

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIDEOLAPAROSCOPIA E  
MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* EM PACAS (*Cuniculus  
paca* – LINNAEUS, 1766) MANTIDAS EM CATIVEIRO E  
SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE SUPERESTIMULAÇÃO  
OVARIANA**

**Felipe Farias Pereira da Câmara Barros**

Médico Veterinário

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIDEOLAPAROSCOPIA E  
MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* EM PACAS (*Cuniculus paca* –  
LINNAEUS, 1766) MANTIDAS EM CATIVEIRO E SUBMETIDAS A  
PROTOCOLOS DE SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA**

**Felipe Farias Pereira da Câmara Barros**

**Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente**

**Coorientadora: Profa. Dra. Marcia Rita Fernandes Machado**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal.

**2016**

B277a Barros, Felipe Farias Pereira da Câmara  
Aspiração folicular por videolaparoscopia e maturação oocitária *in vitro* em pacas (*Cuniculus paca* – Linnaeus, 1766) mantidas em cativeiro e submetidas a protocolos de superestimulação ovariana / Felipe Farias Pereira da Câmara Barros. – – Jaboticabal, 2016  
ix, 51 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

Co-orientadora: Márcia Rita Fernandes Machado

Banca examinadora: Fabiana Azevedo Voorwald, Leandro Zuccolotto Crivellenti, Eliandra Antonia Pires Buttler, Maricy Apparício Ferreira

Bibliografia

1. Aspiração ovariana. 2. Gonadotrofinas. 3. Laparoscopia. 4. Oócito. 5. Roedor I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.622:599.32

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

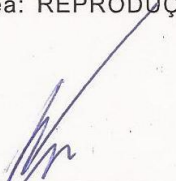
TÍTULO DA TESE: ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIDEOLAPAROSCOPIA E MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* EM PACAS (*Cuniculus paca* - LINNAEUS, 1766) MANTIDAS EM CATIVEIRO E SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA.

**AUTOR: FELIPE FARIAS PEREIRA DA CÂMARA BARROS**

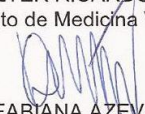
**ORIENTADOR: WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE**

**COORIENTADORA: MARCIA RITA FERNANDES MACHADO**

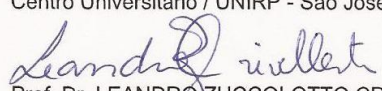
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



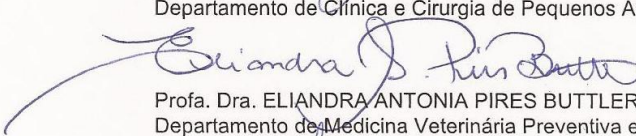
Prof. Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. FABIANA AZEVEDO VOORWALD  
Centro Universitário / UNIRP - São José do Rio Preto/SP



Prof. Dr. LEANDRO ZUCCOLOTTO CRIVELLENTI  
Departamento de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais / Universidade de Franca - Franca/SP



Profa. Dra. ELIANDRA ANTONIA PIRES BUTTLER  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 17 de fevereiro de 2016

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**FELIPE FARIAS PEREIRA DA CÂMARA BARROS** – nascido em Natal, Rio Grande do Norte, aos 14 de abril de 1983, filho de Fernando da Câmara Barros e Rita de Cássia Farias Pereira Barros. É Médico Veterinário formado pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, Rio Grande do Norte, com ingresso em fevereiro de 2005 e término em janeiro de 2010. Em março de 2010 ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP – Campus de Jaboticabal – SP, finalizando-o em fevereiro de 2012. Em março do mesmo ano, ingressou no doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, da mesma instituição, onde ainda atua no Setor de Obstetrícia e Reprodução Animal, sob a orientação do Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Wilter Ricardo Russiano Vicente. De abril de 2014 a março de 2015, foi bolsista do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE, realizado na Louisiana State University – LSU – Baton Rouge – LA – Estados Unidos da América, sob a supervisão do Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Carlos Roberto Fontes Pinto.

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver.”

Amyr Klink

## **Dedico**

Às pesquisas e aos profissionais que tem se preocupado com a preservação das mais variadas espécies animais, na contramão do extermínio global que muitos desses vêm sofrendo, provocado pelo crescimento desenfreado da população humana.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, citarei alguns membros mais adiante, mas tudo que tenho feito foi por causa deles e é para eles. Amo-os incondicionalmente. A vida tem sido muito boa para mim, pois tenho a melhor família do mundo.

Agradeço ao meu pai, que hoje não está mais conosco, mas que viveu em função da sua família. Homem que trabalhou sempre pensando na educação dos seus filhos. Aquela pessoa que soube repreender ou incentivar quando necessário, sempre pensando no futuro dos filhos.

À minha mãe, por ser a melhor do mundo, a minha grande amiga, incentivadora, companheira de todas as horas. Aquela para quem eu ligo nos momentos alegres e tristes, nos momentos de dúvidas, de decisões importantes. Hoje, eu vejo que ela superou a função mãe com a função avó. É aquela avó que qualquer neto gostaria de ter. Então, para essa mulher, vai o meu agradecimento, não somente neste momento, mas por toda a minha vida.

À minha irmã, Andreza, pela parceria, amizade e incentivo. Ao meu cunhado Evilásio, pelas ajudas que muitas vezes precisei principalmente com as caronas de madrugada ao aeroporto rsrs. Mas o que mais agradeço é a união desses dois, pela família que formaram me dando sobrinhos lindos, saudáveis e cheios de vida. Agradeço também pelos cuidados que tem com a nossa mãe, já que por viver distante, acabo não podendo oferecer. Quero acrescentar aqui os meus sobrinhos, inicialmente Heloisa e Heitor, mas ultimamente a sobrinhada que de uma forma incrível vem aumentando. Então gostaria de agradecer aos que já citei e às minhas primas pelos filhos lindos que tiveram e por permitir eu tratá-los como tio, o tio Felipe dessa molecada que tanto amo. Sou muito feliz quando estão todos juntos, apesar da muvuca e estresse que fica a casa. Rsrtrs

Agradeço também, de forma igual, às minhas tias Lucinha, Gisélia e Carmem Lucia. Vocês são muito importantes na minha vida. Muito obrigado por praticamente nos

adotarem, falo por mim, minha irmã e meus primos. Desejo ser pelo menos metade para as crianças do que vocês foram para nós. Muito obrigado por tudo, nem sei se sou tão merecedor de tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

Aos meus avós, agradeço pela família que formaram, pelos pais e tios que tenho ou tive. Agradeço pelos cuidados, carinho, mimos. Hoje só uma de vocês está entre nós, e um de vocês se foi antes que eu o conhecesse, mas sou muito grato pelas pessoas que foram, pelos elogios que escuto sobre a vossa personalidade, agradeço demais pelo tempo que tive de convivência com vocês. Foi muito bom mesmo. Posso dizer que tive os melhores avós do mundo. E hoje ainda tenho uma das melhores.

Aos meus outros tios, que não são menos importantes do que as três acima citadas, agradeço também por todo incentivo, direto ou indireto, que me deram. Preciso agradecer também àquela pessoa com quem não convivo mais diariamente, mas que ainda está ao nosso lado, cuidando da minha mãe e da casa dela. Pessoa de grande coração e que tanto me agrada, Chica. Se prepare para ser roubada da minha mãe em breve rsrs.

Ao meu querido orientado, o Profº Wilter Ricardo Russiano Vicente. Faltam-me muitas vezes palavras para te agradecer por tudo que fazes não só por mim, mas a todos os seus orientados e agregados do setor. O senhor ultrapassa a função de orientador, chegando a ser praticamente um pai, às vezes até mimando um pouco todos nós. Meu querido, muito obrigado por todo o incentivo, amizade, parceria, ajuda, conselhos, ensinamentos, enfim, muito obrigado por tudo durante esses seis anos de convivência. A minha pós-graduação, apesar de ter havido alguns momentos de dificuldades, foi muito prazerosa de ser realizada. E posso te garantir que você tornou isso muito mais fácil.

Quero agradecer logo aqui a um grande amigo, aquele que nunca me negou qualquer ajuda, uma das pessoas que mais me incentivam a continuar nessa caminhada. Pedro Paulo Maia Teixeira, eu poderia dizer que você não sabe, mas eu

sei que você sabe o quão importante fostes e estás sendo para mim ultimamente (pelo menos há uns 6 anos rsrs). Você, meu amigo, além de irmão de república, é um colega de profissão, um parceiro de pesquisa e um grande amigo da vida. Você é aquele amigo que não oferece só uma mão quando estamos precisando, você oferece a sua vida. Meu caro, que sorte a minha ter te conhecido naquele caso da vaca com distocia hein?! Rsrtrs. Muito obrigado por tudo que tens feito por mim. Espero, de coração, que essa nossa parceria dure a vida inteira. Que possamos sempre trocar os conhecimentos, e incentivar mais e mais pessoas a embarcarem nessa correria conosco. Você já é um cara de sucesso, porém ainda virão muito mais conquistas na sua vida, tenho certeza disso.

Agradeço novamente aos meus primeiros orientadores, Profº Carlos Eduardo Bezerra de Moura e Profº Alexandre Rodrigues Silva. Aqueles que me ensinaram como fazer pesquisa e como correr atrás dos nossos objetivos. Devido a esses ensinamentos estou hoje aqui, concluindo o doutorado. Muito obrigado mestres, vocês sempre farão parte da minha história.

À minha co-orientadora, Profª Marcia Rita Fernandes Machado, agradeço por ter permitido o desenvolvimento desse projeto. Por sempre me receber tão solícitamente e com uma alegria impar. Muito obrigado.

Ao meu querido orientador na Louisiana State University, Profº Carlos Roberto Fontes Pinto, eu agradeço pela recepção, por todos os ensinamentos que passou, pelas oportunidades que me deu, por ter me tratado como um “filho mais velho” (como sempre dizia), mas na verdade se tornou um grande amigo. Muito obrigado pelas conversas, camaradagem e cuidado. Muito obrigado pelas inúmeras vezes que saímos após um dia cansativo de trabalho para comer aquela ostra crua, crawfish, dollar burger, sempre associado com aquela cerveja gelada ou às doses de vodka. Só tenho elogios e agradecimentos com relação a essa pessoa. Muito obrigado mesmo. Quero aproveitar essa oportunidade e agradecer ao Profº Carlos Augusto Araújo Valadão, pois foi ele quem fez o primeiro contato com o Profº Carlos Pinto, solicitando a orientação do doutorado sanduiche. Mas agradeço também por

ser, apesar de tão ocupado, uma pessoa extremamente solícita e camarada. Considero-o também um grande amigo. Pessoa de muito bom papo e grande companheiro de farras.

À minha equipe oficial, Ricardo Uscategui, Ricardo Nociti, Renata Mariano, Luciana Padilha, Victor Santos, Leandro Coutinho, Pedro Paulo Teixeira, Marina Brito, Marina Lima, Aline Kawanami, Vívian Almeida e aos demais que indiretamente colaboraram nesse projeto, muito obrigado, sem vocês esse trabalho não teria graça e muito menos teria saído do papel. Vocês foram muito importantes para a realização deste, mas saibam que são também muito importantes na minha vida. Tornaram-se, além de colega de departamento, grandes amigos.

Aos amigos-irmãos da República Antro do HV, agradeço pelo apoio, amizade, irmandade, pelos momentos de descontração e risadas. Vocês não imaginam o quanto são importantes na minha vida. Sei que partirei em breve, mas levarei comigo um pouco de cada um de vocês. São muitos os com quem eu convivi, mas quero citá-los. Muito obrigado, mais uma vez aos que passaram por aqui nesses últimos anos, mas que hoje já tomaram o caminho do sucesso: Pedro Paulo (PP), Marco Augusto (Marquinho Avatar), Marcus Antonio (Psico), Evandro (Cardio Black), Luis Guilherme (LG), Marcio (Coelho), Leonardo (Viçosa), André (Andrezão), Diogo (Didi), Marcos Vinícius (Infia), Felipe Mira (Mariano), Igor (Sufrido), e Alexandre (Lumbriga). E muito obrigado aos com quem hoje convivo e que tornam esse fim de período muito mais legal, Murillo, Fernando (Barruan), Otávio (Tatá), Diego (Tofu), Cleber (Dido), Carlos Belo (Naza), Gilmar (Bartira), Alejandro (Alejo), Tiago (Aladim) e Augusto (Buda). Falando dessa república não posso deixar de agradecer aos animais (sobrinhos) que por aqui passaram: Chiquinho, Carla, Vicky, Scar, Tomás e Hoffman. Aos estagiários que também se hospedaram na “rep”, tornando o ambiente mais agradável ou com motivos para rir. E por fim agradeço a Jussara, nossa “governanta”, pela convivência excelente, pelos almoços e pela organização do nosso lar.

Aos amigos da Fraternidade K-zona Rural, meu eterno agradecimento. Foram os primeiros que me acolheram em “Jabuka”, e pelos quais eu faço questão de manter a amizade. Nessa república foi onde a minha história nessa cidade começou. Muito obrigado pela amizade, pelos momentos de descontração e pela união que temos. Espero ter dinheiro e saúde para poder sempre voltar e participar dos churrascos de ex-moradores dessa fraternidade.

Agradeço aos meus queridos roommates, Satya Prakash e Tiago Lelis. Pessoas com quem convivi diariamente nos EUA, e que dividiram comigo a angustia de morar longe do país de origem, porém dividiram também o prazer que isso trás. Muito obrigado irmãozinhos. Saudade de vocês.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, mais precisamente à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), *Campus* de Jaboticabal, primeiramente pela aceitação nas duas seleções de pós-graduação das quais participei, segundo por ter sido um dos lugares onde eu mais fui feliz na vida. Foi muito bom fazer parte do corpo discente dessa instituição. O crescimento profissional foi gigante e extremamente prazeroso.

Aos amigos que na UNESP conheci: “Galera”, “Popós”, “Antronianos”, “KZRs”, “Amiguinhos...”, “Obstetras”, “Cirurgiões”, enfim, são tantos. Não destacarei o nome de nenhum de vocês para não cometer o erro de esquecer alguém. Eu não tenho palavras para agradecê-los. Como foi bom compartilhar de cada momento com vocês. Sempre com muita alegria e diversão, em festas, em experimentos ou em procedimentos clínico-cirúrgicos, tudo foi muito divertido com vocês. Muito obrigado por existirem na minha vida. Amo demais vocês e quero que essa essência de amizade nunca acabe.

Aos meus amigos da minha terra Natal-RN e da minha UFERSA, gostaria de agradecer pela cumplicidade e tantos anos de amizade. Mesmo com a distância os reencontros são excelentes e com a mesma bagunça de sempre. Muito bom saber

que todos vocês estão bem de vida e cada um seguindo o seu caminho da forma que escolheram. Amo demais vocês também.

Aos amigos de Baton Rouge, pessoas com quem eu convivi durante um ano, muito obrigado por tudo. Não citarei nomes também para não cometer o erro de esquecer alguém, mas quem estava lá sabe o quão importante foi para mim. Estou esperando aquele dia para reunir todos novamente. E quem sabe, em alguma viagem bem legal.

Aos colegas e amigos encontrados na “Vetschool” da LSU, muito obrigado pela oportunidade de estar com vocês, pelo profissionalismo, tratamento, ensinamentos e parceria. Agradeço principalmente a (almost doctor) Kelsey DiMiceli, Dr. Chelsey Leisinger, Jair Ferreira, Anderson da Cunha, Dr. Dale Paccamonti, Dr. Jacques Fuseiler, Dr. Sara Lyle, Dr. Reto Fritsche e Patrícia Queiroz. Agradeço também ao pessoal da Reproductive Biology Center em St. Gabriel, LA, USA, por ceder o espaço para os nossos projetos, pela disponibilidade em ajudar e principalmente à Sonija Thomas pela simpatia, paciência e ajuda oferecida.

À Louisiana State University agradeço por ter me aceito como membro temporário dessa instituição tão rica em cultura, educação e lazer. Incluo nos agradecimentos alguns alunos e funcionários da Vetschool. Não posso deixar de incluir, as igrejas: Católica, Batista e Anglicana, onde fomos tão bem recebidos, com almoços e jantares deliciosos.

Ao Setor de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal da FCAV, onde nele incluo os professores, funcionários, pós-graduandos, residentes e estagiários pela disposição em ajudar, amizade e parceria, pelos momentos de descontração e confraternização. Gostaria de destacar que muitos deles foram importantes, direta ou indiretamente, na concretização desse trabalho. Não citarei nomes também para não ser injusto. Sentirei muito a falta de vocês na minha vida. Que bom que formamos uma equipe de trabalho tão legal. Cada um que passou por aqui e que já

estão nos seus caminhos e os que ainda continuam são muito importantes para mim. Muito obrigado mesmo pela convivência tão agradável.

Agradeço aos membros e suplentes das bancas de defesa e qualificação, pela disposição de ajudar no nosso trabalho, e pela compreensão de qualquer atraso que possa ter havido. Tenham certeza, se vocês estão aqui é por que são importantes para mim. Ainda bem que posso contar com pessoas tão importantes e inteligentes na minha vida.

Ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (HV) da FCAV, pela disponibilidade das suas instalações, onde foi possível a realização desse trabalho. Agradeço aos professores que nele trabalham, aos funcionários, residentes, pós-graduandos e estagiários, por sempre estarem dispostos a ajudar, discutir algum caso, e acreditarem no nosso trabalho. Agradeço também por sempre confiarem a mim a realização de diversos procedimentos clínico-cirúrgicos.

Ao Setor de Animais Selvagens dessa instituição agradeço também, principalmente aos funcionários Toninho e Beterraba, pela disposição em ajudar sempre que precisei.

Aos animais, todo o meu agradecimento, sem eles nada disso seria possível. Agradeço tanto aos que utilizamos nesse trabalho quanto aos de outros projetos. Também agradeço aos que convivemos ou atendemos no dia a dia.

Agradeço às três principais instituições de fomento do país, primeiramente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, que tanto me ajudou durante o decorrer do doutorado. Junto com ela veio a reserva técnica, trazendo também a oportunidade de apresentar o nosso trabalho em alguns dos principais eventos científicos do mundo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão do Auxílio Universal. Por meio deste, conseguimos material suficiente para o desenvolvimento do nosso projeto. Por fim, gostaria de agradecer duplamente à

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), primeiramente pelas bolsas concedidas nos dois primeiros meses de doutorado. Em seguida, por ter sido selecionado a participar do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), em que foi possível a realização do meu intercambio na LSU. Agradeço ainda por todas essas agencias terem sido profissionais e extremamente solícitas todas as vezes em que precisei.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	vii
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ix
1. HIPÓTESES.....	1
2. OBJETIVOS.....	1
2.1. Objetivo Geral.....	1
2.2. Objetivos Específicos.....	1
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	2
Características da espécie.....	2
Criação e Reprodução assistida.....	3
Aspiração folicular e produção <i>in vitro</i> .....	5
Estimulação hormonal para aspiração folicular.....	6
Oócitos: morfologia, qualidade da coleta e maturação.....	7
Referências.....	8
CAPÍTULO 2 – ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR LAPAROSCOPIA EM PACA ( <i>Cuniculus pacas</i> ).....	16
Resumo.....	16
Abstract.....	17
Introdução.....	17
Material e métodos.....	18
Resultados.....	22
Discussão.....	25
Conclusão.....	27

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>27</b>
<b>Referências.....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 3 – Protocolos de estimulação ovariana em <i>Cuniculus paca</i>: avaliação da recuperação oocitária e maturação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>32</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>33</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>33</b>
<b>Material e métodos.....</b>	<b>35</b>
Animais e tratamentos.....	35
Maturação <i>in vitro</i> .....	36
Avaliação e classificação dos estágios de maturação nuclear.....	36
Análise estatística.....	37
<b>Resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>43</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>43</b>
<b>Referências.....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIDEOLAPAROSCOPIA E MATURAÇÃO  
OOCITÁRIA IN VITRO EM PACAS (*Cuniculus paca* – LINNAEUS, 1766)  
MANTIDAS EM CATIVEIRO.**

**RESUMO** – Nos últimos anos, com a escassez de alimentos, o ser humano vem buscando alternativas de possíveis fontes de proteínas para a sua nutrição. A criação de pacas em cativeiro pode ser uma opção viável desde que explorada adequadamente. Fatos como esse favorecem o desenvolvimento de pesquisas científicas relacionadas à biotecnologia da reprodução, onde essas deixam de ser realizadas unicamente devido a uma preocupação com a conservação da espécie, mas também como uma forma de melhorar a sua produção zootécnica. Com a escassez de dados na literatura surgem dúvidas se seria possível obter oócitos viáveis de pacas para maturação *in vitro* (MIV). Dessa forma, objetivou-se com esse estudo estabelecer técnica viável de aspiração folicular em pacas, testando efeitos de protocolos hormonais sobre taxa de recuperação de oócitos e MIV, além de avaliar os procedimentos cirúrgicos e os aspectos reprodutivos. Para isso oito fêmeas adultas foram submetidas a quatro tratamentos cada, para a coleta de oócitos por meio de aspirações foliculares auxiliada por videolaparoscopia, onde em três desses tratamentos, houve estímulos hormonais utilizando eCG e FSH. Oócitos recuperados em cada tratamento foram classificados qualitativamente e em seguida submetidos à MIV. Posteriormente, os mesmos foram avaliados quanto ao estado de maturação nuclear. Após todas as análises, conclui-se que as administrações de gonadotrofinas não foram eficientes para superestimular os grupos tratados ou aumentar a eficiência de recuperação de oócitos, tornando-se necessários mais estudos para isso, principalmente, de novos protocolos, como doses mais elevadas ou a frequência de administração, além da precisão do ciclo reprodutivo nos momentos dos tratamentos.

**Palavras-chave:** aspiração ovariana, gonadotrofinas, laparoscopia, oócito, roedor.

## **LAPAROSCOPIC OVUM PICK-UP AND IN VITRO MATURATION IN SPOTTED PACAS (*Cuniculus Paca* - Linnaeus, 1766) KEPT IN CAPTIVITY.**

**SUMMARY** – In recent years, with food shortages, the being human has been seeking possible alternative sources of protein for nutrition. Breeding of spotted pacas in captivity would be one of those alternatives, if exploited properly. Facts as that favor the development of scientific research related to biotechnology of reproduction, where these are no longer held solely because of a concern for conservation of this species, but also as a way to improve their zootechnical production. Due to lack of data in the literature doubts arise whether it would be possible to obtain viable oocytes from spotted pacas for in vitro maturation. Thus, the aim of this study was to establish viable technique of ovum pick-up in spotted pacas, testing effects of hormonal protocols on recovery rate of oocyte and IVM, and to evaluate the surgical and reproductive aspects. For this eight adult females were subjected to four treatments each, to collect oocytes by laparocoic ovum pick-up, which in three of these treatments were used hormonal stimulation with eCG and FSH. Retrieved oocytes in each treatment were classified qualitatively and then submitted to IVM. Subsequently, they were evaluated for nuclear maturation. After all analyzes, we conclude that the gonadotropin treatments were not efficient to hyperstimulate the treated groups or increased the oocyte recovery efficiency. Thus, further studies are needed, especially for new protocols, such as higher doses or frequency of administration as well as accuracy in the reproductive cycle times of treatments.

**Keywords:** gonadotropin, laparoscopy, oocyte, ovum pick-up, rodent.

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1: Resultados comparativos de diferentes protocolos de estímulo hormonal ovariano em <i>Cuniculus paca</i> submetidos à aspiração folicular por videolaparoscopia.....	38
Tabela 2: Resultados de maturação in vitro de oócitos e taxas (%) de cada estágio de maturação nuclear e oócitos perdidos por tratamento em <i>Cuniculus paca</i> submetidos à aspiração folicular por videolaparoscopia.....	39

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Imagem fotográfica de <i>Cuniculus paca</i> . (Fonte: Revista Globo Rural).....	3
Figura 2: Aspiração folicular por videolaparoscopia em <i>Cuniculus paca</i> . Em (A) e (B) posicionamento do paciente e visão externa da disposição dos portais laparoscópicos no sentido caudo-cranial, com animal em decúbito dorsal, primeiro portal com válvula de insuflação (“x” vermelho), segundo portal com ótica rígida inserida (circulo azul), terceiro portal (asterisco verde). Em (B) com a manobra de lateralização e punção (triangulo roxo). Em (C) visão interna da punção folicular, agulha introduzida no folículo (1), pinça de pressão (2) segurando o corno uterino (3) e ovário (4) – FCAV/UNESP, Jaboticabal, 2013. (Fonte: Arquivo pessoal).....	20
Figura 3: Representação do tempo cirúrgico em cada etapa do procedimento de LOPU. 1ºT – Incisão até inserção do primeiro trocáter; Insf – insuflação; 2ºT – do estabelecimento do pneumoperitônio à entrada do segundo trocáter; 3ºT – da entrada do segundo a inserção do terceiro trocáter; 1ºOv – da entrada do terceiro trocáter ao início de manipulação do primeiro ovário; PO – manipulação do primeiro ovário; SO – manipulação do segundo ovário; DR – da desinsuflação à dermorrafia.....	23
Figura 4: Intercorrências na aspiração folicular por videolaparoscopia em <i>Cuniculus paca</i> . Em (A) e (B) visão interna de aderência (1) de trato reprodutor (3) em rim direito (2) e peritônio, e adesiólise usando pinça Babcock (4). Em (C) visão externa de cistorrafia após perfuração acidental de vesícula urinária (5) – FCAV/UNESP, Jaboticabal, 2013. (Fonte: Arquivo pessoal).....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS

- °C – Grau Celsius;
- Art. – Artigo;
- CCO – Complexo *cumulus oophorus*;
- cm – centímetro;
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono;
- CP – Corpúsculo polar;
- D/ID – Degenerado/Indeterminado;
- DP – Desvio Padrão;
- eCG – Equine Chorionic Gonadotropin (Gonadotrofina Coriônica Equina);
- EP – Erro Padrão;
- FIV – Fertilização *in vitro*;
- FSH – Follicle-Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante);
- g – Grama;
- G – Gauge;
- GC – Grânulos corticais;
- GnRH – Gonadotropin-Releasing Hormone (Hormônio liberador de gonadotrofinas);
- h – hora;
- hCG – Human Chorionic Gonadotropin (Gonadotrofina Coriônica humana);
- hGM – Human Menopausal Gonadotropin (Gonadotrofina da Menopausa Humana);
- IM – Intramuscular;
- Kg – Quilograma;
- L – Litro;
- LH – Hormônio Luteinizante;
- LOPU – Laparoscopic ovum pick-up (Aspiração folicular por videolaparoscopia);
- MI – Metáfase I;
- MII – Metáfase II;
- mg – Miligrama;
- min. – Minuto;
- MIV – Maturação *in vitro*;
- µg – Micrograma;

ml – Mililitro;

mm – milímetro;

mM – milimolar;

mmHG – Milímetro de mercúrio;

MPA – Medicação pré-anestésica;

MOET – Multiple Ovulation and Embryo Transfer (Ovulação múltipla e transferência de embriões);

N – Número;

NaCl – Cloreto de sódio;

O<sub>2</sub> – Oxigênio;

p – Probabilidade;

PBS – Phosphate-buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato);

PIA – Pressão Intrabdominal;

PIV – Produção *in vitro*;

PMSG – Pregnant Mare Serum Gonadotropin (Gonadotrofina Sérica da Égua Gestante);

% – Porcentagem;

UI – Unidade Internacional;

VG – Vesícula germinativa.

## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 027420/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Aspiração folicular por videolaparoscopia e maturação oocitária *in vitro* em pacas (*Cuniculus paca* – Linnaeus, 1766) mantidas em cativeiro**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião extraordinária de 18 de maio de 2012.

Jaboticabal, 21 de maio de 2012.

  
**Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi**  
Coordenador - CEUA

## 1. HIPÓTESES

Podemos ressaltar como hipóteses que é possível coletar oócitos viáveis de pacas para maturação *in vitro* por meio de aspiração folicular por videolaparoscopia, com ou sem estimulação hormonal;

Que a estimulação ovariana permite a observação de maior número de folículos, assim como melhora a taxa de recuperação e de maturação de oócitos;

E ainda, que o estímulo hormonal com duas gonadotrofinas (FSH e eCG) aumenta esses fatores citados em relação ao estímulo hormonal utilizando-as separadamente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Estabelecer uma técnica viável de aspiração folicular em pacas, avaliando os procedimentos cirúrgicos e os aspectos reprodutivos.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a técnica de aspiração folicular por videolaparoscopia na espécie;
- Estabelecer um método de avaliação dos oócitos da espécie;
- Avaliar a quantidade e qualidade dos oócitos obtidos por sessão;
- Analisar as taxas de recuperação de oócitos viáveis para maturação *in vitro*;
- Avaliar técnica de maturação *in vitro* desses oócitos;
- Obter protocolo satisfatório de estimulação ovariana;
- Correlacionar a eficiência dos protocolos de estimulação ovariana em relação à qualidade dos oócitos;
- Analisar se a repetição do procedimento de aspiração folicular influencia a recuperação de oócitos e a maturação *in vitro*.

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

DADOS PUBLICADOS NA REVISTA INVESTIGAÇÃO – ISSN 2177-4080

BARROS, F. F. P. C.; TEIXEIRA, P. P. M.; USCATEGUI, R. A. R.; PADILHA, L. C.; KAWANAMI, A. E.; LIMA, M. R.; ALMEIDA, V. T.; MARIANO, R. S. G.; NOCITI, R. P.; MACHADO, M. R. F.; VICENTE, W. R. R. Aspectos reprodutivos, endocrinológicos e de produção *in vitro* em pacas (*Cuniculus paca* – LINNAEUS, 1766). *Investigação*, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2015.

### **Características da espécie**

Os roedores compreendem a maior classe dos mamíferos. Na América do Sul, são mais numerosos em espécie e indivíduos do que em outros continentes. No Brasil, essa ordem possui espécies, como a paca e a capivara, cuja exploração em cativeiro pode apresentar perspectivas interessantes, em que a potencialidade reprodutiva é um elemento favorável (LANGE & SCHMIDT, 2006).

A paca é o segundo maior roedor neotropical, perdendo em tamanho somente para a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), de acordo com Matamoros (1982). Tem o peso corporal variando 6 a 13 Kg (LANGE & SCHMIDT, 2006), podendo chegar até os 14 Kg (MATAMOROS, 1982) e vive cerca de 10 anos (LANGE & SCHMIDT, 2006) (Figura 1).

Essa espécie habita uma ampla área das Américas, ocorrendo desde o sul do México até o leste do Paraguai e norte da Argentina, englobando grande parte do território brasileiro (EMMONS, 1990; EISENBERG & REDFORD, 1999; QUEIROLO et al., 2008), e uma área marginal do Uruguai (MONES *et al.* 2003), normalmente em altitudes de 2000 a 3000 metros (EMMONS, 1990).

Vivendo em áreas de florestas úmidas, esses animais são encontrados em galerias de matas próximas a rios e em igarapés, onde constroem sua toca. São excelentes nadadoras e costumam entrar na água quando perseguidas por predadores. Apresentam hábito noturno, e apesar de serem monogâmicos, costumam alimentarem-se sozinhos. São animais frugívoros, sendo importantes

disseminadores de sementes, porém também pastejam, retirando alguns tubérculos da terra (EMMONS, 1990; REID, 1997; EISENBERG & REDFORD, 1999).



Figura 1. Imagem fotográfica de *Cuniculus paca*. (Fonte: Revista Globo Rural).

### **Criação e Reprodução assistida**

As fêmeas de pacas reproduzem bem em cativeiro, indicando uma adaptação satisfatória à esse sistema de criação. Essas características representam aspectos positivos ao nível de produção de fauna selvagem. O conhecimento sobre o manejo reprodutivo em cativeiro significa atender a crescente demanda deste sistema alternativo de produção animal existente no setor econômico. A pesquisa com esta espécie consolida uma estrutura acadêmica voltada para o estudo da biologia de animais selvagens, forma recursos humanos, estabelece metodologias e produz conhecimento (GUIMARÃES et al., 2008).

As pacas não são animais ameaçados de extinção, de acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2015), embora não ocorram mais em alguns pontos da sua distribuição devido à destruição de habitats (QUEIROLO et al., 2008). Portanto, diante do desaparecimento ou escassez dessa espécie em algumas localidades, onde servem como fonte de proteína para determinadas populações, surge a preocupação da criação do animal em cativeiro, com o intuito de diminuir a caça predatória e também fornecer essa fonte alternativa

de proteína. A criação comercial da paca busca, além do consumo da carne, ser uma alternativa de conservação da espécie, através do aumento de seu estoque populacional, e, conseqüentemente, diminuir a pressão sobre a caça e o tráfico (LOURENÇO et al., 2008).

A criação legalizada de animais silvestres vem ganhando cada vez mais força no Brasil. Com autorização do IBAMA, já existem criatórios legalizados de diversos espécimes, inclusive da paca, permitida desde 1967, pela lei Nº 5197/67, Art. 6º, lei esta que atribui proteção à fauna (BRASIL, 1997).

Neste contexto, as biotécnicas da reprodução ganham destaque por serem fortes aliadas na melhoria da eficiência reprodutiva e produtividade das criações, assegurando uma viabilidade econômica cada vez mais atraente (TRALDI, 2006). A possibilidade de maturação de oócitos *in vitro* (MIV) somado à criopreservação de embriões seria extremamente importante para a conservação e melhoria da produção de espécies selvagens (HOWARD, 1999).

Com relação às características reprodutivas, vivem em pares monogâmicos com territórios exclusivos do casal (EMMONS, 1990; REID, 1997; EISENBERG & REDFORD, 1999), possuem quatro pares de tetas, adquirem maturidade sexual por volta do sétimo mês de vida, apresentam um tempo de gestação de 115 dias, conforme Lange & Schmidt (2006), porém Guimarães et al., (2008) confirmam um tempo de gestação variando de 142 a 154 dias. Mantém de uma a duas ninhadas por ano. Parem em média um filhote, podendo chegar a dois, estes nascem com aproximadamente 700 g (LANGE & SCHMIDT, 2006; GUIMARÃES et al. 2008; OLIVEIRA et al., 2007). As fêmeas nascem maiores e mais pesadas que os machos (OLIVEIRA et al., 2007)

Os ovários localizam-se próximos ao pólo caudal dos rins (FELICIANO et al., 2014). De acordo com Guimarães et al. (2008), possuem ovulação espontânea, com o ciclo estral variando de 24 a 42 dias e uma média de tempo de estro de  $1,05 \pm 0,22$  dias.

## **Aspiração folicular e produção *in vitro***

A indústria da tecnologia de embriões sofreu uma importante mudança nos últimos anos com o advento da produção *in vitro* de embriões (PIV), classificando o Brasil em um lugar de destaque no ranking mundial (SENEDA, 2005). Essa biotécnica permite a produção de animais transgênicos, de extremo interesse para a medicina humana, bem como estudos de clonagem e da preservação de animais de excelente nível genético, permitindo a estocagem de oócitos para fertilização e produção de animais no futuro (TRALDI, 2006). A PIV de embriões oferece ainda a possibilidade de aceleração do ganho genético por meio da redução do intervalo entre gerações e da maximização do número de nascimentos a partir de fêmeas de alto valor genético, principalmente quando doadoras pré-púberes são utilizadas (BALDASSARE et al., 1996; TERVIT et al., 1996). O rendimento dessas técnicas pode ainda ser potencializado com o uso de protocolos de superovulação e criopreservação (BERLINGUER et al., 2004; COGNIÉ et al., 2004).

A obtenção dos oócitos é etapa fundamental para a realização da biotécnica de PIV em animais domésticos e esses podem ser colhidos *in vitro* de ovários obtidos em abatedouros ou por ovariectomia, ou *in vivo* por aspiração de folículos via transvaginal guiada por ultrassom, laparotomia ou, laparoscopia (ARMSTRONG et al., 1997).

Por outro lado, a aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU) se destaca por ser menos invasiva, proporcionando recuperação mais rápida e podendo ser realizada diversas vezes na mesma fêmea (GRAFF et al., 1999; BALDASSARE et al., 2002; TEIXEIRA, 2011; CORDEIRO, 2014).

A alta eficiência da aspiração folicular associada à PIV está relacionada à sua utilização em conjunto com tratamentos de estimulação ovariana (BASSO et al., 2008), como também com a possibilidade do emprego repetido destas em intervalos curtos de tempo (STANGL et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2011).

Existem poucos dados na literatura sobre o uso dessas biotécnicas em pacas e de tratamento de estimulação ovariana para esta espécie, sendo os trabalhos da nossa equipe (Barros et al., 2013 a, b) pioneiros nesta área. Nestes se descreveu técnica de aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU) utilizando três portais e

testou-se protocolo hormonal utilizando FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) para a recuperação de oócitos viáveis.

### **Estimulação hormonal para aspiração folicular**

O tratamento de superovulação envolve o uso de hormônios objetivando o desenvolvimento folicular e a liberação dos oócitos. Para isso, são usados hormônios como o FSH, a hGM (Gonadotrofina da Menopausa Humana) e a eCG, originalmente chamada PMSG (Gonadotrofina Sérica da Égua Gestante), atuando na indução do desenvolvimento folicular e, o LH (Hormônio Luteinizante) e o hCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) promovendo a indução da ovulação e ruptura do folículo (HAFEZ et al., 2004; MARTÍN-COELLO et al., 2008). Portanto, FSH e eCG possuem atividades biológicas semelhantes, ambos estimulando o crescimento e a maturação do folículo ovariano (HAFEZ et al., 2004).

De acordo com Jainudeen et al. (2004), em fêmeas anéstricas (acíclicas), o crescimento de folículos também pode tanto ser estimulado pelo FSH de origem hipofisária quanto pelo eCG.

Quando se realiza aspiração folicular não se faz necessário o uso de hormônios que induzem a ovulação, já que a ruptura dos folículos não é desejada, sendo os oócitos aspirados dentro dos próprios folículos (MONNIAUX et al., 1984). Então, o GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofinas), apesar de estimular a liberação do FSH, não é indicado por também estimular a liberação do LH (JAINUDEEN et al, 2004).

Uma única injeção de eCG possui efeitos biológicos na glândula-alvo por mais de uma semana. Esse hormônio foi uma das primeiras gonadotrofinas comercialmente disponíveis usadas para indução da superovulação em animais domésticos (HAFEZ et al., 2004). O FSH tem meia-vida biológica mais curta que o eCG. Assim, múltiplas injeções de FSH são necessárias para estimular a mesma quantidade de crescimento folicular que iria resultar de uma única dose de eCG. Mas em suínos já foi visto que, uma única injeção subcutânea de FSH é tão eficaz quanto múltiplas injeções do mesmo hormônio em vacas (JAINUDEEN et al, 2004).

Ao administrar eCG, a incidência de folículos atrésicos reduz, provavelmente isso acontece porque esse hormônio pode impedir que folículos normais tornem-se atrésicos ou faz com que os folículos que chegaram ao estado de atresia voltem ao seu estado normal. Também, altas taxas de oócitos já foram obtidas em camundongos, sendo o eCG indicado para tratamentos de superovulação em várias espécies de roedores (MARTÍN-COELLO et al., 2008).

Com relação aos estímulos ovulatórios repetidos, sabe-se que algumas fêmeas respondem de maneira similar aos primeiros tratamentos, mas que essa resposta é diminuída em tratamentos subsequentes, provavelmente devido a produção de anticorpos contra gonadotrofinas, que são hormônios proteicos. Isso pode ser evitado até certo ponto aumentando-se o intervalo entre tratamentos hormonais (JAINUDEEN et al, 2004).

O momento ideal em camundongos para a administração de gonadotrofinas é no início do ciclo estral, já que favorece a qualidade dos oócitos possíveis de uma futura fertilização *in vitro* (FIV). Por ser a paca um animal roedor, essa técnica pode ser adaptada para a espécie (TARÍN et al., 2002 a, b).

### **Oócitos: morfologia, qualidade da coleta e maturação**

O oócito pode ter o seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pela aparência do complexo *cumulus-ooporus* (CCO) para espécie bovina que é a que apresenta mais estudos nesta área. Nesta espécie, morfologicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar citoplasma homogêneo e completamente envolvido por várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta (GONÇALVES et al., 2002).

A maturação do oócito, envolvendo as transformações nuclear e citoplasmática, está ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário subsequente. *In vivo*, esse processo tem início, coincidentemente, com o pico pré-ovulatório de LH durante o estro e, *in vitro*, com a simples retirada do oócito do folículo (GONÇALVES et al., 2002).

Concomitante com a maturação nuclear, o oócito sofre modificações citoplasmáticas essenciais para fecundação monospérmica e subsequente desenvolvimento embrionário. Ao iniciar o processo de maturação, a transcrição de genes necessários para síntese de proteínas durante a maturação e o início do desenvolvimento embrionário é cessada. Nesse período, ocorrem significantes modificações na síntese proteica que são observadas simultaneamente com a reorganização de organelas citoplasmáticas. Modificações em número, tamanho e/ou posição das organelas citoplasmáticas têm sido descritas em oócitos de mamíferos. Na reestruturação citoplasmática, a maioria das organelas migra para o centro da célula. Por exemplo, mitocôndrias são localizadas periféricamente em oócito imaturo e mais central em oócito maturo, no entanto, os grânulos corticais (GC), associados com um segmento do retículo endoplasmático liso, permanecem próximos a periferia da célula. Após o início da maturação do oócito em alguns mamíferos, ocorre um aumento do número de GCs, sendo significativamente maior em oócitos após o rompimento da vesícula germinativa do que naqueles em estágio de vesícula germinativa (SATHANANTHAN & TROUNSON, 1982; CRAN, 1989; FAIR et al., 1997). Em hamsters e camundongos, a região que cobre os cromossomos meióticos torna-se desprovida de GCs, tornando isso um parâmetro de maturação nessas espécies. Em outras espécies, como bovinos, suínos, felinos e equinos, essas características não são observadas (CARNEIRO, 2002).

As células somáticas que envolvem o oócito também sofrem significativas modificações durante esse processo. As células da granulosa, tanto da mural quanto do *cumulus*, parecem desempenhar importantes funções no crescimento, divisão meiótica e maturação citoplasmática do oócito. As células do *cumulus*, mas não as da mural, tornam-se suspensas em uma matriz de muco durante a maturação, permanecendo separadas em consequência do acúmulo desse muco rico em ácido hialurônico. Hormônios endógenos e fatores produzidos pelo oócito estimulam a síntese de ácido hialurônico pelas células do *cumulus*, induzindo a mucificação ou expansão do *cumulus* durante o período de maturação. A comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito foi demonstrada em CCOs de diversas espécies animais. Essas junções intercomunicantes entre as células somáticas e o oócito

parecem ser importantes para a passagem de nutrientes e componentes químicos reguladores da maturação do oócito (GONÇALVES et al., 2002).

A coleta de oócitos imaturos por LOPU em conjunto com PIV é uma alternativa para MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*). Ambos são usados para aumentar o número de fêmeas capazes de produzir um efeito significativo em programas de reprodução. LOPU combinada com PIV é usado pra tentar minimizar os efeitos deletérios durante o desenvolvimento dos oócitos e dos embriões associado com superovulação num programa de MOET (KAFI & MCGOWAN, 1997) e pode ser um processo mais eficiente que MOET. Um dos principais determinantes no número de embriões e crias produzidos é o número de oócitos coletados. A eficiência da tecnologia LOPU-PIV poderia ser melhorada se o número de oócitos coletados fosse maior, sem prejudicar a competência de seu desenvolvimento (MORTON et al, 2008).

#### **Referências (Formatadas de acordo com as normas da Revista Investigação)**

ARMSTRONG, D. T.; KOTARAS, P. J.; EARL, C. R. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 3, p. 333-339, 1997.

BALDASSARE, H.; FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G.; PESSI, H. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, v. 45, p. 707-717, 1996.

BALDASSARE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C. L.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 275-284, 2002.

BARROS, F. F. P. C.; USCATEGUI, R. A. R.; COUTINHO, L. N.; KAWANAMI, A. E.; BRITO, M. B. S.; CRIVELARO, R. M.; LIMA, T. B.; TEIXEIRA, P. P. M.; MACHADO, M. R. F.; VICENTE, W. R. R. Videolaparoscopy ovum pick-up in *Agouti paca*: technique practice description. In: World Veterinary Congress, 31, 2013, Prague. Proceedings and Abstracts of 31st World Veterinary Congress, Prague: World Veterinary Association, 2013a. p.13.

BARROS, F.; USCATEGUI, R.; KAWANAMI, A.; COUTINHO, L. XAVIER, V.; LIMA, M.; PADILHA, L.; TAVARES, V.; OLIVEIRA, M.; MACHADO, M.; VICENTE, W. Laparoscopic ovum pick-up in *Agouti paca*: a preliminary report In: 17th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), 2013, Bologna - Italy. Reproduction in Domestic Animals. Wiley-Blackwell, 2013b. v. 48. p. 100.

BASSO, A. C.; MARTINS, J. F. P.; FERREIRA, C. R.; ERENO, A; TANNURA, J.; TABET, A.; FIGUEIREDO, C. L.; DE OLIVEIRA, P. C.; PONTES, J. H. F. Biotecnologia da Reprodução na Espécie Ovina: Produção *in vitro* de Embriões Ovinos: Aspectos da Técnica de Aspiração Folicular e do Tratamento Hormonal de Doadoras. **O Embrião**, v. 38, n. 10, p. 8-11, 2008.

BERLINGUER, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; CHANDOLIA, R. K.; HONAMOOZ, A.; RAWLINGS, N. C. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables through out the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 61, p. 1477-1486, 2004.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria nº 117 de 15 de outubro de 1997. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de outubro de 1997, Seção 01, p. 23489-23490.

CARNEIRO, G. F; LIU, I. K. M; HYDE, D.; ANDERSON, G. B.; LORENZO, P. L.; BALL, B. A. Quantification and Distribution of Equine Oocyte Cortical Granules

During Meiotic Maturation and After Activation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 451–458, 2002.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y. State of the art production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 437-445, 2004.

CORDEIRO, M. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; OLIVEIRA, M. E. F.; DI FILIPPO, P. A.; DIAS, D. P. M.; BARETTA, C. A. G.; DÓRIA, R. G. S.; FELICIANO, M. A. R. Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated follicular aspiration. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 137-144, 2014.

CRAN, D. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 49-62, 1989.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics**. Chicago: The University of Chicago Press, 1999. v. 3, p. 462-463.

EMMONS, L. H. **Neotropical rainforest mammals: a Field guide**. Chicago: The University of Chicago Press, 1990. p. 204-205.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Ultrastructure in Bovine Primordial to Early Tertiary Follicles. **Anatomy and Embriology**, v. 195, n. 4, p. 327-336, 1997.

GONÇALVES, P. B. D.; VIZINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002, cap. p. 195-226.

GRAFF, K. J.; MEINTJES, M.; DYER, V. W.; PAUL, J. B.; DENNISTON, R. S.; ZIOMEK, C. A.; GODKE R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval 50 following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1099-1119, 1999.

GUIMARÃES, D. A. A.; BASTOS, L. V.; FERREIRA, A. C. S.; LUZ-RAMOS, L. S.; OHASHI, O. M.; RIBEIRO, H. L. Características reprodutivas da paca fêmea (*Agouti paca*) criada em cativeiro. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 531-538, 2008.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução. In: HAFEZ, B; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manolo, 2004. cap. 3, p. 33-54.

HOWARD, J. G. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnívores. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 1999, p. 449-457.

IUCN 2015. **IUCN Red List of Threatened Species**. Versão 2015.2. < <http://www.iucnredlist.org/details/699/0> >. Acessado em 23 jun 2015.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: HAFEZ, B; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manolo, 2004. cap. 29, p. 409-434.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 137-157,1997.

LANGE, R. R.; SCHMIDT, E. M. S. Rodentia – Roedores Silvestres (Capivara, Cutia, Paca, Ouriço). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens** – Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, 2006. cap. 29, p. 475-491.

LOURENÇO, R. F. S.; DIAS, R. S.; GOMES, A. P. A criação de paca (*Agouti paca*) como alternativa de diversificação de produção e renda em Minas Gerais. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco-Acre, 2008. 15 p.

MATAMOROS, Y. **Notas sobre la biología del tepezcuinte, cuniculus paca, brisson, (Rodentia: Dasyproctidae) en cautiverio.** Brenesia, San Jose, 1982. n. 19/20, p. 71-82.

MARTÍN-COELLO, J.; GONZÁLEZ, R.; CRESPO, C.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). **Theriogenology**, v. 70, n. 6, p. 1004-1013, 2008.

MONES, A.; GONZALES, J.; PRADERI, R.; CLARA, M. Diversidad de la Biota Uruguaya: Mammalia. **Anales: Museo Nacional de Historia Natural Y Antropología**, v. 10, n. 4, p. 1-28, 2003.

MONNIAUX, D.; MARIANA, J. C.; GIBSON, W. R. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 243-253, 1984.

MORTON, K. M.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Effect of Aspiration Pressure during Oocyte Harvesting on Oocyte Recovery and in vitro Development of Ovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p.106-110, 2008.

OLIVEIRA, F. S.; MACHADO, M. R. F.; CANOLA, J. C.; CAMARGO, M. H. B. Biometry of paca newborns bred in captivity (*Agouti paca*, linnaeus, 1766). **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 871-873, 2007.

QUEIROLO, D.; VIEIRA, E.; EMMONS, L; SAMUDIO, R. *Cuniculus paca*, 2008 In: 2008 IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2015.2. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/details/699/0>>. Acessado em 23 jun 2015.

REID, F. A. **A Field Guide to the Mammals of Central and Southeast Mexico**. New York: Oxford University Press, 1997. p. 244-245.

SAINSBURY, A. W. Rodentia (Rodents). In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2003. chap. 43, p. 420-442.

SATHANANTHAN, A.; TROUNSON, A. Ultrastructural observations on cortical granules in human follicular oocytes cultured in vitro. **Gamete Research**, v. 5, p. 191-198, 1982.

SENEDA, M. M. Aspiração bem feita. **Revista Cultivar Bovinos**, n. 17, 2005.

STANGL, M.; KTIHHOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. **Theriogenology**, v. 52, p. 709-716, 1999.

TARÍN, J. J.; PÉREZ-ALBALÁ, S.; CANO, A. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects the quality of ovulated oocytes in the mouse. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 3, p. 398-405, 2002a.

TARÍN, J. J.; PÉREZ-ALBALÁ, S.; GÓMEZ-PIQUER, V.; HERMENEGILDO, C.; CANO, A. Stage of the Estrous Cycle at the Time of Pregnant Mare's Serum Gonadotropin Injection Affects Pre-Implantation Embryo Development In Vitro in the Mouse. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 302-319, 2002b.

TEIXEIRA, P. P. M.; PADILLHA, L. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; MOTHEO, T. F.; DA SILVA, A. S. L.; BARROS, F. F. P. C.; COUTINHO, L. N.; FLÔRES, F. N.; LOPES, M. C. S.; BANDARRA, M. B.; SILVA, M. A. M.; VASCONCELOS, R. O.; RODRIGUES, L. F. S.; VICENTE, W. R. R. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 169– 175, 2011.

TERVIT, H. R. Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 227-238, 1996.

TRALDI, A. S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: Feinco – Feira Internacional de Caprinos e Ovinos/Palestra, 3., 2006, Pirassununga. **Anais...**

## **CAPÍTULO 2 – Aspiração folicular por laparoscopia em paca (*Cuniculus paca*)**

ARTIGO TRADUZIDO EM INGLÊS ENVIADO À REVISTA ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – ISSN 1678-4162

**Resumo** – Objetiva-se com esse trabalho, estudar a técnica de aspiração folicular por videolaparoscopia em pacas, descrevendo detalhes do procedimento cirúrgico, complicações e taxa de recuperação oocitária. Para isso, foram utilizadas nove fêmeas, saudáveis, adultas, não gestantes e mantidas em cativeiro, totalizando 39 procedimentos. Depois de estabelecida a manutenção anestésica, as fêmeas foram posicionadas em Trendelenburg com 20° de angulação. Três trocâteres foram colocados nas regiões inguinais direita e esquerda e hipogástrica. Abdômen foi insuflado com CO<sub>2</sub> e a pressão intra-abdominal foi mantida em 10 mmHg. Punções foliculares foram realizadas manipulando os ovários com pinças atraumáticas. Para aspirações foliculares, usou-se agulha de 18G com bisel curto acoplado ao sistema de vácuo com pressão não excedendo 65 mmHg. Oócitos foram recuperados em tubos de centrifugação de 50 ml contendo meio composto de PBS suplementado com 10 UI/ml de heparina e mantidos a 36°C. Usou-se software R para análise estatística. As normalidades dos dados foram analisadas pelo teste de Shapiro e a homogeneidade de variância pelo de Bartlett. Os tempos foram avaliados pelo teste de variância, e Tukey (P<0,05) para comparar cada momento cirúrgico. Usou-se estatística descritiva para os dados apresentados (média ± DP). Das 39 videolaparoscopias, só foi possível realizar aspiração folicular (LOPU) em 30 deles (76,92%). O tempo cirúrgico total das LOPU foi 37,34 ± 18,53 minutos. Os números totais de folículos visualizados, folículos aspirados e oócitos recuperados foram: 502, 415 e 155, respectivamente. E os mesmos parâmetros por animal foram: 14,34 ± 12,23, 11,86 ± 10,03 e 4,43 ± 4,69, respectivamente. A taxa de recuperação foi de 32,56 ± 27,32%. Assim, conclui-se que o posicionamento caudal de portais, com ligeira triangulação permite uma boa visualização da cavidade abdominal e facilita a manipulação dos ovários. Sendo essa técnica de LOPU viável em pacas e de fácil execução.

**Palavras-chaves:** foliculocentese, videolaparoscopia, oócito, roedor, animais selvagens.

**Abstract** – The aim of this work is to study the technique of laparoscopic ovum pick-up in spotted paca, describing surgery details, complications and oocyte recovery rate. Nine healthy adult non-pregnant captive females were used, in a total of 39 procedures. After anaesthetic maintenance establishment, the females were 20° Trendelenburg positioned. Three 6-mm trocars were placed on right and left inguinal and hypogastric regions. Abdomen was inflated with CO<sub>2</sub> and the intra-abdominal pressure was established in 10-mmHg. Follicular punctures were performed moving the ovaries with some atraumatic forceps. For punctures, an 18-gauge 3.5 inch long needle attached to a vacuum system with pressure not exceeding 65 mmHg was used. Oocytes were recovered into 50-mL centrifuge tubes with media composed of PBS supplemented with 10 IU/mL of heparin and kept at 36°C. All analyses were performed using the R environment for statistical computing. The normality of the data was analyzed by Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variance by Bartlett's test. The times were evaluated by analysis of variance and Tukey ( $P < 0.05$ ) to compare each surgical time. It used descriptive statistics for the presented data (mean  $\pm$  SD). It was only possible to perform LOPU in 30 of 39 laparoscopies (76.92%). The surgical total time was  $37.34 \pm 18.53$  minutes. The total number of visualized follicles, aspirated follicles and retrieved oocytes were: 502, 415 and 155, respectively. And the same parameters per animal were:  $14.34 \pm 12.23$ ,  $11.86 \pm 10.03$  and  $4.43 \pm 4.69$  respectively. Oocyte recovery rate was  $32.56 \pm 27.32\%$ . In conclusion, caudal positioning of portals with slight triangulation allows good viewing of the abdominal cavity and eases the manipulation of the ovaries. Thus this described LOPU technique is feasible in spotted paca and easy to perform.

**Keywords:** Folliculocentesis, laparoscopy, oocyte, rodent, wild animals.

## Introdução

A paca é o segundo maior roedor neotropical (Matamoros 1982). De acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza, esta espécie não está

em perigo de extinção (IUCN 2015), mas o número de espécimes tem diminuído por causa de caça predatória e destruição de habitat (Queirolo et al. 2008). São animais fáceis de reproduzir em cativeiro (Hosken e Silveira 2001; Guimarães et al. 2008), dessa forma, a reprodução comercial aparece como alternativa de conservação da espécie, aumentando seu estoque populacional e promovendo redução de caça e tráfico, além de preencher a crescente demanda por carnes exóticas nos grandes centros urbanos (Lourenço et al. 2008).

Esta crescente demanda favorece o desenvolvimento de pesquisas científicas que envolvem biotecnologia da reprodução, adaptando técnicas desenvolvidas para animais domésticos, na conservação de espécies selvagens ameaçadas ou para melhorar a produção zootécnica daquelas mantidas em criatórios comerciais (Pizzi et al. 2013).

A aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU) utilizada para produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma das biotécnicas líderes na reprodução assistida. Destaca-se por ser menos invasiva, por proporcionar aos animais recuperação mais rápida, e pela possibilidade de ser realizada várias vezes na mesma fêmea, como já descrito em algumas espécies domésticas (Teixeira et al. 2011; Cordeiro et al. 2014; Padilha et al. 2014; Teixeira et al. 2015).

Devido à ausência de descrição desta técnica em *Cuniculus paca*, objetiva-se com esse estudo descrever a LOPU para essa espécie, informando detalhes operatórios, complicações e as taxas de recuperação de oócitos.

## **Material e métodos**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob protocolo nº 027420-11, seguindo os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (CEBEA).

Nove fêmeas adultas (n=9), acima de sete meses de idade, pesando em média 9Kg, não gestantes e saudáveis foram utilizadas nesse experimento. Todas oriundas do Setor de Animais Silvestres do Departamento de Zootecnia da

FCAV/UNESP (Registro no IBAMA – 482508). Os animais foram submetidos a diferentes quantidades de procedimentos laparoscópicos, que se somaram 39 no total.

Para realização das LOPU, os animais receberam como medicação pré-anestésica (MPA), 25 mg/kg de Cloridrato de Ketamina (Ketalar<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil) e 0,5 mg/kg de Midazolam (Dormonid<sup>®</sup>, Roche, Brasil), ambos por via intramuscular (IM). Posteriormente, todos foram induzidos e mantidos com Isoflurano (Forane<sup>®</sup>, Abbott, Brasil) fornecido no sistema aberto por meio de máscara facial, diluído em O<sub>2</sub> 100%.

Quando em adequado plano anestésico, a área cirúrgica, no abdômen, foi tricotomizada e fez-se antissepsia de rotina com gluconato de clorexidina a 2%. Todos os procedimentos foram realizados a por equipe proficiente em videocirurgia aplicada a reprodução, no entanto nunca tendo realizado esta técnica nesta espécie.

Após isso, as pacientes foram posicionadas em Trendelenburg de 20°. Nos locais das incisões fez-se botão anestésico com 1 ml de Lidocaína 2% (Lidovet<sup>®</sup>, Bravet, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em seguida, com bisturi, foram feitas três incisões de pele, para estabelecimento dos três portais laparoscópicos de 5 mm de diâmetro e 11 cm de comprimento.

Inicialmente, nos três primeiros procedimentos, foi estudado o melhor posicionamento dos portais. O primeiro trocáter contendo válvula de insuflação foi introduzido pela técnica aberta, na região inguinal direita. Após a inserção, o obturador foi removido, permanecendo no local somente a bainha, que por sua válvula de insuflação, acoplava-se uma mangueira de silicone, oriunda do aparelho insuflador. O abdômen foi, então, insuflado com dióxido de carbono medicinal (CO<sub>2</sub>), sob pressão intrabdominal (PIA) de 10 mmHg e velocidade de insuflação de 2 L/min.

Quando estabelecido o pneumoperitônio, introduzia-se o laparoscópio, conectado a uma câmera e a um cabo de fibra ótica, que fornecia luz para o interior da cavidade, e a imagem visualizada no monitor. Ato contínuo, fazia-se a introdução videoassistida dos demais trocáteres. O segundo foi inserido na região hipogástrica na linha média ventral, levemente caudal ao primeiro portal, e o terceiro trocáter introduzido na região inguinal esquerda, ao mesmo nível do primeiro, assim mantendo uma leve triangulação (Figura 1A).

Após o estabelecimento dos portais videocirúrgicos, a ótica foi transferida para o segundo portal e pelos demais, foram introduzidas pinças de preensão atraumáticas de 5 mm de diâmetro e 20 cm de comprimento (Babcock, Bbio Supply, Esteio, RS, Brasil).

Fez-se uma laparoscopia exploratória da região cranial abdominal, e com as pinças, o útero foi manipulado em busca dos ovários, sendo facilitada a localização destes pela manobra de lateralização parcial. Em decúbito lateral direito para a manipulação do ovário esquerdo e em decúbito lateral esquerdo, para a manipulação do direito (Figura 1B).

No momento da preensão de cada ovário foi possível fazer a contagem do número de folículos. Cada ovário foi apreendido por somente uma das pinças, e trazido para perto da parede abdominal. Com a pinça, foi possível movimentar os ovários, o que facilitava as punções foliculares. Para uma melhor sucção, as agulhas eram giradas ou movimentadas, cuidadosamente, quando dentro dos folículos (Figura 1C).



Figura 2. Aspiração folicular por videolaparoscopia em *Cuniculus paca*. Em (A) e (B) posicionamento do paciente e visão externa da disposição dos portais laparoscópicos no sentido caudo-cranial, com animal em decúbito dorsal, primeiro portal com válvula de insuflação (“x” vermelho), segundo portal com ótica rígida inserida (circulo azul), terceiro portal com pinça Babcock (asterisco verde). Em (B) com a manobra de lateralização e punção (triangulo roxo). Em (C) visão interna da punção folicular, agulha introduzida no folículo (1), pinça de pressão (2) segurando o corno uterino (3) e ovário (4) – FCAV/UNESP, Jaboticabal, 2013. (Fonte: Arquivo pessoal).

O sistema de aspiração utilizado, de lúmen simples (mesmo diâmetro interno), foi composto de uma agulha de 18G com bisel curto, conectada a uma cânula de teflon de 50 cm de comprimento, presa a uma rolha de silicone (Handle Cook<sup>®</sup>,

Ribeirão Preto, SP, Brasil), a qual era acoplada ao tubo de colheita (50 ml). O vácuo foi produzido por uma bomba de vácuo (BV 003d<sup>®</sup>, WTA, Cravinhos, SP, Brasil) unida à mangueira de silicone também ligada ao tubo de colheita. A pressão do vácuo era regulada em 65 mmHg.

Previamente à punção dos folículos, realizava-se lavagem do sistema com meio de colheita, deixando ao final deste procedimento, aproximadamente 2 ml do meio para receber os oócitos. Ao término das aspirações, os ovários foram lavados com lidocaína 2% (7 mg/kg) diluída em 20 ml de solução salina NaCl 0,9%, removendo coágulos formados na superfície, com a finalidade de minimizar a formação de aderências. Em seguida, removiam-se as pinças, o CO<sub>2</sub> intrabdominal e as bainhas laparoscópicas. Então, somente dermorráfias, com pontos tipo Wolf e fios de sutura poliglicaprone 25 (Caprofyl<sup>®</sup> 2-0, Ethicon Inc, EUA) foram aplicadas. O tempo total do procedimento cirúrgico, da primeira incisão até a dermorráfia, foi contabilizado em minutos.

Ato contínuo procedeu-se a limpeza da ferida cirúrgica com gluconato de clorexidine 2% e aplicou-se pomada repelente/cicatrizante (Unguento Pearson<sup>®</sup>, Eurofarma, Brasil) ao redor da cada sutura.

Ao serem retiradas da mesa cirúrgica, as fêmeas foram colocadas em caixas de transporte limpas, onde ficavam em observação até o retorno da anestesia e aquisição de posição quadrupedal. Após isso, todas voltavam para seus recintos.

No pós-cirúrgico, os animais receberam 0,3 mg/Kg de Meloxicam (Maxicam<sup>®</sup>, Ourofino, Brasil) IM a cada 24 horas, durante 3 dias e combinação de penicilina (G potássica, procaína e benzatina 15000 UI/kg) com estreptomicina (10mg/kg) (Penfort PPU<sup>®</sup>, Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil) em dose única.

Os oócitos foram recuperados em meio de coleta, composto por tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline - PBS), suplementado com 10 UI/mL de heparina, aquecido em banho-maria a 36°C e contabilizados em laboratório.

A análise estatística foi realizada com a ajuda do software R<sup>®</sup> (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013). As normalidades dos dados foram inicialmente analisadas pelo teste de Shapiro e a homogeneidade de variância pelo de Bartlett. Os tempos, número de folículos e complicações são apresentados como média ± DP, assim como as taxas globais.

## Resultados

O protocolo anestésico utilizado foi seguro e eficiente, mantendo os animais em adequado plano anestésicos, relaxamento muscular e analgesia. Todas as fêmeas apresentaram excelente recuperação anestésica e rápida cicatrização de feridas cirúrgicas.

Das 39 videolaparoscopias, só foi possível realizar LOPU em 30 delas (76,92%), devido à falha do equipamento em um procedimento, a perfuração vesical em outro e a aderência nos demais. O tempo cirúrgico total das LOPU foi  $37,34 \pm 18,53$  minutos. Os tempos em minutos de cada fase das videolaparoscopias foram: da incisão até inserção do primeiro trocáter (1ºT)  $2,44 \pm 1,39$ ; da insuflação (Insf)  $2,55 \pm 3,57$ ; do estabelecimento do pneumoperitônio à entrada do segundo trocáter (2ºT)  $2,60 \pm 1,57$ ; da entrada do segundo a inserção do terceiro trocáter (3ºT)  $1,24 \pm 0,67$ ; da entrada do terceiro trocáter ao início de manipulação do primeiro ovário (1ºOv)  $4,21 \pm 2,65$ ; manipulação do primeiro ovário (PO)  $15,35 \pm 7,40$ ; manipulação do segundo ovário (SO)  $13,33 \pm 8,29$ ; da desinsuflação à dermorráfia (DR)  $5,71 \pm 2,75$ .

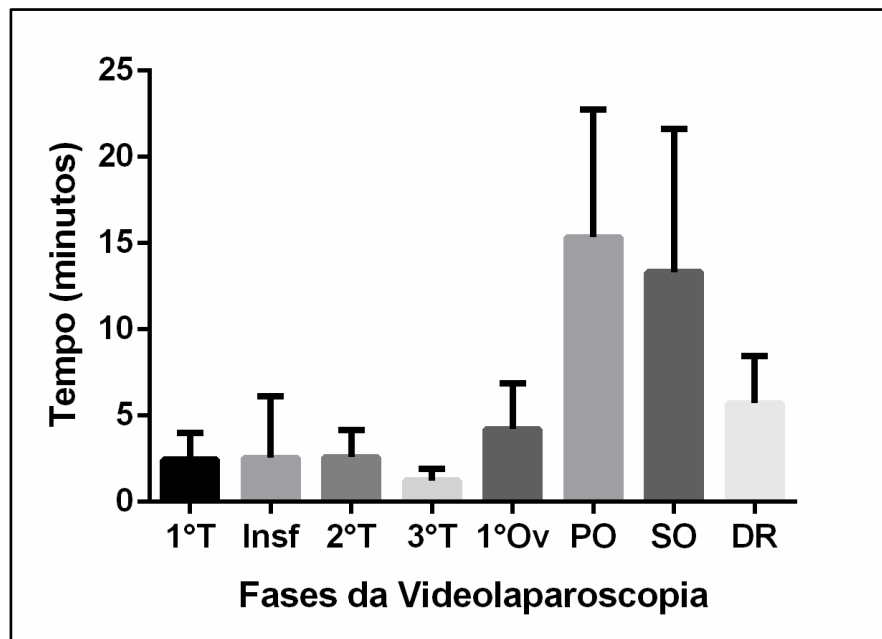


Figura 3. Representação do tempo cirúrgico em cada etapa do procedimento de LOPU. 1ºT – Incisão até inserção do primeiro trocáter; Insf – insuflação; 2ºT – do estabelecimento do pneumoperitônio à entrada do segundo trocáter; 3ºT – da entrada do segundo a inserção do terceiro trocáter; 1ºOv – da entrada do terceiro trocáter ao início de manipulação do primeiro ovário; PO – manipulação do primeiro ovário; SO – manipulação do segundo ovário; DR – da desinsuflação à dermorráfia.

Os números totais de folículos visualizados, folículos aspirados e oócitos recuperados foram: 502, 415 e 155, respectivamente. E os mesmos parâmetros por animal foram:  $14,34 \pm 12,23$ ,  $11,86 \pm 10,03$  e  $4,43 \pm 4,69$ , respectivamente.

Previamente às LOPUs, os animais não foram submetidos ao jejum, mesmo assim não houveram intercorrências relacionadas ao trato gastrointestinal. A PIA de 10 mmHg com velocidade de insuflação de 2 L/min, em conjunto com o posicionamento dos portais laparoscópicos foram eficientes e promoveram excelente visualização da cavidade abdominal, que era transmitida ao monitor com aumento de 10x.

Nos três primeiros procedimentos, os trocâteres foram introduzidos na região abdominal cranial (hipocondricas direita e esquerda e epigástrica), mas verificou-se que foi mais exequível posicionamento dos portais com a leve triangulação voltando os instrumentais no sentido caudal, somado a manobra de parcial lateralização dos

membros torácicos, conforme já descrito, facilitando a visualização e manipulação dos ovários.

O sistema de aspiração e a pressão demonstraram serem eficientes para a recuperação de oócitos viáveis em pacas, obtendo taxa de recuperação oocitária de  $32,56 \pm 27,32\%$ . No entanto em um dos procedimentos não se pode fazer a aspiração folicular por mau funcionamento da bomba de aspiração, mas que foi solucionado para os demais procedimentos.

Em alguns procedimentos foram observados pequenas hemorragias no momento das punções. Observaram-se aderências de ovários e tecidos adjacentes ao peritônio e parede abdominal em cinco dos nove animais (55,56%), mas somente quatro procedimentos do total de 39 (10,26%) ficou impossibilitada a recuperação oocitária devido a esta intercorrência (Figura 2A). Sendo que um paciente dos nove animais (11,11%) foi submetido a seis procedimentos, sem nenhuma aderência e três dos nove animais (33,33%) submetidos a quatro, também sem esta intercorrência. As aderências foram observadas nas repetições.

Em relação a outras intercorrências, em um dos procedimentos houve hemorragia na tentativa da adesiólise, que impossibilitou a recuperação oocitária, mas sem necessidade de conversão ou técnica mais invasiva de hemostasia, somente necessitando de lavagens e aspiração, realizada de forma videocirúrgica (Figura 2B). Também em um dos procedimentos houve perfuração da vesícula urinária na entrada do primeiro portal, havendo necessidade de conversão para lavagem peritoneal e cistorrafia (Figura 2C). No entanto, um mês após o incidente, o animal já estava recuperado da lesão, retornando ao grupo experimental. Essa fêmea foi utilizada em mais três procedimentos, sem apresentar qualquer alteração no trato reprodutivo ou formação de aderências. Após essa intercorrência, realizaram-se cateterismos vesicais em todas as fêmeas, assim que elas entravam em plano anestésico, momentos antes da introdução do primeiro trocáter.

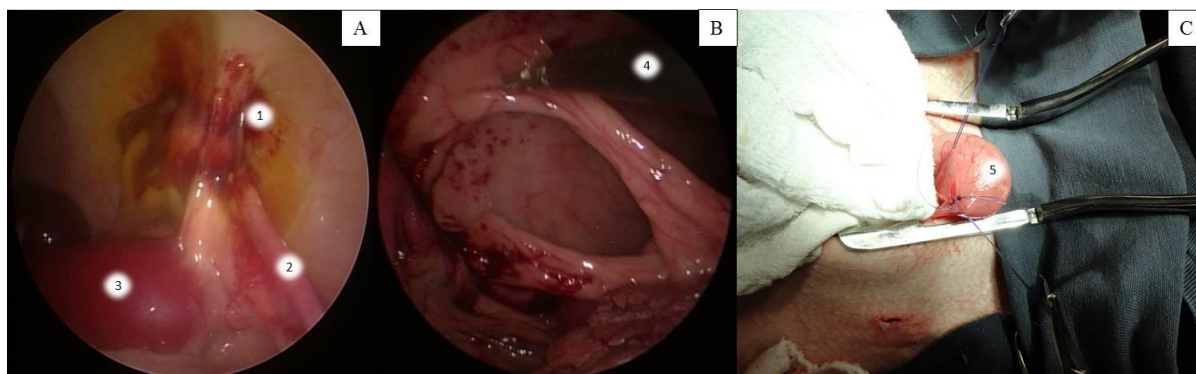


Figura 4. Intercorrências na aspiração folicular por videolaparoscopia em *Cuniculus paca*. Em (A) e (B) visão interna de aderência (1) de trato reprodutor (3) em rim direito (2) e peritônio, e adesiólise usando pinça Babcock (4). Em (C) visão externa de cistorrafia após perfuração acidental de vesícula urinária (5) – FCAV/UNESP, Jaboticabal, 2013. (Fonte: Arquivo pessoal).

## Discussão

O protocolo anestésico utilizado neste estudo mostrou-se tão seguro e eficaz quanto a um similar anteriormente descrito nesta espécie (Vilani et al. 2004).

Paca possui ovários e útero, anatomicamente, posicionados semelhantes aos cães (Feliciano et al. 2014), dessa forma, o posicionamento dos portais foi semelhante à técnica de três portais laparoscópicos utilizada para ovariohisterectomia em cadelas (Brun et al., 2000), tornando fácil a visualização e manipulação dos ovários.

A não realização de jejum, antes de procedimentos cirúrgicos, é uma prática utilizada em roedores, já que esses animais não regurgitam. Além disso, eles têm altas taxas metabólicas e o jejum poderia, rapidamente, esgotar reservas energéticas (Bernal et al. 2009).

O tempo cirúrgico foi semelhante ao alcançado por Teixeira et al. (2011) em trabalho com ovinos ( $26,75 \pm 9,6$  minutos), e por Cordeiro et al. (2014) em cabras (35 minutos). Tempos de manipulação e punções ovarianas provaram ser as etapas mais complexas do procedimento de LOPU, possivelmente devido ao número e tamanho dos folículos, esses resultados corroboram os encontrados por Teixeira et al. (2015). Além disso, a lateralização dos animais para ambos os lados facilitou o acesso e manipulação dos dois ovários, como mostrado por Silva et al. (2015).

Vários autores relataram taxas de recuperação de oócitos variando de 16 a 98%, em pequenos ruminantes (Alberio et al. 2002; Gibbons et al. 2007; Teixeira et al. 2011; Cordeiro et al. 2014). Devido à escassez de dados de LOPU em roedores, pode-se afirmar que a taxa de recuperação alcançada em nosso estudo ( $32,56 \pm 27,32\%$ ) está de acordo com a variação que Rodríguez et al. (2006) considera estar dentro do padrão de normalidade (de 32 a 90%).

Nesse estudo, a pressão utilizada na bomba de vácuo (65 mmHg) foi um pouco maior da que Morton et al. (2008) considerou trazer melhores resultados (50 mmHg) em aspirações foliculares em ovinos. Porém, o uso de agulhas 18G esteve de acordo com Rodríguez et al. (2006), que obteve excelentes índices de recuperação de oócitos em ovinos usando o mesmo calibre de agulha ou um pouco mais fina (20G). Apesar disso, acreditamos que o calibre da agulha usada pode ter causado sangramento ovariano nas pacas, que tem sido reportado como uma das complicações da aspiração folicular (Sarhan e Muasher 2007).

Como consequência desses sangramentos formaram-se aderências, que dificultaram a visualização das estruturas ovarianas e aspiração dos folículos, desfavorecendo a nossa taxa de recuperação. Mas, ao longo do experimento, para tentar evitar essas neoformações, a cavidade abdominal foi lavada com solução salina (NaCl 0,9%) adicionada a lidocaína a 2%. Esse anestésico local tem sido reportado como um dos medicamentos que atuam sobre a prevenção de aderências, por seu possível efeito anti-inflamatório (Ward e Panitch 2011). No entanto, não obtivemos sucesso em nosso estudo. Yuzbasioglu et al. (2008) relatou que em peritonite induzida em ratos, a lidocaína associada a prilocaina foi mais eficaz na prevenção de aderências intra-abdominais do que a lidocaína sozinha. Cordeiro et al. (2014) observou em cabras que 15% dos animais tiveram aderências, mesmo após lavar a cavidade com solução de heparina diluída em PBS. Já Teixeira et al. (2011) não observou qualquer aderência em ovelhas, mesmo lavando a cavidade com apenas solução salina a 0,9%, e relatou que isto pode ter sido por causa da manipulação cuidadosa do trato genital e da remoção de coágulos formados após as punções foliculares. Mais estudos acerca da prevenção de aderências ainda são necessários em pacas.

A perfuração da bexiga urinária é uma injúria já relatada, em outras espécies, devido acesso pela técnica Hasson. Sendo descrita como uma das condições necessária de conversão da técnica cirúrgica (Armenakas et al. 2004; Pillet et al. 2009; Ferreira et al. 2013). No entanto, a correção do caso ocorrido nesse estudo foi simples (Waldron 2003).

De acordo com Tams e Rawlings (2011), tais acidentes são raros. Sendo também raro em nossa rotina. Duarte et al. (2009) relataram que estes tipos de eventualidades poderiam ser evitados se fosse utilizada agulha de Veress para insuflar a cavidade abdominal, antes da entrada do primeiro trocáter.

## **Conclusão**

O posicionamento caudal dos portais laparoscópicos com ligeira triangulação permitiu boa visualização da cavidade abdominal e facilitou a manipulação dos ovários para aspiração folicular em pacas criadas em cativeiro. Mesmo havendo possibilidade de complicações, essas não foram tão significativas, e esta técnica demonstrou ser viável nessa espécie, com vantagem por ser de rápida execução e promover boa recuperação dos animais após o procedimento, especialmente devido à sua natureza minimamente invasiva.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem à FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro nesse estudo.

## **Referências (Formatadas de acordo com as normas do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)**

ALBERIO, R.; OLIVERA, J.; ROCHE, A. et al. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. *Small Ruminant Res.*, v.46, p.81-87, 2002.

ARMENAKAS, N.A.; PAREEK, G.; FRACCHIA, J.A. Iatrogenic bladder perforations: Long-term follow-up of 65 patients. *J. Am. Coll. Surg.*, v.198, p.78-82, 2004.

BERNAL, J.; BALDWIN, M.; GLEASON, T. et al. Guidelines for rodent survival surgery. *J. Invest. Surg.*, v.22, p.445-451, 2009.

BRUN, M.V.; SILVA FILHO, A.P.F.; BECK, C.A.C. et al. Ovariohisterectomia em caninos por cirurgia laparoscópica. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, v.37, n.6, p.480-485, 2000.

CORDEIRO, M.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; OLIVEIRA, M.E.F. et al. Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated follicular aspiration. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.137-144, 2014.

COX, J.F.; ALFARO, V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reprod. Domest. Anim.*, v.42, p.83-87, 2007.

DUARTE, A.L.L.; CATTELAN, J.W.; BEZERRA, M.B. et al. Videolaparoscopic guided hepatic biopsy with tru-cut needle in goats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p.12-19, 2009.

FELICIANO, M.A.R.; BARROS, F.F.P.C.; COUTINHO, L.N. et al. Conventional and Doppler Abdominal Ultrasonography in Pacas (*Cuniculus paca*). *Acta Sci. Vet.*, v.42, n.1235, p.1-6, 2014.

FERREIRA, G.S.; LUZ, M.J.; ATALLAH, F.A. et al. Tubal occlusion in dogs using the Technique Laparo-Endoscopic Single Site Surgery (Less) e video-Assisted technique. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.35, n.1, p.49-54, 2013.

GIBBONS, A.; PEREYRA BONNET, F.; CUETO, M. et al. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. *Reprod. Domest. Anim.*, v.42, p.423-426, 2007 .

GUIMARÃES, D.A.A.; BASTOS, L.V.; FERREIRA, A.C.S. et al. Características reprodutivas da paca fêmea (*Agouti paca*) criada em cativeiro. *Acta Amaz.*, v.38 ,n.3, p.531-538, 2008.

HOSKEN, F.M.; SILVEIRA, A.C. Criação de Paca. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2001. 262 p.

IUCN 2015: IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2015. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/699/0>>. Acessado em: 23 jun. 2015.

LOURENÇO, R.F.S.; DIAS, R.S.; GOMES, A.P. A criação de paca (*Agouti paca*) como alternativa de diversificação de produção e renda em Minas Gerais. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46., 2008, Rio Branco. Anais... Rio Branco, 2008, 15 p.

MATAMOROS, Y. Notas sobre la biologia del tepezcuinte, *Cuniculus paca*, brisson, (Rodentia: Dasyproctidae) en cautiverio. *Brenesia*, v.19, n.20, 71-82, 1982.

MORTON, K.M.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Effect of Aspiration Pressure during Oocyte Harvesting on Oocyte Recovery and in vitro Development of Ovine Oocytes. *Reprod. Domest. Anim.*, v.43, p.106-110, 2008.

PADILHA, L.C.; TEIXEIRA, P.P.M.; PIRES-BUTTNER, E.A. et al. *In vitro* maturation of oocytes from santa ines ewes subjected to consecutive sessions of follicular aspiration by laparoscopy. *Reprod. Domest. Anim.*, v.49, p.243-248, 2014.

PILLET, M.C.L.; LEONARD. F.; CHOPIN, N. et al. Incidence and risk factors of bladder injuries during laparoscopic hysterectomy indicated for benign uterine pathologies: a 14.5 years experience in a continuous series of 1501 procedures. *Hum. Reprod.*, v.24, n.4, p.842-849, 2009.

PIZZI, F.; CAROLI, A.M.; LANDINI, M. et al. Conservation of endangered animals: From biotechnologies to digital preservation. *Nat. Sci.*, v.5, n.8, p.903-913, 2013.

QUEIROLO D, VIEIRA E, EMMONS L. et al. *Cuniculus paca*. 2008., In: 2008 IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2015.2. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/699/0>>. Acessado em: 23 jun. 2015.

RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M. et al. Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reprod. Domest. Anim.*, v.41, p.106-113, 2006.

SARHAN, A.; MUASHER, S.J. Surgical complications of in vitro fertilization. *Middle East Fertil. Soc. J.*, v.12, n.1, p.1-7, 2007.

SILVA, M.A.M.; TONIOLLO, G.H.; FLORES, F.N. et al. Surgical time and complications of total transvaginal (total-NOTES), single-port laparoscopic-assisted and conventional ovariectomy in bitches. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.3, p.647-654, 2015 .

TAMS, T.R.; RAWLINGS, C.L. Laparoscopy. In: TAMS, T.R.; RAWLINGS, C.L. (Eds). *Small Animal Endoscopy*, 3.ed. St Louis: Elsevier, 2011. p.397-477.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; DA SILVA, A.S.L. et al. Ovum pick-up technique in recently weaned ewe lambs subjected to ovarian stimulation. *Acta Sci. Vet.*, v.43, n.1280, 1-9, 2015.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.F. et al. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Anim. Reprod. Sci.*, v.127, p.169-175, 2011.

VILANI, R.G.O.C.; BELERTINI, S.T.; LUGARINI, C. Associação de midazolam ao cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina para contenção farmacológica de pacas (*Agouti paca*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.41, p.23-24, 2004.

WALDRON, D.R. Urinary bladder. In: SLATTER, D. (Ed). Textbook of small animal surgery, 3.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003. p.1629-1637.

WARD, B.C.; PANITCH., A. Abdominal adhesions: current and novel therapies. *J. Surg. Res.*, v.165, p.91-111, 2011.

YUZBASIOGLU, M.F.; EZBERCI, F.; SENOGLU, N. et al. Intraperitoneal EMLA (lidocaine/prilocaine) to prevent abdominal adhesion formation in a rat peritonitis model. *Bratisl. Lek. Listy.*, v.109, n.12, p.537-543, 2009.

### **CAPÍTULO 3 – Protocolos de estimulação ovariana em *Cuniculus paca*: avaliação da recuperação oocitária e maturação *in vitro***

**Resumo** – Objetivou-se com este estudo estabelecer protocolos hormonais para a recuperação de oócitos de *Cuniculus paca* para MIV. Oito fêmeas adultas saudáveis foram submetidas a quatro tratamentos de estimulação ovariana. Todas foram submetidas a curto protocolo de sincronização de estro, adaptado de estudos em pequenos ruminantes, utilizando dose única de 45 mg de progesterona injetável e receberam uma injeção IM de 0,075 mg de d-cloprostenol no dia 6. As estimulações ovarianas foram realizadas como se segue: no grupo de GEF (FSHp e eCG), os animais foram tratados com uma doses únicas de 80 mg de FSHp e 200 UI de eCG IM no dia 6 após aplicação de progesterona; no grupo GF (FSHp), fêmeas receberam com dose única de 80 mg de FSHp IM no dia 6 após progesterona; no Grupo GE (eCG), administrou-se 200 UI de eCG IM no dia 6 após aplicação de progesterona; e no grupo GC (solução salina), 1 ml de solução salina foi administrado, sendo esse o grupo controle. LOPUs foram realizadas entre 22 e 26h após aplicação das gonadotrofinas. Todos os oócitos recuperados foram colocados em meio de maturação e incubados durante 24 horas. Após incubação eles foram corados usando Hoechst 33342, como descrito por Cherr et al. (1988), mas com algumas modificações para análise da maturação nuclear. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SD e foram analisados usando ANOVA com  $p \leq 0,05$ . Não houve diferença entre as médias de folículos observados, folículos aspirados e os oócitos recuperados por tratamento, GEF =  $17,63 \pm 14,51$ ;  $12,0 \pm 9,8$ ;  $5,5 \pm 5,5$ ; GF =  $10,75 \pm 9,59$ ;  $10,0 \pm 8,5$ ;  $4,6 \pm 5,2$ , GE =  $12,75 \pm 12,37$ ;  $11,0 \pm 11,0$ ;  $2,1 \pm 3,5$ , e GC =  $14,88 \pm 15,53$ ;  $13,0 \pm 13,0$ ;  $5,3 \pm 5,5$ ; respectivamente. As taxas de maturação oocitária não diferiram entre os grupos, com exceção dos grupos GF e GE ( $P = 0,043$  e  $P = 0,048$ , respectivamente), que obtiveram índices de maturação maior do que os oócitos GC. Nesse estudo, administração de gonadotrofina falhou na superovulação de animais tratados e em aumentar a eficiência de recuperação oocitária. Apesar da viabilidade do procedimento, são necessários mais estudos para desenvolver e refinar protocolos hormonais para a recuperação de oócitos e maturação *in vitro* nessa espécie.

**Palavras-chaves:** aspiração folicular; gonadotrofinas; maturação de oócito; protocolo hormonal; roedor

**Abstract** – The aim of this study was to establish optimal hormonal protocols for recovery of oocytes in *Cuniculus paca* for *in vitro* maturation. Eight healthy adult females were subjected to each of four treatments to stimulate ovarian follicular growth. All females were subjected to a estrus short-term protocol, adapted from studies in small ruminants using a single dose of 45 mg of injectable progesterone and single intramuscular injection of 0.075 mg d-cloprostenol on day 6. Ovarian stimulation was carried out as follows: in Group GFE (FSHp and eCG), animals were treated with a single dose of 80 mg of FSHp and 200 IU of eCG intramuscularly on day 6 after application of progesterone; in Group GF (FSHp), they were treated with a single dose of 80 mg of FSHp intramuscularly on day 6 after application of progesterone; in Group GE (eCG), they were treated with 200 IU of eCG intramuscularly on day 6 after application of progesterone; and in Group GC (saline solution), 1 ml of saline solution was administered to control does. The LOPU were performed between 22 to 26 hours after gonadotropin treatments. All recovered oocytes were placed into maturation media and incubated for 24 h. Following incubation oocytes were stained using Hoechst 33342, as described by Cherr et al. (1988), but with some modifications for nuclear maturation analysis. Data are expressed as mean  $\pm$ SD and were analyzed using ANOVA with  $p \leq 0.05$ . There were no differences among the mean number of observed follicles, aspirated follicles and oocytes recovered per treatment, GFE =  $17.63 \pm 14.51$ ;  $12.0 \pm 9.8$ ;  $5.5 \pm 5.5$ ; GF =  $10.75 \pm 9.59$ ;  $10.0 \pm 8.5$ ;  $4.6 \pm 5.2$ , GE =  $12.75 \pm 12.37$ ;  $11.0 \pm 11.0$ ;  $2.1 \pm 3.5$ , and GC =  $14.88 \pm 15.53$ ;  $13.0 \pm 13.0$ ;  $5.3 \pm 5.5$ ; respectively. Oocyte maturation rates did not differ among groups, except, GF and GE oocytes ( $P = 0.043$  and  $P = 0.048$ , respectively) had greater maturation rates than GC oocytes. In this study gonadotropin administration failed to superovulate treated does and increase oocyte retrieval efficiency. Despite the feasibility of the procedure, further studies are needed to develop and refine hormonal protocols for oocyte recovery and *in vitro* maturation in this species.

**Keywords:** follicular aspiration; gonadotropin; hormonal protocol; oocyte maturation; rodent

## Introdução

Paca é o segundo maior roedor neotropical (MATAMOROS, 1982), tem uma ampla distribuição e pode ser facilmente encontrada em várias áreas protegidas. No entanto, tem ocorrido extinção da espécie em localidades no sudeste da América do Sul por causa da destruição do habitat e caça predatória (IUCN, 2015). Dessa forma, manejo reprodutivo bem estabelecido é extremamente importante para preservação de espécies selvagens.

Pacas fêmeas mantidas em cativeiro atingem a puberdade com aproximadamente 7 meses de idade (LANGE; SCHMIDT, 2006), são poliéstricas não estacionais, podendo ciclar o ano todo (NOGUEIRA; TONIOLLO; GIANNONI, 2005). Apresentam ovulação espontânea, com comprimento do ciclo estral variando de 24 a 42 dias, e tempo de estro em torno de  $1,05 \pm 0,22$  dia (GUIMARÃES et al., 2008).

Pacas selvagens têm baixas taxas reprodutivas, mas há evidências de que podem ser melhoradas em cativeiro (SMYTHE; BROWN DE LA GUANTI, 1995). A produção *in vitro* de embriões (PIV) otimiza o número de filhotes por fêmea e permite o uso de animais jovens, gestantes, lactantes, com infertilidade adquirida e ainda, espécies ameaçadas de extinção (TEIXEIRA et al., 2014). Porém, para a PIV ser bem sucedida, o conhecimento da morfologia dos gametas e como eles se comportam durante a maturação *in vitro* (MIV) são essenciais. Adicionalmente, a maturação completa do oócito, é necessária para o desenvolvimento do embrião, sendo, portanto, um fator limitante na PIV (PADILHA et al., 2014).

Existem alguns trabalhos sobre a reprodução de roedores, principalmente, modelos experimentais (camundongos, ratos e cobaias), porém poucos com pacas. Monitoramento gestacional e avaliação do ciclo estral já foram relatados nessa espécie, no entanto, nenhum dos estudos com essa espécie estão relacionados com a recuperação, avaliação e maturação de oócitos, ou protocolos hormonais para esses fins (NOGUEIRA; TONIOLLO; GIANNONI, 2005; GUIMARÃES et al., 2008; OLIVEIRA; MACHADO; CANOLA, 2003; RIBEIRO et al., 2012).

Dessa forma, objetiva-se com este estudo estabelecer um protocolo de estimulação ovariana viável para esta espécie, a fim de conseguir melhor recuperação oocitária e eficiente maturação *in vitro*, e também avaliar as características e taxas de MIV dos oócitos recuperados por videolaparoscopia (LOPU).

## **Material e Métodos**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob protocolo nº 027420-11, seguindo os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (CEBEA).

### **Animais e tratamentos**

Foram utilizadas oito fêmeas adultas (acima de sete meses de idade), pesando em média 9 kg, não gestantes e hípidas, provenientes de criadouro registrados pelo IBAMA (número de registro: 482508).

Todas as fêmeas foram submetidas a curto protocolo de sincronização do estro, adaptado de estudos em pequenos ruminantes, utilizando dose única de 45mg de progesterona injetável (Sincrogest® Injetável, Ouro Fino, Brasil). O estímulo ovariano foi realizado no dia 6 após a aplicação da progesterona, como segue: no grupo de GEF (FSHp - Folltropin®-V, Bioniche, Canadá e eCG - Novormon®, MSD, Brasil), pacas foram tratadas com dose única de 80 mg de FSHp mais 200 UI de eCG por via intramuscular (IM); no grupo GF (FSHp), animais foram tratados com dose única de 80 mg de FSHp, IM; no Grupo GE (eCG), aplicou-se somente 200 UI de eCG, IM; e no grupo GC (NaCl 0,9%), 1 ml de solução salina foi administrada, como grupo controle. Todos os animais também receberam única aplicação, intramuscular, de 0,075 mg de d-cloprostenol (Veteglan®, Hertape Calier, Brasil), no mesmo dia das injeções de gonadotrofinas. Neste estudo, utilizou-se delineamento experimental de quadrado latino duplo, dividido em quatro períodos.

A recuperação de oócitos foi realizada por aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU) em intervalo mínimo de 15 dias entre períodos, e sempre 24-26 horas após administração de gonadotrofinas ou solução salina. Para punções foliculares, usou-se agulha 18G com bisel curto conectada ao sistema de vácuo com pressão não excedendo 65 mmHg. Folículos mensurados em, pelo menos, 1 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de bomba de aspiração (WTA, Brasil), ligada ao tubo de silicone, que também estava conectado a um tubo de centrifugação com capacidade de 50 mL. Dentro desses tubos continha solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco 15 mL (PBS) suplementado com 10 UI/mL de heparina, mantida a 36°C.

#### Maturação *in vitro*

Todos os produtos químicos deste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, EUA), a menos que indicado de outra forma.

A análise dos oócitos recuperados e maturação *in vitro* foram realizadas para cada fêmea individualmente. No laboratório, o líquido aspirado foi cuidadosamente depositado em placas de Petri e levado para observação em estereomicroscópio com aumento de 40x. Quando localizados, oócitos foram transferidos para meio de lavagem (TCM 199 suplementado com 83,4 µg/ml de amicacina, 0,23 mM de piruvato de sódio, 3 mg/ml de BSA e 10% de FBS).

Após isso, todos os oócitos recuperados foram levados para cultivo em placas contendo gotas de meio de maturação e incubados sob óleo mineral em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura controlada em 37°C durante 24h. O meio de maturação consistiu de TCM 199 suplementado com 83,4 µg/ml de amicacina, 0,23 mM de piruvato de sódio, 3 mg/ml de BSA, 10% de FBS, 75 IU/ml de FSH e 100 µM de cisteamina, adaptado de Mohammadi-Roushandeh et al. (2006).

#### Avaliação e classificação dos estágios de maturação nuclear

Subsequente à MIV, todos os oócitos foram corados usando Hoechst 33342, como descrito por Cherr, Drobnis e Katz (1988), mas algumas modificações para

análise da maturação nuclear. Resumidamente, oócitos foram removidos do meio de maturação e colocados em PBS, em seguida, aspirados cuidadosamente por repetidas vezes com o auxílio de uma pipeta para a remoção completa das células do *cumulus oophorus*. Em temperatura ambiente, os oócitos livres das células do *cumulus* foram fixados durante 5 minutos em 4% de formaldeído e permeabilizadas com Triton a 1% durante 10 min. Em seguida, foram colocados sobre lâmina de microscópico com uma gota de bisbenzimidazol (Hoechst 33342) em glicerol (0,001%). Assim, a lâmina foi coberta com uma lamínula, selada e os oócitos analisados no dia seguinte com auxílio de microscopia de epifluorescência (330-385 nm de comprimento de onda; com aumento de 200-400x).

Os estágios de maturação nuclear foram classificados com base na morfologia do DNA e nos vários graus de condensação de cromossomo: metáfase II (MII) com cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e expulsão do primeiro corpúsculo polar (CP); metáfase I (MI) em que os cromossomos estão condensados e sem observação do primeiro corpúsculo polar; vesícula germinativa (VG), oócitos imaturos em que cromossomos não estão condensados e estão cercados por uma membrana nuclear; e, degenerados/indeterminados (D/ID) em que o desenvolvimento nuclear não pôde ser determinado ou não teve cromatina evidente.

#### Análise estatística

A análise estatística foi realizada com a ajuda do software R® (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013). O desenho experimental utilizado correspondeu a um delineamento em quadro latino duplo 4X4 (DQL), sendo o fator linhas dos animais (8), o fator colunas dos períodos (4) e o fator tratamento aleatorizado dentre os animais, quadrado latino correspondente e períodos (4). Resultados foram analisados inicialmente pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk). A normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram testadas previamente e os dados reais ou transformados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA). Quando a diferença entre os tratamentos foi significativa ( $P < 0,05$ ) as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As taxas de

maturação e recuperação foram comparadas entre os grupos pelo teste de Chi-Quadrado ( $P < 0,05$ ).

## Resultados

Em 27 procedimentos realizados, foram observados 445 folículos ( $14 \pm 2,23$  por animal) e 366 foram aspirados ( $11,44 \pm 1,82$  por animal). Cento e quarenta oócitos foram recuperados, com média de  $4,38 \pm 0,86$  oócitos por paca. A taxa total de recuperação oocitária foi 38,25%. Os resultados de cada tratamento estão apresentados na Tabela 1. A média de folículos observados e aspirados, e oócitos recuperados foram semelhantes entre tratamentos e períodos ( $P = 0,02$ ), no entanto, a taxa de recuperação oocitária foi significativamente mais baixa no grupo GE ( $P = 0,001$ ).

Tabela 1. Resultados comparativos de diferentes protocolos de estímulo hormonal ovariano em *Cuniculus paca* submetidos à aspiração folicular por videolaparoscopia.

Grupo	FO / animal		FA / animal		OR / animal		TRO
	média $\pm$ EP	ntf	média $\pm$ EP	ntf	média $\pm$ EP	nto	%
GEF (na=7)	$17,63 \pm 5,13^a$	141	$12,0 \pm 3,5^a$	99	$5,5 \pm 1,9^a$	44	$44,44^a$
GF (na=7)	$10,75 \pm 3,39^a$	86	$10,0 \pm 3,0^a$	85	$4,6 \pm 1,8^a$	37	$43,53^a$
GE (na=6)	$12,75 \pm 4,37^a$	102	$11,0 \pm 4,1^a$	85	$2,1 \pm 1,2^a$	17	$20,00^b$
GC (na=7)	$14,88 \pm 5,49^a$	116	$13,0 \pm 4,7^a$	102	$5,3 \pm 1,9^a$	42	$41,18^a$

Abreviações: GEF = Grupo eCG + FSHp; GF = Grupo FSHp; GE = Grupo eCG; GC = Grupo controle (solução salina); na = número de animais; FO = Folículos observados; FA = Folículos aspirados; OR = Oócitos recuperados; TRO = Taxa de recuperação oocitária; ntf = número total de folículos; nto = número total de oócitos; EP = Erro padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre observações ( $P < 0,05$ ).

Dos oócitos recuperados, 123 foram avaliados quanto à maturação nuclear, e 17 foram perdidos durante este processo. Os resultados de MII, MI e de oócitos

degenerados foram semelhantes entre tratamentos e períodos ( $P=0,02$ ). As quantidades de VG e oócitos perdidos foram similares entre todas as fontes de variação (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados de maturação *in vitro* de oócitos e taxas (%) de cada estágio de maturação nuclear e oócitos perdidos por tratamento em *Cuniculus paca* submetidos à aspiração folicular por videolaparoscopia.

Grupos	MII	MI	D/ID	VG	OP
GEF (nto = 44)	14 (31,8%) <sup>ab</sup>	2 (4,5%) <sup>a</sup>	18 (40,9%) <sup>a</sup>	1 (2,3%) <sup>a</sup>	9 (20,5%) <sup>a</sup>
GF (nto = 37)	20 (54,1%) <sup>a</sup>	1 (2,7%) <sup>a</sup>	14 (37,8%) <sup>a</sup>	0 (0,0%) <sup>a</sup>	2 (5,4%) <sup>a</sup>
GE (nto = 17)	6 (35,3%) <sup>a</sup>	2 (11,8%) <sup>a</sup>	5 (29,4%) <sup>a</sup>	0 (0,0%) <sup>a</sup>	4 (23,5%) <sup>a</sup>
GC (nto = 42)	8 (19,1%) <sup>b</sup>	3 (7,1%) <sup>a</sup>	29 (69,0%) <sup>a</sup>	0 (0,0%) <sup>a</sup>	2 (4,8%) <sup>a</sup>

Abreviações: GEF = Grupo eCG + FSHp; GF = Grupo FSHp; GE = Grupo eCG; GC = Grupo controle (solução salina); nto = Número total de oócitos por tratamento; MII = Metáfase II; MI = Metáfase I; D/ID = Oócitos degenerados ou indeterminados; VG = Vesícula germinativa; OP = Oócitos perdidos. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre observações ( $P<0,05$ ).

Tratamentos GF e GE tiveram maiores taxas de maturação ( $P=0,043$  e  $P=0,048$ , respectivamente) do que grupo GC.

Uma das fêmeas apresentou corpo lúteo em dois tratamentos diferentes, um no tratamento GEF e outro no GE.

O tempo total da LOPU foi  $37,34 \pm 3,28$  minutos. Houve diferença significativa da média de tempo entre o primeiro período ( $49,13 \pm 3,89$  minutos) e o quarto ( $28,55 \pm 6,55$  minutos) ( $P=0,04$ ).

## Discussão

Técnicas de aspiração folicular por laparoscopia em conjunto com sistemas a vácuo têm sido realizadas com sucesso na recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em diferentes espécies. Diversos autores relataram taxas de recuperação oocitária variando de 16 a 98% em pequenos ruminantes (ALBERIO et al., 2002; COX; ALFARO, 2007; GOBBONS et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2011;

AVELAR et al., 2012; CORDEIRO et al., 2014). Em roedores, não há relatos sobre taxas de recuperação de oócitos realizando LOPU, mas podemos dizer que a taxa obtida em nosso estudo (38,25%) está de acordo com a qual Rodríguez et al. (2006) considera estar dentro da normalidade para ovinos (de 32 a 90%).

Por ser esse o primeiro estudo de LOPU em *Cuniculus paca*, optamos por utilizar uma agulha 18G que se conectava a um sistema a vácuo com pressão não superior a 65 mmHg, para a recuperação de oócitos. Esse calibre de agulha, está de acordo com o descrito por Rodriguez et al. (2006), que obteve excelentes índices de recuperação de oócitos em ovinos, utilizando o mesmo calibre ou menor (20G). No entanto, a pressão do vácuo foi ligeiramente mais elevada do que a que Morton, Maxwell e Evans (2008) consideraram trazer melhores resultados (50 mmHg) nas aspirações foliculares em ovelhas. Em nosso estudo, tanto agulha e quanto pressão foram satisfatórias e podem ser usadas em trabalhos futuros.

Os protocolos hormonais utilizados foram baseados em pesquisas com pequenos ruminantes e camundongos (JAINUDEEN; WAHID; HAFEZ, 2000; TARÍN; PÉREZ-ALBALÁ; CANO, 2002; TARÍN et al., 2002; BALDASSARRE et al., 2007; ABDULLAH et al., 2008; MARTÍN-COELLO et al., 2008), uma vez que não existem protocolos ainda recomendados para pacas. Durante este estudo, tentou-se adaptar um protocolo de sincronização de estro, utilizando curta exposição à progesterona (FONSECA et al., 2005) e comparar protocolos que promovessem estimulação ovariana.

Neste experimento, optou-se por usar progesterona injetável, por causa da viabilidade de aplicação em animais selvagens, evitando assim, estresse excessivo provocado pela contenção física, tanto para inserção quanto remoção dos dispositivos impregnados de progesterona, utilizados comercialmente. Romano (2004) não observou diferença na sincronização do estro em cabras quando comparou a eficiência de diferentes tipos de dispositivos contendo esse hormônio.

A dose de d-cloprostenol administrada nas fêmeas desse trabalho também foi adotada com base em trabalhos com pequenos ruminantes. Ela foi superior a utilizada por Fonseca et al. (2005), Teixeira et al. (2011) e Padilha et al. (2014), mas inferior a administrada por Abdullah et al. (2008). Porém, em todos esses estudos,

as doses mostraram-se eficientes, já que não foi relatada presença significativa de corpo lúteo em qualquer um deles, corroborando com as nossas respostas.

Gonadotrofinas como, FSH e eCG, têm sido usadas em protocolos de superestimulação ovariana em diversas espécies, mas não há relatos da aplicação destas em grandes roedores. Comparando esses hormônios em protocolos de superovulação, observou-se que camundongos responderam melhor ao eCG do que ao FSH (CORBIN; MCCABE, 2002). No entanto, em algumas linhagens de ratos, essas duas gonadotrofinas apresentaram resultados similares (POPOVA; BADER; KRIVOKHARCHENKO, 2005). Em nosso estudo, não ocorreu diferença entre os grupos tratados e o grupo controle na resposta estimulatória. Possível falha na dose empregada ou assincronia de aplicação dos hormônios com o ciclo estral dessas fêmeas podem ter acontecido. Dessa forma, sugere-se que novos estudos sobre a fisiologia reprodutiva e doses adequadas para a espécie *Cuniculus paca* sejam necessários, com o intuito de alcançar resultados satisfatórios.

Nesse trabalho, apesar de não ter ocorrido diferença na taxa de recuperação oocitária entre os grupos que receberam FSH e o controle, esta foi inferior no grupo que recebeu somente eCG. Resultados semelhantes foram encontrados em bovinos, quando protocolos de superovulação para aspiração folicular com eCG trouxeram menor taxa de recuperação e número de folículos aspirados, e ainda diminuiu a qualidade dos oócitos, quando comparados ao FSH (SENDAG et al., 2008; ONGARATTO et al., 2015).

A escolha do protocolo de aplicação hormonal em dose única foi baseada em trabalhos com pequenos roedores e pequenos ruminantes (OZGUNEN et al., 2001; ALBERIO et al., 2002; ABDULLAH et al., 2008; MARTÍN-COELLO et al., 2008; CHOI; HE, 2013), a fim de minimizar o stress causado pelo manejo excessivo. Alberio et al. (2002) obtiveram melhores resultados trabalhando com três aplicações de FSH em intervalos de 12 horas, do que realizando o esquema de única aplicação. Mesmo assim, Baldassarre et al. (2002) não observaram diferença entre os tratamentos de FSH e eCG aplicados em doses únicas ou múltiplas injeções de FSH em caprinos. Isso mostra que o tratamento de única injeção pode ser mais aplicável por causa da sua simplicidade. No entanto, em estudo mais recente, Avelar et al. (2012) obteve melhor taxa de recuperação de oócitos quando FSH foi aplicado em

cinco injeções (com intervalos de 12 horas entre elas) do que em protocolo de três injeções ou de dose única, porém, não houve diferença entre esses dois últimos regimes.

Em nosso estudo, a taxa de maturação oocitária não diferiu entre os grupos tratados. Resultado semelhante foi observado em cabras quando FSH foi comparado com eCG, em protocolos distintos (BARROS et al., 2015). No entanto, lhamas tratadas com eCG alcançaram maior taxa de maturação em comparação ao FSH (RATTO et al., 2005). Dados sobre comparação dessas gonadotrofinas sozinhas ou associadas ainda são escassos em roedores. É conhecido que ratos e camundongos respondem bem ao eCG em protocolos de superovulação, com boas taxas de maturação *in vivo* e *in vitro* de oócitos e produção *in vitro* de embriões (CORBIN; MCCABE, 2002; KANTER et al., 2004).

A temperatura de 37°C e o tempo de incubação de 24 horas utilizados no nosso protocolo de maturação *in vitro* foram baseados em trabalhos com pequenos roedores (NAKANO; KUBO, 2000; MAHMOUDI et al., 2005; BAHADORI et al., 2013). Esses autores relataram taxas de maturação superiores a 65%, tanto em CCOs quanto em oócitos desnudos. Em nosso estudo, os grupos que receberam gonadotrofinas alcançaram as maiores taxas (de 31,8 a 54,1%). Apesar de inferiores aos descritos em roedores de laboratório, consideramos como boas essas taxas, já que não existe na literatura dados dessas taxas em roedores selvagens.

Alguns elementos incluídos no meio de maturação, como antioxidantes, tem sido importantes para maturação oocitária em diversas espécies. O meio utilizado nesse estudo foi adaptado de MOHAMMADI-ROUSHANDEH et al. (2006), em que alcançaram melhor taxa de maturação quando 100µM de cisteamina foram acrescentados no meio TCM199, em camundongos. Com esse fato, nós utilizamos essa mesma concentração em nosso estudo. De Matos et al. (2003) também relataram melhoria nas taxas de MIV ou PIV quando usaram meios acrescentados de antioxidante.

As taxas de recuperação e maturação *in vitro* não diferiram durante os períodos do experimento. Resultados semelhantes foram encontrados em ovinos (TEIXEIRA et al., 2011; PADILHA et al., 2014), no entanto, observou-se diminuição na qualidade dos oócitos em caprinos (CORDEIRO et al., 2014) e bovinos (BROADBENT et al., 1996) nas repetidas aspirações foliculares. Estes resultados

podem sugerir que pacas não desenvolvem anticorpos para a FSH e eCG a partir de sucessivas aplicações desses hormônios. Contudo, trabalhos em algumas espécies domésticas demonstram que a produção desses anticorpos pode variar entre indivíduos ou aumentar quanto mais aplicações consecutivas forem realizadas, ou ainda quanto maior forem as doses das gonadotrofinas (DRION et al., 2001).

Apesar de as taxas de maturação oocitária ficarem ligeiramente mais baixas do que as alcançadas em roedores (60% a 80%) [WICKRAMASINGHE; EBERT; ALBERTINI, 1991; COTICCHIO et al., 2004; CHENA et al., 2005; MOHAMMADI-ROUSHANDEH et al., 2006), consideramos que os resultados deste trabalho são muito promissores, uma vez que este foi o primeiro estudo adaptado de protocolos hormonais e meio de cultivo utilizando a espécie *Cuniculus paca*.

## **Conclusão**

Apesar de não ter alcançado resposta esperada com os protocolos de superestimulação ovariana controlada, concluímos que boa quantidade de oócitos foi recuperada e que a técnica de maturação *in vitro* desenvolvida foi bem sucedida. No entanto, ainda são necessários mais estudos envolvendo tais técnicas com o objetivo de refinar os protocolos hormonais e promover estimulação ovariana eficiente nesta espécie.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro nesse estudo.

## **Referências**

ABDULLAH, R. B.; LIOW, S. L.; RAHMAN, A. N.; CHAN, W. K.; WAN-KHADIJAH, W. E.; NG, S. C. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. **Theriogenology**, v. 70, p. 765-771, 2008.

ALBERIO, R.; OLIVERA, J.; ROCHE, A.; ALABART, J.; FOLCH, J. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 46, p. 81-87, 2002.

AVELAR, S. R. G.; MOURA, R. R.; SOUSA, F. C.; PEREIRA, A. F.; ALMEIDA, K. C.; MELO, C. H. S.; TELES-FILHO, A. C. A.; BARIL, G.; MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, V. J. F. Oocyte production and in vitro maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 1-7, 2012.

BAHADORI, M. H.; GHASEMIAN, F.; RAMEZANI, M.; ASGARI, Z. Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2013.

BALDASSARRE, H.; RAO, K. M.; NEVEU, N.; BROCHU, E.; BEGIN, I.; BEHBOODI, E.; HOCKLEY, D. K. Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 612-616, 2007.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, v. 57, p. 275-284, 2002.

BARROS, F. F. P. C.; FUSELIER, A. J.; FERREIRA, J.C.; LEISINGER, C. A.; THOMAS, S. R.; PINTO, C. R. F. In vitro maturation of goat oocytes recovered during the non-breeding season. **Clinical Theriogenology**, v. 7, n. 3, p. 299, 2015.

BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F.; WATT, R. G.; SMITH, A. K.; FRANKLIN, M. F. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p.1027-1040, 1996.

CHENA, N.; LIOWA, S.; YIPA, W.; TANB, L.; NGA, S. Influence of cysteamine supplementation and culture in portable dry-incubator on the in vitro maturation, fertilization and subsequent development of mouse oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p. 2300-2310, 2005.

CHERR, G. N.; DROBNIS, E. Z.; KATZ, D. F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **Journal of Experimental Zoology**, v. 246, p. 81-93, 1988.

CHOI, J. K.; HE, X. *In vitro* maturation of cumulus-oocyte complexes for efficient isolation of oocytes from outbred deer mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, e56158, 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0056158

CORBIN, T. J.; MCCABE, J. G. Strain variation of immature rats in response to various superovulatory hormone preparations and routes of administration. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 41, p. 18-23, 2002.

CORDEIRO, M. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; OLIVEIRA, M. E. F.; DI FILIPPO, P. A.; DIAS, D. P. M.; BARETTA, C. A. G.; DÓRIA, R. G. S.; FELICIANO, M. A. R.; Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated follicular aspiration. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 137-144, 2014.

COTICCHIO, G.; ROSSI, G.; BORINI, A.; GRØNDAHL, C.; MACCHIARELLI, G.; FLAMIGNI, C.; FLEMING, S.; CECCONI, S. Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion in vitro are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. **Human Reproduction**, v. 19, n.12, p. 2913-2918, 2004.

COX, J. F.; ALFARO, V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 83-87, 2007.

DE MATOS, D. G.; NOGUEIRA, D.; CORTVRINDT, R.; HERRERA, C.; ADRIAENSSENS, T.; PASQUALINI, R. S.; SMITZ, J. Capacity of adult and prepubertal mouse oocytes to undergo embryo development in the presence of cysteamine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 214-218, 2003.

DRION, P. V.; DE ROOVER, R.; HOUTAIN, J.; MCNAMARA, E. M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 207-215, 2001.

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H.; SANTOS, I. C. C.; VIANA, J. H. M.; MAGALHÃES, A. C. M. Induction of estrus in non-lactating dairy goats with different estrous synchrony protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 117-124, 2005.

GIBBONS, A.; PEREYRA BONNET, F.; CUETO, M.; CATALA, M.; SALAMONE, D.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, n. 42, p. 423-426, 2007.

GUIMARÃES, D. A. A.; BASTOS, L. V.; FERREIRA, A. C. S.; LUZ-RAMOS, L. S.; OHASHI, O. M.; RIBEIRO, H. L. Características reprodutivas da paca fêmea (*Agouti paca*) criada em cativeiro. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 531-538, 2008.

IUCN. **Red List of Threatened Species**. Versão 2015.2. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/699/0>>. Acesso em: 23 Jun. 2015.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Ovulation induction, embryo production and transfer. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. S. E. (Ed.). **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000, p. 405-430.

KANTER, M.; YILDIZ, C.; MERAL, I.; KOC, A.; TASAL, I. Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 393-398, 2004.

LANGE, R. R.; SCHMIDT, E. M. S. Rodentia – Roedores Silvestres (Capivara, Cutia, Paca, Ouriço). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 475-491.

MAHMOUDI, R.; SUBHANI, A.; PASBAKHSH, P.; ABOLHASANI, F.; AMIRI, I.; SALEHNIA, M.; ETESAM, F. The Effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 3, n. 2, p. 74-78, 2005.

MARTÍN-COELLO J.; GONZÁLEZ, R.; CRESPO, C.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). **Theriogenology**, v. 70, n. 6, p. 1004-1013, 2008.

MATAMOROS, Y. **Notas sobre la biología del tepezcuinte, *Cuniculus paca*, brisson, (Rodentia: Dasyproctidae) en cautiverio**. Brenesia, 1982. 19/20. p. 71-82.

MOHAMMADI-ROUSHANDEH, A.; NOORI-MOOGHAHI, M. H.; PASBAKHSH, P.; ABDDVAHABI, A.; AKBARI, M.; SHOKRGOZAR, A.; SOBHANI, A. Effect of cysteamine on the rate of *in vitro* maturation of oocytes in two media. **Acta Medica Iranica**, v. 44, n. 3, p. 167-171, 2006.

MORTON, K. M.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Effect of Aspiration Pressure during Oocyte Harvesting on Oocyte Recovery and in vitro Development of Ovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 106-110, 2008.

NAKANO, H.; KUBO, H. Study of the in vitro maturation of mouse oocytes induced by microinjection of maturation promoting factor (MPF). **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 17, n. 1, p. 67-71, 2000.

NOGUEIRA, T. M. R.; TONIOLLO, G. H.; GIANNONI, M. L. Estrous cycle colpocytology in captive pacas (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766). **Ars veterinária**, v. 21, p. 209-214, 2005.

OLIVEIRA, F. S.; MACHADO, M. R. F.; CANOLA, J. C. Real time B-mode ultrasound in pacas pregnancy (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 73-78, 2003.

ONGARATTO, F.L.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; TRIBULO, A.; BÓ, G.A. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 4, p. 876-883, 2015.

OZGUNEN, K. T.; ERDOGAN, S.; MAZMANOGLU, N.; PAMUK, I.; LOGOGLU, G.; OZGUNEN, T. Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB/c mice. **Theriogenology**, v. 56, n. 3, p. 435-445, 2001.

PADILHA, L. C.; TEIXEIRA, P. P. M.; PIRES-BUTTLER, E. A.; APPARÍCIO, M.; MOTHEO, T. F.; SAVI, P. A. P.; NAKAGHI, E. Y. O.; ALVES, A. E.; VICENTE, W. R. R. *In vitro* maturation of oocytes from Santa Ines ewes subjected to consecutive sessions of follicular aspiration by laparoscopy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 243-248, 2014.

POPOVA, E.; BADER, M.; KRIVOKHARCHENKO, A. Strain differences in superovulatory response, embryo development and efficiency of transgenic rat production. **Transgenic Research**, v. 14, p. 729-738, 2005.

RATTO, M.; BERLAND, M.; HUANCA, W.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. **Theriogenology**, v. 63, n. 2445-2457, 2005.

RIBEIRO, V. M. F.; RUMPF, R.; SATRAPA, R.; SATRAPA, R. A.; RAZZA, E. M.; CARNEIRO JUNIOR, J. M.; PORTELA, M. C. Quadro citológico vaginal, concentração plasmática de progesterona durante a gestação e medidas fetais em paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766). **Acta Amazonica**, v. 42, n. 3, p. 445-454, 2012.

RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; CHAMORRO, C. A.; DE PAZ, P. Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 106-113, 2006.

ROMANO, J. E. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 15-19, 2004.

SENDAG, S.; CETIN, Y.; ALAN, M.; HADELER, K. G.; NIEMANN, H. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1-2, p. 208-214, 2008. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.01.007.

SMYTHE, N.; BROWN DE LA GUANTI, O. **The domestication and husbandry of the paca (*Agouti paca*)**. FAO Conservation Guide, 26. Roma: FAO; 1995, 93p.

TARÍN, J. J.; PÉREZ-ALBALÁ, S.; CANO, A. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects the quality of ovulated oocytes in the mouse. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 3, p. 398-405, 2002.

TARÍN, J. J.; PÉREZ-ALBALÁ, S.; GÓMEZ-PIQUER, V.; HERMENEGILDO, C.; CANO, A. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects pre-implantation embryo development in vitro in the mouse. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 302-319, 2002.

TEIXEIRA, P. P. M.; PADILHA, L. C.; DA SILVA, A. S. L.; BARROS, F. F. P. C.; COUTINHO, L. N.; OLIVEIRA, M. E. F.; MOTHEO, T. F.; SILVA, M. A. M.; FLÔRES, F. N.; LOPES, M. C. S. BANDARRA, M. B.; VASCONCELOS, R. O.; RODRIGUES, L. F. S.; VICENTE, W. R. R. Ovum pick up (LOPU) in Santa Ines sheep: learning curve and technical details. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 11, p. 235-241, 2013.

TEIXEIRA, P. P. M.; PADILHA, L. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; MOTHEO, T. F.; DA SILVA, A. S. L.; BARROS, F. F. P. C.; COUTINHO, L. N.; FLÔRES, F. N.; LOPES, M. C. S.; BANDARRA, M. B.; SILVA, M. A. M.; VASCONCELOS, R. O.; RODRIGUES, L. F. S.; VICENTE, W. R. R. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 169-175, 2011.

WICKRAMASINGHE, D.; EBERT, K. M.; ALBERTINI, D. F. Meiotic Competence Acquisition Is Associated with the Appearance of M-Phase Characteristics in Growing Mouse Oocytes. **Developmental Biology**, v. 143, p. 162-172, 1991.

## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho tem sido pioneiro na realização de biotécnicas da reprodução em *Cuniculus paca*. Diversos resultados obtidos foram satisfatórios para possível manutenção da reprodução assistida desses animais em cativeiro.

As técnicas de aspiração folicular por videolaparoscopia desenvolvida nesse trabalho e de maturação *in vitro* mostraram-se eficientes e possíveis de serem realizadas em estudos futuros.

Considerou-se também que os protocolos hormonais aplicados nesse estudo não foram eficientes, já que os resultados da superestimulação ovariana não diferiram do grupo controle. Apesar disso, boa quantidade de oócitos foi obtida, porém, a taxa de recuperação esteve levemente abaixo da ideal para diversas espécies de animais, além disso, a maioria dos oócitos não aparentava estar em excelente qualidade.

Sendo assim, mesmo alguns resultados serem considerados satisfatórios mais estudos acerca da morfologia oocitária e de protocolos de superestimulação ovariana, como doses de gonadotrofinas ou frequência de administração, além da precisão do ciclo reprodutivo nos momentos dos tratamentos, são necessários para assim, aumentar a taxa de recuperação de oócitos nesta espécie.