a orelha interna de roedores, conhecida também como labirinto, é composta pelo labirinto ósseo e o membranáceo. Essa por sua vez, abriga o órgão auditivo terminal, onde é denominado de cóclea e os órgãos vestibulares terminais, como o utrículo, sáculo e ductos vestibulares (MARTINS, 2013).

Já a pele consiste em um dos principais órgãos, funcionando como barreira de proteção externa desses organismos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Em geral, é considerado um órgão multifuncional, desempenhando diferentes papéis, como proteção contra o atrito, agentes químicos, microrganismos, radiações e dessecação, termorregulação por meio dos vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo, excreção e equilíbrio hídrico pelas glândulas sudoríparas, sensorial, síntese de vitamina D3, defesa imunológica e comunicação com o ambiente (NEIVA, 2014).

Para atender a todas essas funções, a pele desenvolveu, ao longo dos processos evolutivos, várias estruturas especializadas, como camadas definidas (epiderme e derme), tecido subcutâneo, folículo piloso e glândulas (KÖNIG; LIEBICH, 2011). Em geral, a epiderme apresenta cinco camadas, as quais podem variar entre as diferentes espécies de mamíferos, que são: camadas basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea.

A epiderme é constituída por células epiteliais geradas na camada basal, a qual promove uma constante renovação celular com intensa atividade mitótica. Essas células basais sofrem diferenciação, sendo deslocadas para a camada espinhosa e lúcida, que ao se sobreporem conferem resistência mecânica à epiderme (GARTNER, 2017). Na camada granular são sintetizadas substâncias que asseguram a coesão à camada córnea, a qual é a mais externa, constituída por células anucleadas e achatada (GARTNER, 2017). Além disso, as camadas da epiderme são avasculares, sendo a fonte de nutrição a difusão dos nutrientes por meio dos capilares dérmicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Já a derme é responsável pela resistência e elasticidade da pele. Ela consiste no tecido conjuntivo em que se apoia a epiderme e une a pele ao tecido subcutâneo ou hipoderme. A derme apresenta espessura variável de acordo com a região observada (SOUZA et al., 2009). Sua superfície externa é irregular, observando as saliências, as papilas dérmicas, que

acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme (BRAGULLA et al., 2004). As papilas aumentam a área de contato da derme com a epiderme, reforçando a união entre essas duas camadas, sendo as mesmas mais frequentes nas zonas sujeitas a pressões e atritos (KÜHNEL, 2005).

As glândulas sebáceas situam-se na derme e os seus ductos, revestidos por epitélio estratificado, geralmente desembocam nos folículos pilosos (BRAGULLA et al., 2004). Os pelos são estruturas delgadas e queratinizadas, que se desenvolvem a partir de uma invaginação de epiderme. A cor, o tamanho e a disposição deles variam de acordo com a cor da pele e a região do corpo. Em geral, são observados em praticamente toda a superfície corporal, com exceção de algumas regiões bem delimitadas (SOUZA et al., 2009). Cada pelo se origina de uma invaginação da epiderme, o folículo piloso, que, no pelo em fase de crescimento, apresenta-se com uma dilatação terminal bulbo piloso, em cujo centro se observa uma papila dérmica (SOUZA et al., 2009).

O tecido cartilaginoso é uma forma especializada de tecido conjuntivo com a função de garantir suporte aos tecidos moles (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Em geral, contém células, os condrócitos, e abundante material extracelular, que constitui a matriz. As cavidades da matriz, ocupadas pelos condrócitos, são chamadas de lacunas (BRAGULLA et al., 2004). O pericôndrio, cuja função é nutrir a cartilagem, é formado por tecido conjuntivo muito rico em fibras de colágeno tipo I na parte mais superficial, porém gradativamente mais rico em células à medida que se aproxima da cartilagem (KÜHNEL, 2005).

Os condrócitos são células secretoras de colágeno, principalmente do tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas, como a condronectina. Uma vez que as cartilagens são desprovidas de capilares sanguíneos, os nutrientes transportados pelo sangue atravessam o pericôndrio, penetram a matriz da cartilagem e alcançam os condrócitos mais profundos (GARTNER, 2017).

A cartilagem elástica é encontrada no pavilhão auditivo, no conduto auditivo externo, na tuba auditiva, na epiglote e na cartilagem cuneiforme da laringe. Ainda, é semelhante à cartilagem hialina, porém inclui além das fibrilas de colágeno (principalmente do tipo II), uma abundante rede de fibras elásticas, contínuas com as do pericôndrio (KÖNIG; LIEBICH, 2011).

Dessa forma, observa-se que ainda existe uma lacuna quanto a descrição dos padrões morfológicos, morfométricos, ultraestruturais e proliferativos do pavilhão auricular apical de cutias, visando conhecer melhor essa região de amostra somática bem como para a otimização de protocolos de conservação dessas amostras.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar por avaliações morfológicas, morfométricas, ultraestruturais e proliferativas a porção apical do pavilhão auricular de cutias.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar, distinguir e quantificar as células, tecidos, camadas, fibras colágenas e elásticas do pavilhão auricular apical de cutias;
- Descrever a ultraestrutura do pavilhão auricular apical de cutias;
- Determinar o potencial proliferativo de células somáticas do pavilhão auricular apical de cutias;
- Conhecer a região de colheita de amostras somáticas desta espécie.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes e meios

Todos os produtos químicos foram provenientes da Labimpex (São Paulo, SP, Brasil). Solução tampão fosfato de sódio (PBS) utilizada teve seu potencial hidrogeniônico (pH) ajustado para 7,4.

4.2. Bioética e locais de execução

A presente proposta foi aprovada pela Comissão Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA, nº. 23091.001074/2015-81), bem como pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, nº. 48635-1).

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA, responsável: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira) em parceria com o Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira) e o Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira).

4.3. Animais experimentais e desenho experimental

Um total de oito animais da espécie *D. leporina* provenientes do CEMAS/UFERSA (IBAMA nº. 12.492-0004) foram utilizados. As amostras auriculares foram coletadas de animais após sua eutanásia para controle populacional, utilizando a combinação de cetamina e xilazina para anestesia, seguida da administração de cloreto de potássio para a eutanásia. Além disso, cutias foram selecionadas dentro da mesma faixa etária (21 ± 10 meses).

A presente proposta consistiu na caracterização morfológica, morfométrica, ultraestrutural e proliferativa do pavilhão auricular apical, utilizando colorações de hematoxilina e eosina, tricrômico de Gomori, hematoxilina de Weigert-Van Gieson, visualização da ultraestrutura pela MEV e marcação de NORs (**Figura 3**).



Figura 3. Obtenção e processamento histológico de fragmentos do pavilhão auricular apical de cutias, visando sua descrição morfológica, morfométrica, ultraestrutural e proliferativa.

4.4. Obtenção das amostras somáticas

Inicialmente, para a recuperação de amostras do pavilhão auricular apical, cutias foram capturadas com puçá para sua imobilização mecânica e manipulação (**Figura 4A**). Posteriormente, os animais foram anestesiados utilizando cloridrato de cetamina (15 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg) por via intramuscular. Imediatamente depois de confirmado o plano anestésico, os animais foram eutanasiados utilizando uma solução de cloreto de potássio (1 mL/kg) por via intravenosa (CASTELO et al., 2015). A eutanásia desses indivíduos foi necessária visando atender a demanda de todos os experimentos a serem realizados por vários discentes da área de morfofisiologia animal que utilizam tais animais do CEMAS.

Após a confirmação do óbito dos animais, a colheita do pavilhão auricular foi realizada utilizando uma tesoura cirúrgica (**Figura 4B**). Em seguida, as amostras foram lavadas em álcool a 70% e transportadas ao laboratório em tubos cônicos contendo PBS, a 4 °C dentro de 1 h (**Figura 4C**). No laboratório, as amostras foram submetidas a consecutivos banhos em PBS, objetivando retirar possíveis resíduos derivados da colheita, sendo recuperado o pavilhão auricular apical em cortes de 0,25 cm de diâmetro por 0,5 mm de espessura. Posteriormente, foi realizada a fragmentação dos tecidos (9,0 mm³) e sua destinação para o processamento histológico (**Figura 4D**).

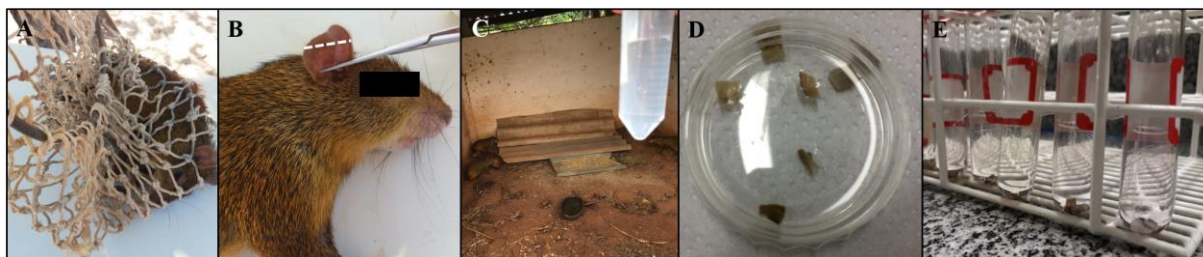


Figura 4. Colheita, transporte, processamento e armazenamento de fragmentos da pele do pavilhão auricular apical de cutias. **(A)** Contenção mecânica do animal, para aplicação do plano anestésico e eutanásico. **(B)** Região de colheita do pavilhão auricular do animal. Linha tracejada demarca o pavilhão auricular apical, região utilizada no experimento. **(C)** Transporte das amostras em PBS a 4 °C. **(D)** Tricotomização e fragmentação do tecido. **(E)** Armazenamento das amostras biológicas em fixador histológico.

4.5. Processamento histológico

Para a confecção das lâminas histológicas, fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% tamponado em PBS (**Figura 4E**), visando interromper o processo de autólise pelo qual qualquer tecido passa ao ser retirado de seu organismo (NUNES; CINSÁ, 2016). Após o período de fixação de 21 dias, fragmentos foram submetidos a banhos em graduação crescente de álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100%), para que ocorresse a desidratação do tecido. Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em xilol, necessário para que o álcool que entrou nas peças na etapa anterior, também insolúvel na parafina, fosse substituído por uma substância apolar e que possuísse afinidade com a parafina, promovendo uma clarificação do tecido. Depois da diafanização, os tecidos foram impregnados em parafina, que ao adentrarem nos espaços vazios dos mesmos e solidificar, promoveu rigidez suficiente para a realização dos cortes. Em seguida, os tecidos foram emblocados em parafina líquida pois ela envolveu o exterior da peça e, após esfriar e endurecer, resultou em um bloco que foi submetido à microtomia. Para que fosse possível analisar o tecido em microscópio óptico, foi necessária a disposição de uma secção de 5,0 μm do tecido na lâmina.

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura, o tecido foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5% em PBS tamponado (**Figura 4E**) por um período de 14 dias. Em seguida, os tecidos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em água destilada, lavados com PBS, água destilada e desidratados com concentrações crescentes de álcool etílico (15–100%).

4.6. Avaliação morfológica, morfométrica, ultraestrutural e proliferativa

4.6.1. Avaliação das camadas da pele, identificação e quantificação de tecidos e células

As lâminas foram submetidas a banhos com xilol para retirada do excesso de parafina, em seguida o tecido foi reidratado com banhos em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 70%). Então, os cortes histológicos foram submetidos a banhos em solução de hematoxilina, que em virtude de possuir atração por substâncias ácidas presente nos tecidos, principalmente no núcleo, corou de azul-púrpura. Em seguida, os tecidos foram submetidos à coloração com eosina, que ao possuir atração por substâncias com caráter básico presentes principalmente no citoplasma e fibras colágenas, corou em vermelho. Finalmente, o tecido foi novamente desidratado com concentrações crescentes de álcool etílico (95%, 100%), diafanizado em xilol e montado com lamínula (QUEIROZ NETA et al., 2018).

Para as análises, foram obtidos 20 registros fotográficos de campos aleatórios de cada lâmina em aumento de 40x com o uso de fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Alemanha). Em cada lâmina (1 lâmina/animal) foi realizada a identificação e mensuração da epiderme (em μm) e suas camadas (córnea, camadas intermediárias e basal); identificação e mensuração da derme (em μm); mensuração da pele total (em μm); identificação e mensuração do pericôndrio (em μm); quantificação de células epidermais, queratinócitos, melanócitos, fibroblastos; quantificação de condrócitos e lacunas na cartilagem; identificação de glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos. Para todas as análises, foi utilizado o software Image J (US National Institutes of Health, Bethesda, Rockville, USA) (BORGES et al., 2017a). Para a obtenção dos valores finais, foi calculada a média dos valores de quantificações e mensurações de todas as imagens analisadas dos oito animais.

4.6.2. Análise da matriz extracelular

Para a quantificação de fibras colágenas, as lâminas foram submetidas a banhos com xilol para retirada do excesso de parafina. Em seguida o tecido foi reidratado com banhos em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 70%). Os cortes histológicos foram expostos a solução de Bouin em estufa (BÚFALO et al., 2016), utilizado para intensificar a cor final e aderir o corante ao tecido. Os núcleos foram corados com hematoxilina férrica de Weigert. Com a solução tricrômica, o colágeno foi corado em azul. Logo após, uma solução

de ácido acético foi usada para enxaguar as seções após a coloração, o que produziu um tom mais delicado de coloração do tecido (TOLOSA et al., 2003). Finalmente, o tecido foi novamente desidratado com concentrações crescentes de álcool etílico (95%, 100%), diafanizado em xilol e montado com lamínula (BORGES et al., 2017a).

Para as análises, foram obtidos 10 registros fotográficos aleatórios de cada lâmina em aumento de 40x com o uso de fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Alemanha), sendo selecionada uma área da derme superficial com presença de fibras colágenas. Em cada lâmina (1 lâmina/animal) foi analisada a proporção volumétrica da matriz de fibras colágenas. A quantidade de fibras presentes em cada área foi avaliada e registrada aplicando o plug-in do software Threshold Color e a conversão de formato red, green e blue (RGB) de 32 bits, sendo avaliados os seguintes parâmetros: área de imagem (μm^2), área de colágeno (μm^2) e porcentagem de colágeno (densidade) calculada como área total com fibras de colágeno dividida pela área total da seção analisada (MORAIS et al., 2017). Para a obtenção do valor final, foi calculada a média dos valores de percentual de fibras colágenas de todas as imagens analisadas dos oito animais.

Para a quantificação de fibras elásticas, as lâminas foram submetidas a banhos com xilol para retirada do excesso de parafina, em seguida o tecido foi reidratado com banhos em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 70%). Os cortes histológicos foram então expostos à hematoxilina Férrica de Weigert para coloração do núcleo. Em seguida, os tecidos foram expostos ao corante de Weigert (fucsina básica/resorcina) para corar as fibras elásticas de preto. Posteriormente, os tecidos foram submetidos ao corante de van Gieson (fucsina ácida) para coloração das fibras colágenas de vermelho. Finalmente, o tecido foi novamente desidratado com concentrações crescentes de álcool etílico (95%, 100%), diafanizado em xilol e montado com lamínula (HERNÁNDEZ-MORERA et al., 2017).

Para visualização das fibras, foram obtidos registros fotográficos aleatórios de cada lâmina em aumento de 100x com o uso de fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Alemanha).

4.6.3. Avaliação ultraestrutural

A amostra desidratada foi levada ao equipamento de secagem ao ponto crítico de dióxido de carbono (CO_2) (K850 Critical Point Dryer, Quorum Technologies, Reino Unido),

visando sua completa secagem sem a deformação da amostra. Em seguida, a amostra foi montada no suporte porta amostras do MEV (“stub”) e metalizado com uma fina camada de ouro (com até 20–30 nm de espessura) para melhorar a condução dos elétrons. Logo após, a amostra foi visualizada em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN VEGA3 Tescan, República Tcheca) para a visualização da ultraestrutura do tecido (DEDAVID et al., 2007).

4.6.4. Análise do potencial proliferativo celular

As lâminas foram submetidas a banhos com xilol para retirada do excesso de parafina e, em seguida, o tecido foi reidratado com banhos em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 70%). Posteriormente, os cortes histológicos foram colocados em solução de coloração de prata preparada em 1 parte de gelatina a 2% em ácido fórmico aquoso a 1% e 2 partes de solução aquosa a 50% de nitrato de prata em câmara escura por 30 min, lavados e expostos à solução de metabissulfito de sódio (3%) e tiosulfato de sódio (3%). Finalmente, o tecido foi novamente desidratado com concentrações crescentes de álcool etílico (95%, 100%), diafanizado em xilol e montado com lamínula (BORGES et al., 2017a). Assim, foram avaliados os pontos escuros marcados pelo nitrato de prata ligados a proteínas do núcleo e contabilizados de acordo com localização que a célula foi marcada (BORGES et al., 2018).

Para a análise, foram obtidos 12 registros fotográficos aleatórios de cada lâmina em aumento de 100x por meio de fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Alemanha). Nas oito lâminas (1 lâmina/animal), foram contados ao total 100 núcleos de células corados e selecionados aleatoriamente, onde foram calculadas as médias da área de cada AgNOR, área de AgNOR/célula e quantidade de AgNOR/célula. Para todas as análises, foi utilizado o software Image Pro-Plus (YANG et al., 2013). Para a obtenção dos valores finais, foi calculada a média dos valores de quantidade de AgNOR/célula, área de cada AgNOR e área de AgNOR/célula de todas as imagens analisadas dos oito animais.

4.7. Análise dos dados

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) de um total de oito repetições (um animal/uma repetição), sendo apresentados de forma descritiva. Comparações

dos dados observados nas cutias foram realizadas com estudos em outros roedores e mamíferos em geral.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação das camadas da pele, identificação e quantificação de tecidos e células

Inicialmente, observou-se que a pele do pavilhão auricular apical de cutias foi constituída de duas camadas, a epiderme e a derme. Além disso, após a pele observou-se a presença da hipoderme, tecido muscular e cartilaginoso (**Figura 5A**).

A epiderme do pavilhão auricular apical é constituída por camada basal, camadas intermediárias (granulosa e espinhosa) e camada córnea, denotando um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Embora a camada basal e a córnea sejam bem delimitados, isso não foi observado com a granulosa e a espinhosa, sendo denominadas camadas intermediárias. A camada basal compreendeu uma única camada de células com uma forma cuboide, a camada espinhosa geralmente observada com apenas uma camada de células e a camada córnea como uma camada de células mortas e achatadas sem núcleo. Além disso, a epiderme pode ainda ser dividida em viável (nucleada) que é formada pelas camadas basal e intermediárias e a não viável (anucleada e queratinizada), formada pela camada córnea. Ainda na epiderme, evidenciou-se a presença de melanócitos na camada basal e de queratinócitos em todas as camadas, constituindo assim três camadas de células (**Figura 5B**).

Logo abaixo, na região dermal, não foi possível identificar suas camadas, a papilar e reticular. Isso ocorreu em virtude do tipo de tecido que foi estudado, sendo caracterizada como pele fina, diferentemente da pele grossa que provavelmente permitiria a distinção entre as duas regiões. Ainda, na derme, foram identificadas células, como os fibroblastos, capilares sanguíneos e anexos dermais, como as glândulas sebáceas e sudoríparas, e os apêndices queratinizados à qual foi associado com a estrutura do folículo piloso (**Figura 5C**).

Quanto ao tecido cartilaginoso, foi possível realizar a mensuração do pericôndrio, identificação e quantificação de condrócitos, bem como de lacunas, que são os locais ocupados pelas condrócitos na matriz cartilaginosa, obtendo-se um valor de $37,21 \pm 10,86$ lacunas (**Figura 5D**).

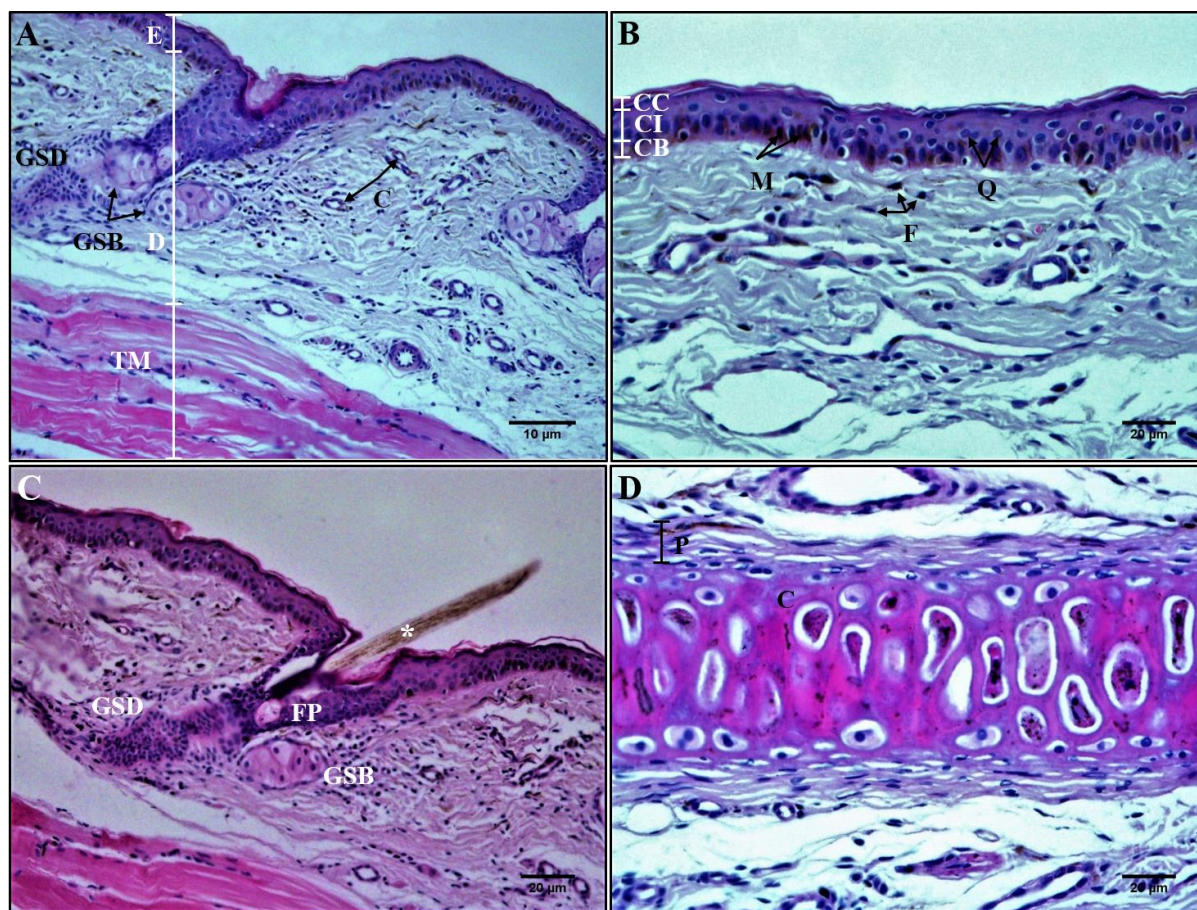


Figura 5. Fotomicrografias da pele de cutia na região do pavilhão auricular apical coradas com hematoxilina-eosina. **(A)** Pele de cutia. Epiderme (E), derme (D), tecido muscular (TM), glândula sebácea (GSB), glândula sudorípara (GSD), capilares sanguíneos (C). **(B)** Pele corada. Camada córnea (EC), camadas intermediárias (CI), camada basal (CB), melanócitos (M), queratinócitos (Q), fibroblastos (F). **(C)** Corte perpendicular da pele evidenciando as estruturas anexas e glândulas. Folículo piloso (FP), glândula sebácea (GSB), glândula sudorípara (GSD), haste do pelo (*). **(D)** Tecido cartilaginoso. Condrócito (C), pericôndrio (P). A 20x. B, C e D 40x.

Em estudos morfométricos do tecido, foi realizada a mensuração das camadas da epiderme, obtendo-se para a camada basal, intermediárias e córnea média de $9,91 \pm 2,11 \mu\text{m}$, $16,37 \pm 6,23 \mu\text{m}$ e $5,26 \pm 2,46 \mu\text{m}$, respectivamente (**Figura 6A**), perfazendo uma espessura total da epiderme de $30,51 \pm 6,55 \mu\text{m}$. Na mensuração da derme, foi obtido uma média de $183,10 \pm 44,01 \mu\text{m}$, resultando uma espessura total da pele de $211,76 \pm 46,00 \mu\text{m}$. Adicionalmente, foi mensurado no tecido cartilaginoso o pericôndrio, região responsável pela nutrição e suporte dos condrócitos presentes na cartilagem, obtendo-se uma média de $27,57 \pm 6,07 \mu\text{m}$ (**Figura 6B**).

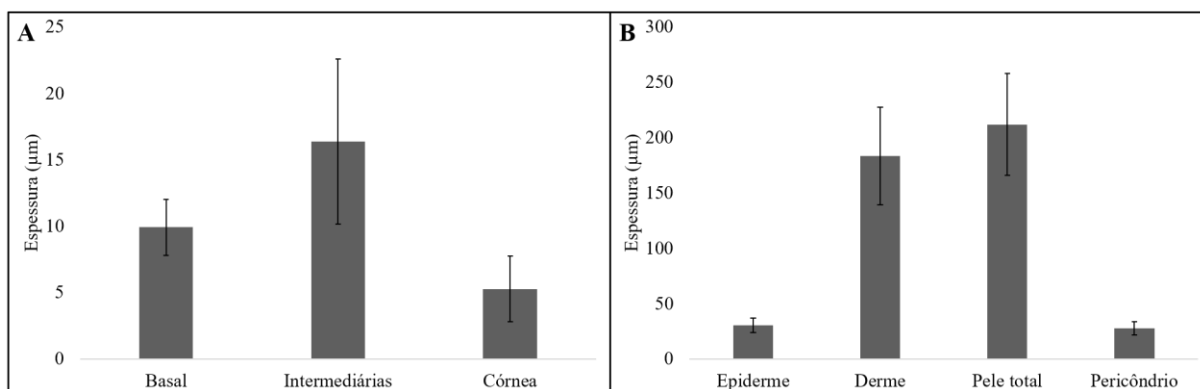


Figura 6. Mensuração da epiderme e suas camadas, derme, pele total e do pericôndrio do pavilhão auricular apical de cutias utilizando coloração de hematoxilina-eosina. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). **(A)** Mensuração das camadas epidermais. **(B)** Mensuração da epiderme, derme, pele total e pericôndrio.

Além da mensuração das diferentes camadas da pele, foram identificados e quantificados distintos tipos celulares presentes na epiderme e derme (**Tabela 1**). Na epiderme foram quantificados melanócitos e queratinócitos com média de $12,59 \pm 4,66$ e $14,74 \pm 4,24$, respectivamente. Ainda nesta camada, foram contabilizadas $61,66 \pm 15,22$ células epidermais onde se incluem além dos tipos celulares citados anteriormente, células de Merkel, e de Langerhans. Na derme, foi quantificada uma população de $103,59 \pm 24,73$ fibroblastos e na cartilagem uma média de $32,73 \pm 9,04$ condrócitos.

Tabela 1. Quantificação de diferentes tipos celulares da epiderme e derme do pavilhão auricular apical de cutias. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP)

Tipo celular	Número de células (média $\pm$ DP)	Variação
Melanócitos	$12,59 \pm 4,66$	0–29
Queratinócitos	$14,74 \pm 4,24$	6–29
Células epidermais	$61,66 \pm 15,22$	29–132
Fibroblastos	$103,53 \pm 24,73$	43–171
Condrócitos	$32,73 \pm 9,04$	13–60

5.2. Análise da matriz extracelular

A análise das fibras colágenas presentes na matriz extracelular foi possível pela utilização da coloração tricrômica de Gomori, sendo possível analisar e quantificar seu perfil de distribuição na derme, bem como seu padrão de espessamento, que apareceu em azul nas camadas mais profundas (**Figura 7A**). Assim, foi padronizada uma medida de área nas fotomicrografias para que fossem quantificadas as fibras colágenas, obtendo-se uma densidade de colágeno no valor de $68,00 \pm 5,50\%$.

Contudo, por se tratar de tecido conjuntivo, o tricrômico de Gomori não é capaz de diferenciar as fibras colágenas das elásticas que também estão presentes na matriz extracelular. Deste modo, foi realizada uma segunda coloração por meio do método de hematoxilina de Weigert-Van Gieson para visualização das fibras elásticas (**Figura 7B**). Apesar da sua fundamental importância, na região da pele do pavilhão auricular apical, as fibras elásticas mostraram-se em baixas quantidades, não sendo possível realizar sua quantificação.

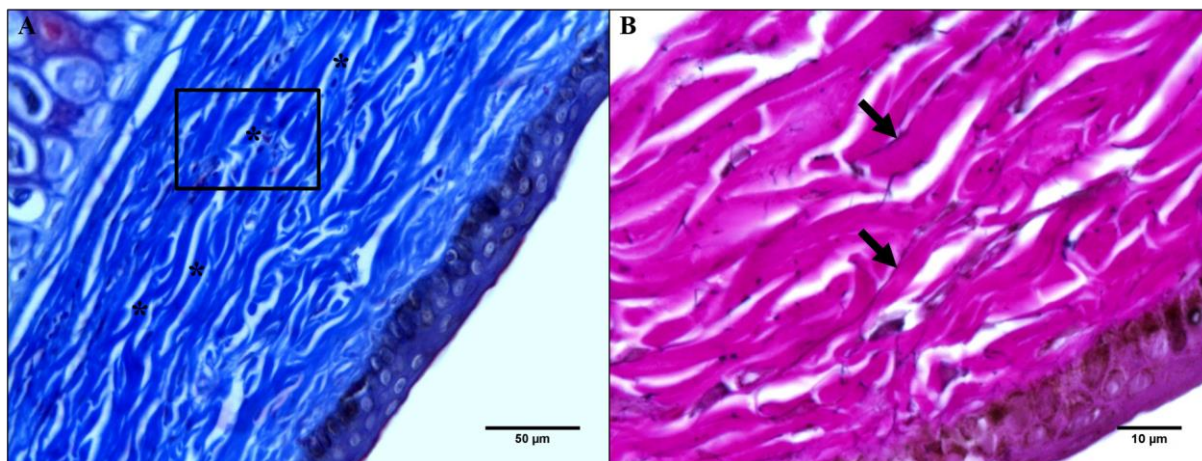


Figura 7. Fotomicrografias da pele do pavilhão auricular apical de cutia para quantificação das fibras presentes na matriz extracelular. **(A)** Corte perpendicular da pele corado com tricrômico de Gomori para quantificação da matriz extracelular evidenciando a área analisada. Fibras colágenas (*). **(B)** Corte da pele identificando fibras colágenas pelo método de hematoxilina de Weigert-Van Gieson. Fibras elásticas (→). **A** 40x. **B** 100x

5.3. Avaliação ultraestrutural dos tecidos

A MEV permitiu uma aproximação das estruturas sem perda da qualidade, bem como a visualização de todos os lados do fragmento. As etapas as quais os fragmentos teciduais

foram submetidos (fixação, pós-fixação, desidratação, secagem ao ponto crítico) levaram a formação de danos no tecido, como separação e retração das camadas celulares (**Figura 8A**).

Na visualização superficial da epiderme, foi possível observar detalhadamente a camada córnea e o desprendimento de suas células anucleadas e queratinizadas (**Figura 8B**). Com a visualização lateral do tecido, observou-se as suas camadas constituintes (epiderme, derme e tecido cartilaginoso), bem uma visão de sua espessura. Ainda, foi possível observar as fibras da matriz extracelular, responsáveis por manter a adesão e conexão entre as camadas (**Figura 8C**). Adicionalmente, com a visão lateral do fragmento foi possível observar detalhes do tecido cartilaginoso, com uma ampliação da estrutura e detalhamento das lacunas, que são os espaços onde estão alojados os condrócitos, principais células desse tecido (**Figura 8D**). Com a visualização superior do fragmento, foi observado com maiores detalhes um dos anexos da pele, o pelo, mostrando seu local de saída da epiderme (**Figura 8E**).

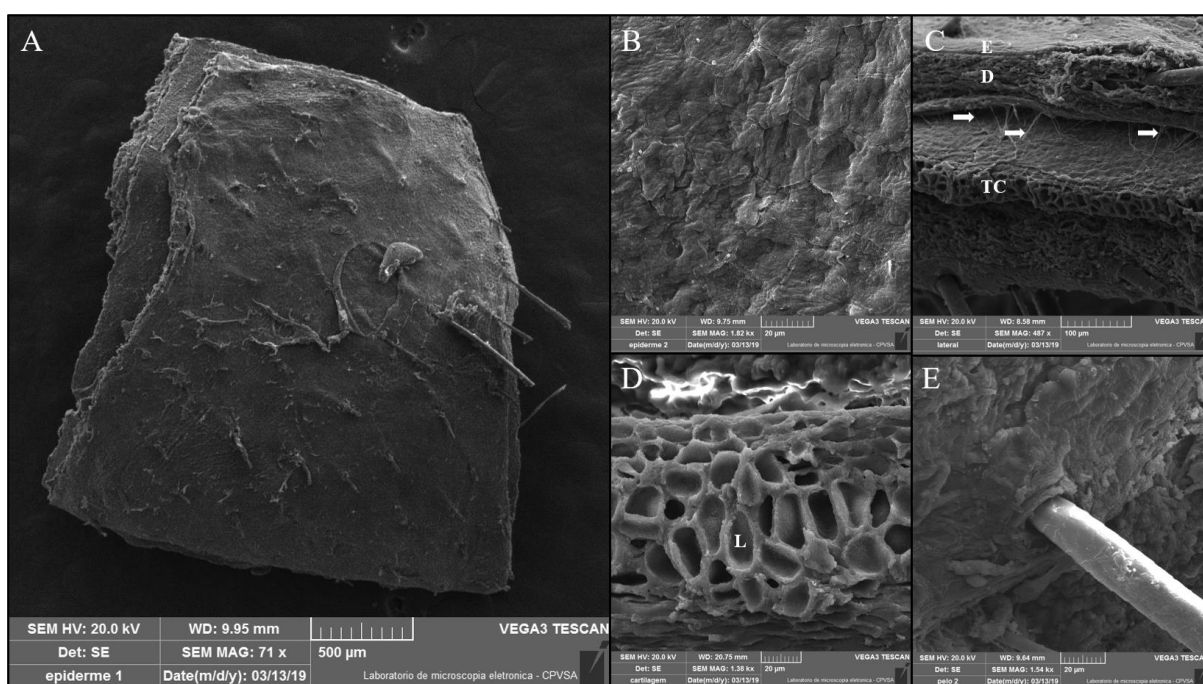


Figura 8. Eletrofotomicrografia de varredura da pele do pavilhão auricular apical de cutia. **(A)** Panorama geral do fragmento tecidual. **(B)** Superfície da epiderme, detalhando a camada córnea. **(C)** Visualização lateral do fragmento, mostrando a junção epiderme-derme-cartilagem. Epiderme (E), derme (D), tecido cartilaginoso (TC). Fibras da matriz extracelular (seta branca). **(D)** Região do tecido cartilaginoso, onde observa-se as lacunas. Lacuna (L). **(E)** Visualização superior do fragmento, evidenciado um pelo.

5.4. Análise do potencial proliferativo celular

O potencial proliferativo celular foi determinado utilizando a marcação das regiões organizadoras nucleolares com nitrato de prata em fibroblastos presentes na região superficial da derme (**Figura 9A**). O potencial proliferativo foi determinado em $1,69 \pm 0,68$ AgNOR/célula (**Figura 9B**). Ainda, foi quantificada a área dos AgNORs individualmente, bem como a área total ocupada pelos mesmos nas células, obtendo-se valores de $1,86 \pm 1,07$ e $3,15 \pm 1,57$ respectivamente (**Figura 9C**).

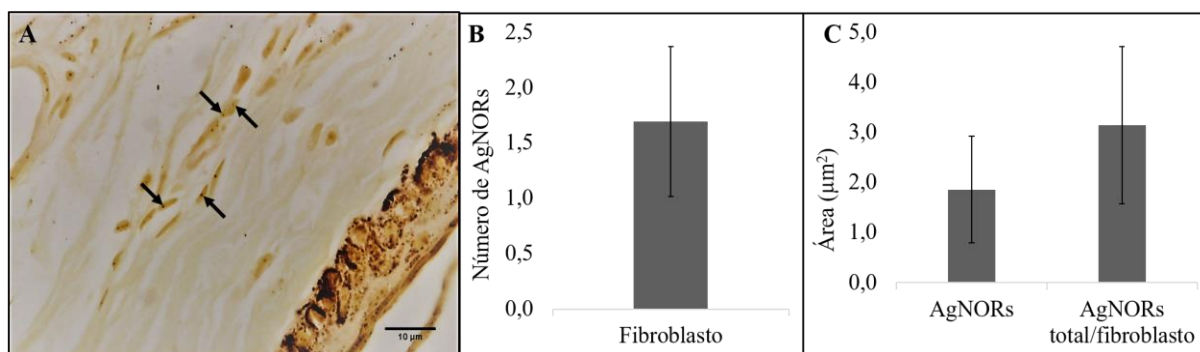


Figura 9. Atividade proliferativa da pele do pavilhão auricular apical de cutia utilizando a marcação por nitrato de prata para a quantificação e mensuração de NORs nos fibroblastos dérmicos. **(A)** Fotomicrografia da pele do pavilhão auricular apical de cutia. NOR (seta) (40x). **(B)** Quantificação do número de AgNORs/célula, área de AgNOR e área de AgNOR/célula. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). **(C)** Quantificação do número de AgNORs/célula, área de AgNOR e área de AgNOR/célula. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível analisar e avaliar toda a estrutura da pele do pavilhão auricular apical de cutias, em especial suas características morfológicas, morfométricas, ultraestruturais, bem como o potencial proliferativo celular. Estudos dessa natureza mostram-se importantes principalmente na padronização de protocolos que visam à conservação do material genético desses animais, garantindo sua aplicação em posteriores biotécnicas (PRAXEDES et al., 2018).

Histologicamente, a pele do pavilhão auricular apical de cutias dividiu-se em duas camadas, a epiderme e a derme, sendo condizente com o padrão já apresentado para mamíferos (SAMUELSON, 2007), onde foi possível observar diferenças celulares e estruturais entre as camadas. Além dessas duas camadas, em tecidos da pele é possível evidenciar normalmente uma outra camada, mais profunda e que não pertence a pele, a região hipodérmica (SOUZA et al., 2009). Contudo, no presente trabalho não foi possível identificá-la. Em contrapartida, foi identificado o tecido muscular, sendo evidente com o encontrado por Isola et al. (2013) no tegumento de pacas.

De forma geral, a estrutura da epiderme de mamíferos é organizada por camadas, sendo encontradas a camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e a camada córnea queratinizado, recebendo assim o nome de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado (HIB, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Todavia, nesse estudo foi observável apenas a camada basal e a córnea bem delimitados, e as camadas intermediárias, sendo constituídas pela granulosa e espinhosa, já que entre si elas não apresentavam muita distinção, conforme já observado em pacas (ISOLA et al., 2013) e catetos (BORGES et al., 2017a). Esse padrão de divisão das camadas epidermais está associado ao tipo de pele estudado, onde ela pode ser dividida em dois tipos, a pele fina e grossa, ou ainda as características morfológicas específicas do animal estudado (SOUZA et al., 2009).

Dessa forma, a pele fina de mamíferos é geralmente composta por três a quatro camadas de células na epiderme, conforme foi observado nesse estudo e na literatura, diferindo da pele grossa que é composta por cinco camadas de células epidermais (SILVA, 2015). Esse valor também difere daquele encontrado por Isola et al. (2013) em pacas, onde foi observado a presença de quatro a seis camadas celulares na epiderme. Além disso, as camadas granulosa e lúcida na epiderme da pele fina são menos distinguíveis ou nem estão presentes (SILVEIRA et al., 2009).

Em cutias, a epiderme pode ser dividida em duas zonas, a viável que é constituída por células nucleadas (camada basal e intermediárias) e a não viável, constituída por células não nucleadas e queratinizadas. Essa divisão é condizente com aquela apresentada por Grabau et al. (1995), onde para alguns mamíferos, eles dividiram a epiderme em uma área viável com células nucleadas (camada granular, espinhosa e basal) e não viável com uma camada de células anucleadas e queratinizadas (camada córnea).

Assim, diferentes estudos têm sido realizados com roedores visando a descrição histomorfológica do seu tegumento, como pacas (ISOLA et al., 2013) e ratas Wistar (SILVA, 2015), onde foi evidenciado que eles apresentam pele grossa. Em outros mamíferos como catetos, Borges et al. (2017a) realizaram a descrição histológica e viram que sua pele é do tipo fina. Já Praxedes (2019) realizou essa descrição em onça-pintada, também observando uma pele fina.

Quando se compara a espessura da epiderme de cutias ($30,51 \pm 6,55 \mu\text{m}$) com pacas ($31,20 \pm 3,80 \mu\text{m}$) (ISOLA et al., 2013), observou-se valores semelhantes. Em contrapartida, os valores da camada córnea de pacas ($6,86 \pm 1,36 \mu\text{m}$) são maiores que de cutia ($5,26 \pm 2,46 \mu\text{m}$). Em estudo realizado Grabau et al. (1995) eles obtiveram o tamanho total da epiderme de alguns roedores, e observaram camundongos (*Mus musculus*) com $46,70 \mu\text{m}$, ratos com $86,00 \mu\text{m}$ e cobaias com $115,40 \mu\text{m}$ sendo todos maiores que o observado em cutias.

Em estudo realizado com preás foi obtido um valor de $32,0 \pm 4,4 \mu\text{m}$ para a epiderme destes animais (AQUINO et al., 2018), sendo valores próximos ao encontrado em cutias no presente estudo. Nesse mesmo estudo, também foi mensurada a espessura das camadas epidermais, onde foi observado que em preás a camada basal foi menos espessa ($4,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$), quando comparado com cutias ($9,91 \pm 2,11 \mu\text{m}$), bem como a camada córnea ($3,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$ vs $5,26 \pm 2,46 \mu\text{m}$) e apenas as camadas intermediárias de preás ($23,30 \pm 8,10 \mu\text{m}$) foi mais espessa do que em cutias ($16,37 \pm 6,23 \mu\text{m}$). Essa diferença entre os valores demonstra que apesar de serem animais pertencentes à mesma ordem e com o mesmo local de colheita das amostras somáticas, os valores apresentaram divergências.

Além da mensuração das camadas epidermais, foram quantificados diferentes tipos celulares presentes nessa região, como os melanócitos, células de grande importância na pele que produzem o pigmento melanina e estando localizados na camada basal do tecido (GARTNER, 2017). Esse pigmento ao ser produzido migra para células próximas chamadas de queratinócitos, que são responsáveis por armazenar a melanina (ANDRADE; FERRARI, 2014).

Os queratinócitos localizaram-se em sua grande maioria na camada basal e intermediárias, próximos aos melanócitos. Em geral, é o tipo celular mais abundante na epiderme, entretanto, no presente estudo essa afirmação não se concretizou, pois, a quantidade de queratinócitos foi muito parecida com a de melanócitos (ANDRADE; FERRARI, 2014). Assim, pode-se observar com a quantidade de melanócitos e queratinócitos de cutias, que esse valor está relacionado com a coloração da pele, pois em preás que possuem uma coloração mais escura, foi obtido um valor de $29,9 \pm 6,2$ melanócitos (AQUINO et al., 2018) em comparação com os $12,59 \pm 4,66$ obtidos no presente estudo.

Em estudo realizado com catetos por Borges et al. (2017a), foi encontrado um valor de $43,4 \pm 16,4$ melanócitos, valor bem elevado quando comparado com o encontrado em cutias, mas condizente com a pelagem escura dos catetos. Também em um mamífero silvestre, Praxedes (2019) realizou a quantificação de melanócitos em onças-pintadas com pelagem escura e clara, e observou que as de coloração escura apresentavam mais melanócitos que as de coloração clara. Em mamíferos domésticos, foi observado que a população de melanócitos e queratinócitos de cães e gatos variaram de 1 melanócito para cada 10 a 20 queratinócitos (SOUZA et al., 2009).

Logo abaixo da epiderme em mamíferos no geral, é possível observar normalmente a membrana basal (SAMUELSON, 2007). Contudo, nesse estudo não foi possível distingui-la de forma tão evidente, que pode variar conforme o tipo de tecido que esteja sendo avaliado. Isso pode ser evidenciado quando Isola et al. (2013) identificaram a membrana basal no tegumento de pacas. Em sequência, logo abaixo da membrana basal é possível observar a derme da cútis de cutias, assim como são descritos para roedores silvestres e domésticos, bem como em mamíferos maiores (BORGES et al., 2017a; NASCIMENTO et al., 2018; PRAXEDES, 2019).

Em geral, a derme é constituída por um tecido conjuntivo, com diferentes tipos de fibras, uma grande quantidade de fibroblastos, folículos pilosos e glândulas anexas, sendo responsável pela nutrição e suporte da epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Ela pode ser dividida em duas camadas, a derme papilar e a reticular, onde a camada papilar é a mais superficial e delgada e a reticular é mais profunda e com presença de fibras elásticas (GARTNER, 2017). Neste estudo não foi possível realizar a distinção entre as camadas papilar e reticular, isso corrobora com estudos realizados em preás (AQUINO et al., 2018) e cobaios (CIENA et al., 2019). Contudo, em pacas (ISOLA et al., 2013) e ratos Wistar (SILVA, 2015) houve distinção entre essas duas camadas, possivelmente resultado do espessamento da derme nas regiões analisadas pelos pesquisadores.

Quanto a sua mensuração, a derme de cutias obteve valores de $183,10 \pm 44,01$, o que difere de mensurações realizadas em outros roedores, como preás com $258,20 \pm 22,89 \mu\text{m}$ (AQUINO et al., 2018), ratos Wistar com $673,63 \pm 222,46 \mu\text{m}$ (SILVA, 2015), região do pescoço de pacas com $2768,20 \pm 183,60 \mu\text{m}$ (ISOLA et al., 2013). Em mamíferos silvestres, foram encontrados valores de $222,6 \mu\text{m}$ em catetos (BORGES et al., 2017a) e em onça-pintada preta e amarela valores de $242,0 \pm 8,4 \mu\text{m}$ e $243,9 \pm 17,0 \mu\text{m}$, respectivamente (PRAXEDES, 2019).

Ainda na derme de mamíferos em geral é comum ser observado principalmente um tipo celular, os fibroblastos, responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular através da síntese de proteínas que constituem as fibras colágenas, elásticas e reticulares (SAMUELSON, 2007). Além de serem as células eletivas para a conservação animal através de sua aplicação em determinadas biotécnicas reprodutivas, como a clonagem (PRAXEDES et al., 2018). Tendo em vista a importância desse tipo celular, foi realizada sua quantificação, onde foi obtido um valor de $103,53 \pm 24,73$ fibroblastos. Esse valor não diferiu muito daquele observado por Aquino et al. (2018) quando encontraram $112,1 \pm 11,3$ fibroblastos em preás. Já em ratos Wistar, a quantificação de fibroblastos realizada por Silva (2015) objetivou relacioná-los com a área ocupada por fibras colágenas que são produzidas por estas células, onde obteve-se $7,14 \pm 4,71$ de células por mm^2 da região tegumentar do animal. Em contrapartida, no estudo realizado por Praxedes (2019) foram obtidos valores de $23,0 \pm 2,9$ e $26,8 \pm 2,7$ fibroblastos para onça amarela e preta, respectivamente.

Também na região dermal foram encontrados folículos pilosos conforme pode ser observado na eletrofotomicrografia, e glândulas anexas, como as sudoríparas e sebáceas, que na maioria das vezes estavam próximas do bulbo folicular, sendo similar ao observado em outros roedores como em preás (AQUINO et al., 2018), pacas (ISOLA et al., 2013) e outros mamíferos em geral (GARTNER, 2017).

Continuando na derme, foram realizadas a identificação e quantificação das fibras colágena e elástica presentes na sua matriz extracelular, tendo em vista que são as mais abundantes encontradas na pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Dessa forma, utilizando colorações específicas foi realizada a identificação e posterior quantificação da matriz de fibras colágenas presentes na derme do pavilhão auricular apical de cutias, obtendo-se valor de 68%.

Os valores encontrados neste estudo se divergiram de ratos, onde se obteve um percentual de 45% de fibras colágenas (SILVA, 2015). Já em felídeos silvestres, observou-se um percentual de fibras colágenas de 65% e 49% para onças-pintadas amarelas e pretas

respectivamente (PRAXEDES, 2019). Em mamíferos domésticos, como cães e gatos, observou-se o perfil de colágeno de 87% (SOUZA et al., 2009). Essa diferença entre os valores de fibras colágenas se dá principalmente pela diferença na quantidade de fibroblastos da derme, intimamente relacionado com o equilíbrio entre proliferação e apoptose celular (SOUZA et al., 2009).

Para visualização das fibras elásticas presentes na derme, foi realizada a coloração de hematoxilina de Weigert-Van Gieson, onde foi observado uma baixa quantidade das mesmas e distribuídas de forma espaçada, impossibilitando sua quantificação. Esse padrão também foi observado na pele auricular de suínos, onde as fibras estavam espaçadas e em baixa quantidade (KHIAO IN et al., 2019). Apesar de estar em baixa quantidade, a falta dessa fibra poderia acarretar em deformidades no tecido, bem como provocar doenças degenerativas e inflamatórias em geral (WHITE et al., 2017).

Abaixo da derme no pavilhão auricular apical de cutias, foi possível observar um outro tipo de tecido, o cartilaginoso, um tipo de tecido conjuntivo com características especiais que o torna responsável principalmente pela manutenção da estrutura e da forma do tecido tegumentar do animal (SAMUELSON, 2007), sendo visível pela análise ultraestrutural e histológica, além disso, ele também é responsável pela absorção de choques mecânicos. Por não possuir vascularização própria, ele é nutrido pelo pericôndrio, uma camada de tecido conjuntivo que fica ao redor da cartilagem, fornecendo toda a nutrição (HIB, 2003).

Primeiramente, foi realizada a mensuração do pericôndrio, obtendo-se um valor de $27,57 \pm 6,07 \mu\text{m}$. Em seguida foi realizada a identificação e quantificação do principal tipo celular presente no tecido cartilaginoso, os condrócitos, já que essas células são as responsáveis pela formação da matriz cartilaginosa., estando localizadas nas lacunas do tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) visualizadas através da MEV e histologia clássica. Foi observado uma quantidade de $32,73 \pm 9,04$ condrócitos em cutias, sendo um valor superior ao encontrado em preás $27,5 \pm 4,7$ (AQUINO et al., 2018). Entretanto, esse valor mostrou-se menor quando foi comparado com um estudo realizado por Cardoso (2018) onde foi realizada a conservação do tecido cartilaginoso de ratos Wistar sobre diferentes tratamentos alcalinos e obteve uma quantidade de $38,75 \pm 5,95$ condrócitos.

Finalmente, neste estudo foi avaliada e mensurada a atividade proliferativa de fibroblastos dérmicos de cutias, sendo um importante parâmetro indicativo da qualidade do material. Em geral, as regiões organizadoras nucleolares indicam a taxa de divisão da célula (MONDAL et al., 2015). Assim, foi obtido um valor de 1,69 AgNOR/célula, com área individual de $1,86 \mu\text{m}^2$ e ocupando uma área de $3,15 \mu\text{m}^2$ em cada célula, onde esses valores

mostram similaridade com a atividade proliferativa de células da subplacenta de preá (BEZERRA et al., 2018). Já em catetos, foi encontrado valor de $2,48 \pm 0,95$ AgNOR/núcleo e área de $1,15 \pm 0,60 \mu\text{m}^2$ por AgNOR (BORGES et al., 2017a), mostrando-se uma quantidade maior de AgNOR por célula, mas ocupando uma área menor. Em estudo desenvolvido por Praxedes (2019), foi encontrado um valor de 1,2–1,3 AgNOR/célula em onça-pintada preta e amarela.

Por outro lado, em estudo realizado em ovinos foi observado um valor de $9,04 \pm 0,96$ AgNORs em células do testículo destes animais para o estabelecimento de parâmetros andrológicos (CHACUR et al., 2015). Nesse estudo foi encontrado um valor muito superior na quantidade de AgNORs tendo em vista a predominância de células germinativas na região.

Assim, foi evidenciado com o presente estudo que existiram similaridades e diferenças das cutias com outros roedores e mamíferos em geral. Quando comparado com outros roedores, as cutias apresentaram similaridades quanto à distinção das camadas epidermais, a espessura da epiderme e quantidade de fibroblastos. Todavia houve divergências, com uma quantidade menor de camadas de células epidermais, camada córnea e intermediárias com espessura menor, enquanto que a camada basal apresentou valores maiores, a derme foi menos espessa e uma quantidade menor de melanócitos.

Elas mostram-se semelhantes aos mamíferos quanto a estrutura geral do tecido e suas camadas, a quantidade de camadas de células epidermais, divisão da epiderme em viável e não viável, não distinção das camadas papilar e reticular na derme e a pouca quantidade de fibras elásticas. Entretanto, diferiu quanto à espessura da epiderme que foi menor, os valores próximos de melanócitos e queratinócitos, a menor quantidade de melanócitos influenciando na pelagem mais clara, quantidade maior de fibroblastos, quantidade de fibras colágenas e padrão proliferativo.

7. CONCLUSÕES

Dessa forma, este foi o primeiro trabalho a caracterizar a pele do pavilhão auricular apical de cutias, evidenciando que apesar de algumas similaridades, há parâmetros que diferem de outros roedores bem como de outros mamíferos, ressaltando a importância de estudos que visem a descrição do pavilhão auricular apical desta espécie bem como de outras como estratégia de conservação.

Assim, o conhecimento acerca da morfologia, morfometria, ultraestrutura e atividade proliferativa de do pavilhão auricular apical de cutias permite um maior conhecimento do tecido bem como o direcionamento e otimização de protocolos de cultivo *in vitro* e criopreservação dessas amostras. Ainda, esses conhecimentos podem ser empregados em estratégias que visem a conservação dessa espécie e de outras filogeneticamente próximas que se encontram ameaçadas de extinção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A.A.S.; ROSSATO, M.; OLIVEIRA, J.A.A.; HYPPOLITO, M.A. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 75, p. 43-49, 2009.

ALMEIDA, M.M.; CARVALHO, M.A.M.; CAVALCANTE FILHO, M.F.; MIGLINO, M.A.; MENEZES, D.J.A. Estudo morfológico e morfométrico do ovário de cutias (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 55-62, 2003.

ANDRADE, F.G.; FERRARI, O. Atlas digital de histologia básica. 1 ed., Londrina: UEL, 2014.

AQUINO, L.V.C.; PEREIRA, A.F.; PRAXEDES, E.A.; NASCIMENTO, M.B.; SILVA, M.B. Caracterização morfológica de tecidos somáticos derivados de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). In: **Anais do XXIV Seminário de Iniciação Científica da UFERSA**, Mossoró, RN, Brasil, 2018.

BALBANI, A.P.S.; MONTOVANI, J.C. Aspectos filogenéticos da audição. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 3, p. 37-45, 2008.

BEZERRA, F.V.F.; FAVARON, P.O.; MESS, A.M.; JÚNIOR, H.N.A.; OLIVEIRA, G.B.; PEREIRA, A.F.; MIGLINO, M.A.; OLIVEIRA, M.F. Subplacental development in *Galea spixii*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 2175-2182, 2018.

BORGES, A.A.; BEZERRA, F.V.F.; COSTA, F.N.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Histomorphological characterization of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) ear integumentary system. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 948-954, 2017a.

BORGES, A.A.; LIMA, G.L.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques. **Cytotechnology**, v. 9, p. 643-654, 2017b.

BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate

after vitrification of somatic tissue of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758).

Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 38, p. 350-356, 2018.

BRAGULLA, H.; BUDRAS, K.D.; MÜLLING, C.; REESE, S.; KÖNIG, H.E. Anatomia dos Animais Domésticos: texto e atlas colorido, vol. 2. Artmed, Porto Alegre, 2004.

BÚFALO, I.; GONZÁLEZ, S.M.; SILVA, C.B.; LINDQUIST, A.D.; BERGAMO, L.Z.; COSTA, C.B.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of equine preantral ovarian follicles. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, p. 243-250, 2016.

CARDOSO, L.D. **Avaliação histológica de cartilagens elásticas submetidas a diferentes processos de conservação e tratamento alcalino**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal), Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2018.

CARVALHO, M.A.M.; ARGÔLO-NETO, N.M.; SILVA, E.R.D.F.S.; LEITE, Y.K.C.; PESSOA, G.T.; BEZERRA, D.O.; FERRAZ, M.S.; CONDE JÚNIOR, A.M.; ROCHA, A.R. Structural plasticity and isolation of umbilical cord progenitor cells of agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) raised in captivity. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, p. 225-238, 2019.

CARVALHO, Y.K.P.; ARGÔLO-NETO, N.M.; AMBRÓSIO, C.E.; OLIVEIRA, L.J.; ROCHA, A.R.; SILVA, J.B.; CARVALHO, M.A.M.; ALVES, F.R. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 590-598, 2015.

CASTELO, T.S.; SILVA, A.M.; BEZERRA, L.G.P.; COSTA, C.Y.M.; LAGO, A.E.A.; BEZERRA, J.A.B.; CAMPOS, L.B.; PRAXEDES, E.C.G.; SILVA, A.R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). **Cryobiology**, v. 71, p. 442-447, 2015.

CHACUR, M.G.M.; IBRAHIM, D.B.; ARREBOLA, T.A.H.; SANCHES, O.C.; GIUFFRIDA, R.; OBA, E.; RAMOS, A.D.A. Avaliação da técnica de coloração AgNOR em testículos de ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 447-454, 2017.

CIENA, A.P.; BOLINA, C.D.S.; ALMEIDA, S.R.Y.; RICI, R.E.G.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, M.C.P.D.; MIGLINO, M.A.; WATANABE, I.S. Structural and ultrastructural

features of the agouti tongue (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1766). **Journal of Anatomy**, v. 223, p. 152-158, 2013.

CIENA, A.P.; SANTOS, A.C.D.; VASCONCELOS, B.G.; RICI, R.E.G.; ASSIS NETO, A.C.; ALMEIDA, S.R.Y.; MIGLINO, M.A.; WATANABE, I. S. Morphological characteristics of the papillae and lingual epithelium of guinea pig (*Cavia porcellus*). **Acta Zoologica**, v. 100, p. 53-60, 2019.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reproduction Nutrition Development**, v. 40, p. 493-504, 2000.

COMIZZOLI, P. Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 30-33, 2017.

CONDE-JUNIOR, A.M.; MOURA FORTES, E.A.; MENEZES, D.J.; OLIVEIRA LOPES, L.; CARVALHO, M.A. Morphological and morphometric characterization of agoutis peripheral blood cells (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler, 1831) raised in captivity. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 374-378, 2012.

COSTA, A.; PEREIRA, A.; ALMEIDA, K. Fauna helmintológica de cutias (*Dasyprocta spp.*): implicações para produção comercial – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 21, p.1-20, 2013.

COSTA, C.A.S.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS M.L.T.; FRANCA, P.H.F.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Aplicação da vitrificação para fins de conservação de tecido somático de cutias (*Dasyprocta leporina*). **Anais da XXI Seminário de Iniciação Científica da UFERSA**, Mossoró, RN, Brasil, 2015.

COSTA, P.M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 6, p.39-55, 2008.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. Tratado de Anatomia Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

EKDALE E.G. Evolution of the Vertebrate Ear. Springer Handbook of Auditory Research, vol. 59. Springer, Cham, 2016a.

EKDALE, E.G. Form and function of the mammalian inner ear. **Journal of Anatomy**, v. 228, p. 324-337, 2016b.

EMMONS, L.; REID, F. *Dasyprocta leporina*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T89497102A22197762.

FERREGUETTI, A.C.; TOMAS, W.M.; BERGALLO, H.G. Density, habitat use, and daily activity patterns of the red-rumped Agouti (*Dasyprocta leporina*) in the Atlantic Forest, Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 53, p.143-151, 2018.

FORTES, E.A.M.; CARVALHO, M.A.M.; ALMEIDA, M.M.; CONDE JÚNIOR, A.M.; CRUZ, N.E.A.; ASSIS-NETO, A.C. Aspectos morfológicos da tuba uterina de cutias (*Dasyprocta aguti*, Mammalia: Rodentia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, p.130-134, 2005.

GALETTI, M.; BOVENDORP, R.S.; GUEVARA, R. Defaunation of large mammals leads to an increase in seed predation in the Atlantic forests. **Global Ecology and Conservation**, v. 3, p. 824-830, 2015.

GARTNER, L.P. **Tratado de histologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

GILL, M.; SINGH, U.; MAHAPATRA, Q.S.; GEHLOT, S.; GUPTA, V.; SEN, R. Role of argyrophilic nucleolar organizer region staining in identification of malignant cells in effusion. **Journal of Cytology/Indian Academy of Cytologists**, v. 28, p. 191-195, 2011.

GOMES, D.S.; TIRONI, S.M.T.; MARTINEZ, A.C. USO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NA MEDICINA VETERINÁRIA. In: **Anais do II Simpósio em Produção Sustentável e Saúde Animal**, Maringá, PR, Brasil, 2017.

GRABAU, J.H.; DONG, L.; MATTIE, D.R.; JEPSON, G.W.; MCDUGAL, J.N. Comparison of anatomical characteristics of the skin for several laboratory animals. Geo-Centers Inc Newton Centre MA, 1995.

HERNÁNDEZ-MORERA, P.; TRAVIESO-GONZÁLEZ, C.M.; CASTAÑO-GONZÁLEZ, I.; MOMPEÓ-CORREDERA, B.; ORTEGA-SANTANA, F. Segmentation of elastic fibres in

images of vessel wall sections stained with Weigert's resorcin-fuchsin. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 142, p. 43-54, 2017.

HIB, J. Di Fiore Histologia: Texto e Atlas. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

HOSKEN F.M., SILVEIRA A.C. 2001. Criação de Cutias. Coleção Animais Silvestres 4. Aprenda Fácil, Viçosa, MG.

ISOLA, J.G.; MORAES, P.C.; RAHAL, S.C.; MACHADO, M.R. Morfologia, ultraestrutura e morfometria do tegumento da paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) criada em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 674-682, 2013.

JONES, K.R.; LALL, K.R.; GARCIA, G.W. Omnivorous Behaviour of the Agouti (*Dasyprocta leporina*): A Neotropical Rodent with the Potential for Domestication. **Scientifica**, v. 2019, p. 1-5, 2019.

JORGE, M.S.P; PERES, C.A. Population Density and Home Range Size of Red-Rumped Agoutis (*Dasyprocta leporina*) Within and Outside a Natural Brazil Nut Stand in Southeastern Amazonia. **Biotropica**, v. 37, p. 317-321, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto e atlas**. 12 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013.

KHIAO IN, M.; RICHARDSON, K.C.; LOEWA, A.; HEDTRICH, S. KAESSMEYER, S.; PLENDL, J. Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 48, p. 207-217, 2019.

KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. Anatomia dos Animais Domésticos. 4 ed., Porto Alegre: Artmed, 2011.

KÜHNEL, W. **Citologia, Histologia e Anatomia Microscópica: texto e atlas**. 11 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R.; JONES, J.; MARTINEZ-HERNANDEZ, F.J.; MORENO, J.M.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; SORIA, B. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 347-361, 2009.

LICHT, D.S. Bison conservation in northern great plains national parks: no need to panic. **Great Plains Research**, v. 27, p. 83-92, 2017.

LOPES, C.; MALHÃO, F. Curso de Técnicas Histológicas: Projeto Aprender a Conhecer o Ambiente Marinho de Portugal. Porto - Portugal: Biomar Pt, 2016.

LOPES, J.B.; CAVALCANTE,, R.R.; ALMEIDA M.M.; CARVALHO, M.A.M.; MOURA, S.G.; DANTAS FILHO, L.A.; CONCEIÇÃO, W.I.F. Desempenho de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) criadas em cativeiro do nascimento até o desmame em Teresina, Piauí. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p. 2318-2322, 2004.

LUCAS, R.; CALABRIA, K.C.; PALUMBO, M.I. Otites. In: LARSSON, C. E.; LUCAS, R. Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária. São Paulo: Interbook, cap. 54, p. 779-804, 2016.

LUZ, V.; PIRES, C.; MATIAS, M.; AZEVEDO, H. Protocolo para caracterização histológica do ovário de ovinos. Embrapa Tabuleiros Costeiros – Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2017.

MALVASIO, A.; NASCIMENTO-ROCHA, J.M.; SANTOS, H.D.; ATAÍDES, A.G.; PORTELINHA, T.C.G. Morfometria e histologia das gônadas de machos e fêmeas recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, p. 105-112, 2012.

MARTINS, L.L. **Anatomia macroscópica e ultraestrutural da orelha da paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766)**. 2013. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2013.

MARTINS, L.L.; ALMEIDA-SILVA, I.; ROSSATO, M.; MURASHIMA, A.A.B.; HYPPOLITO, M.A.; MACHADO, M.R.F. Descrição macroscópica da orelha externa e média da paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 583-589, 2015.

MEHRABANI, D.; MAHBOOBI, R.; DIANATPOUR, M.; ZARE, S.; TAMADON, A.; HOSSEINI, S.E. Establishment, culture, and characterization of guinea pig fetal fibroblast cell. **Veterinary Medicine International**, v. 20, p. 1-6, 2014.

MENDONÇA I.L.; ALMEIDA M.M.; CONDE JÚNIOR A.M.; CAVALCANTE, R.R.; MOURA, S.G.; CARVALHO, M.A.M. Análise coproparasitológica de cutias (*Dasyprocta* sp.) criadas em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, p. 285-288, 2006.

MOLLINEAU, W.M.; ADOGWA, A.O.; GARCIA, G.W. Spermatozoal morphologies and fructose and citric acid concentrations in agouti (*Dasyprocta leporina*) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 378-383, 2008.

MONDAL, N.K.; ROYCHOUDHURY, S.; RAY, M.R. Higher AgNOR expression in metaplastic and dysplastic airway epithelial cells predicts the risk of developing lung cancer in women chronically exposed to biomass smoke. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 34, p. 35-51, 2015.

MORAIS, G.B.; VIANA, D.A.; SILVA, F.M.O.; XAVIER JÚNIOR, F.A.F.; FARIAS, K.M.; PESSOAS, D.D.O.; SILVEIRA, J.A.M.; ALVES, A.P.N.N.; MOTA, M.R.L.; SILVA, F.D.O.; SAMPAIO, C.M.S.; VERDUGO, J.M.G.; EVANGELISTA, J.S.A.M. Polarization microscopy as a tool for quantitative evaluation of collagen using picrosirius red in different stages of CKD in cats. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, p. 543-550, 2017.

MOREIRA, J.R. Manual de Curadores de Germoplasma – Animal: Conservação de Uso de Animais Silvestres. **Documentos**, 2012.

NASCIMENTO, M.B.; PEREIRA, A.F.; BORGES, A.A.; AQUINO, L.V.C.; PRAXEDES, E.A. Caracterização morfológica de tecidos somáticos derivados de cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). In: **Anais do XXIV Seminário de Iniciação Científica da UFERSA**, Mossoró, RN, Brasil, 2018.

NEIVA, G.S.M. **Histologia**. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014.

NUNES; CINSA. Princípios do processamento histológico de rotina. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 8, p. 31-40, 2016.

OLIVEIRA JÚNIOR, C.M.; BEZERRA, F.V.F.; CÂMARA, F.V.; VALE, A.M.; OLIVEIRA, G.B.; SILVA, A.R.; AMBROSIO, C.E.; OLIVEIRA, M.F. Morfologia das glândulas salivares maiores em cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1766). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 227-236, 2016.

OSHIMA, C.T.F.; FORONES, N.M. AgNOR em câncer gástrico. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, p. 89-93, 2001.

PADILHA, A.F. Microscopia eletrônica de transmissão. Departamento de engenharia metalúrgica e de materiais da EPUSP, 2013.

PAGLIA, A.P.; FONSECA, G.A.B.D.; RYLANDS, A.B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L.M.S.; CHIARELLO, A.G.; LEITE, Y.L.R.; COSTA, L.P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M.C.M.; MENDES, S.L.; TAVARES, V.C.; MITTERMEIER, R.A.; PATTON, J.L. Lista anotada dos mamíferos do Brasil/Annotated checklist of Brazilian mammals. 2. ed. Arlington, Conservation International, 2012.

PEREIRA, A.F.; SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; FEITOSA, A.K.N. Isolamento e caracterização de células doadoras derivadas da pele para a transferência nuclear. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, p. 311-316, 2014.

PIMENTEL, S.P.; TABARELLI, M. Seed dispersal of Palm *Attalea oleifera* in a remnant in the Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 36, p.74-84, 2004.

PIRES, A.S.; GALETTI, M. The agouti *Dasyprocta leporina* (Rodentia: Dasyproctidae) as seed disperser of the palm *Astrocaryum aculeatissimum*. **Mastozoología Neotropical**, v. 19, p. 147-153, 2012.

PRAXEDES, É.A.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; PEREIRA, A.F. Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. **Zoo Biology**, v. 37, p. 258-263, 2018.

PRAXEDES, É.A. **Descrição histológica, cultivo *in vitro* de fibroblastos e criopreservação da pele do pavilhão auricular de onça-pintada, *Panthera onca* (LINNAEUS, 1758)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2019.

PRAXEDES, É.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, M.B.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; SILVA, H.V.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). **Cryobiology**, v. 88, p. 15-22, 2019.

QUEIROZ NETA, L.B.; LIRA, G.P.O.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; SILVA, M.B.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Influence of storage

time and nutrient medium on recovery of fibroblast-like cells from refrigerated collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) skin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 54, p. 486-495, 2018.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Mamíferos do Brasil, 2nd ed. Nelio R. dos Reis, Londrina, 2011.

ROCHA, A.R.; ALVES F.R.; ARGÔLO-NETO, N.M.; SANTOS, L.F.; ALMEIDA, H.M.; CARVALHO, Y.K.P.; BEZERRA, D.O.; FERRAZ, M.S.; PESSOA, G.T.; CARVALHO, M.A.M. Hematopoietic progenitor constituents and adherent cell progenitor morphology isolated from black-rumped agouti (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler 1831) bone marrow. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1376-1382, 2012.

RODRIGUES, R.F.; MIGLINO, M.A.; FERRAZ, R.H.S.; MORAIS-PINTO, L. Placentação em cutias (*Dasyprocta aguti*, CARLETON, M.D.): aspectos morfológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p.133-137, 2003.

RODRIGUES, R.F.; CARTER, A.M.; AMBROSIO, C.E.; SANTOS, T.C.; MIGLINO, M.A. The subplacenta of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* L). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 31, 2006.

ROMANENKO, S.A.; PERELMAN, P.L.; TRIFONOV, V.A.; SERDYUKOVA, N.A.; LI, T.; FU, B.; O'BRIEN, P.C.M.; NG, B.L.; NIE, W.; LIEHR, T.; STANYON, R.; GRAPHODATSKY, A.S.; YANG, F. A first generation comparative chromosome map between Guinea pig (*Cavia porcellus*) and humans. **Plos One**, v. 10, p. 1-15, 2015.

SAMUELSON, Don A. **Tratado de histologia veterinária**. Trad. Newton da Cruz Rocha. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

SCHIPPER, J.; EMMONS, L.; MCCARTHY, T. *Dasyprocta ruatanica*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T6287A22198054.

SILVA, A.R.; SILVA, M.A.; LIMA, G.L. et al. Efeitos de diferentes métodos de descongelamento sobre as características dos espermatozoides epididimários de cutias (*Dasyprocta aguti*). **Anais do V Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal**, Patos, PB, Brasil, 2010.

SILVA, A.R.; SILVA, A.M.; PRAXEDES, E.C.G.; PEREIRA, A.F. Conservação de roedores histicognatos silvestres da América do Sul utilizando estratégias reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, p. 231-236, 2017.

SILVA, D.C.B.; FAGUNDES, N.C.F.; TEIXEIRA, F.B.; PENHA, N.E.A.; SANTANA, L.N.S.; MENDES-OLIVEIRA, A.C.; LIMA, R.R. Características anatômicas e histológicas dos dentes em agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 51-57, 2013.

SILVA, H.V.R.; NUNES, T.G.P.; RIBEIRO, L.R.; FREITAS, L.A.; OLIVEIRA, M.F.; ASSIS NETO, A.C.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. **Animal reproduction science**, v. 203, p. 84-93, 2019.

SILVA, R.S. **Histomorfometria tegumentar de ratas wistar ooforectomizadas**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2015.

SILVEIRA, G.M.; SIQUEIRA, H.F.F.; PEREIRA, G.C.B.; PEREIRA, F.R. Diferenças histológicas entre a pele fina e a pele grossa. In: **Anais do XI Encontro de Iniciação à Docência**, João Pessoa, PB, Brasil, 2009.

SOUZA, C.G.V.; OLINDA, R.G.; AMORIM, R.N.L.; OLIVEIRA, M.F. ALVEZ, N.D.; AMÓRA, S.S.A.; BEZERRA, F.S.B.; FEIJÓ, F.M.C. Caracterização da microbiota auricular de cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 927-930, 2012.

SOUZA, M.T.; FIGHERA, A.R.; KOMMERS, D.G.; BARROS S.L.C. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 177-190, 2009.

TELES, V.; ANDREANI, L.; VALADARES, L. Uso de microscopia de luz e eletrônica como técnicas de análise morfológica. Embrapa Agroenergia – Circular Técnica (INFOTECA-E), 2017.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS-NETO, A.G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2 ed. São Paulo: Manole, 2003

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, p. 127-131, 2000.

VÁZQUEZ, E.; EMMONS, L.; REID, F.; CUARÓN, A.D. *Dasyprocta mexicana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T6285A12596623.

VERMA, R.; HOLLAN, M.K.; TEMPLE-SMITH, P.; VERMA, P.J. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. **Theriogenology**, v. 77, p. 220-228, 2012.

VIEIRA, A.C.S.R. Utilização da técnica do AgNOR em patologia: uma revisão de literatura. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

WANI N.A.; VETTICAL B.S.; HONG, S.B. First cloned Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) calf produced by interspecies somatic cell nuclear transfer: A step towards preserving the critically endangered wild Bactrian camels. **Plos One**, v. 17, p.e0177800, 2017.

WHITE, T.L.; LEWIS, P.; HAYES, S.; FERGUSON, J.; BELL, J.; FARINHA, L.; WHITE, N.S.; PEREIRA, L.V.; MEEK, K. M. The structural role of elastic fibers in the cornea investigated using a mouse model for Marfan syndrome. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 58, p. 2106-2116, 2017.

WITTEKIND, D. Traditional staining for routine diagnostic pathology including the role of tannic acid. 1. Value and limitations of the hematoxylin-eosin stain, **Biotechnic & Histochemistry**, v. 78, p. 261-270, 2003.

WOODS, C.A.; KILPATRICK, C.W. Infraorder Hystricognathi. In: WILSON, D.A.M.; REEDER, D.A. (Ed.) *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*, Baltimore: JHU Press, 1556, 2005.

YANG, J.G.; DENG, Y.; ZHOU, L.X.; LI, X.Y.; SUN, P.R.; SUN, N.X. Overexpression of CDKN1B inhibits fibroblast proliferation in a rabbit model of experimental glaucoma filtration surgery. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 54, p. 343-352, 2013.