UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA - ZMV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

LUCIANA CRISTINA MACHADO

BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO CACHORRO-DO-MATO (*Cerdocyon thous)* E CRIOPRESERVAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO PARA ENRIQUECIMENTO DE BANCO DE GERMOPLASMA ANIMAL

Pirassununga
2016

LUCIANA CRISTINA MACHADO

BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO CACHORRO-DO-MATO (*Cerdocyon thous)* E CRIOPRESERVAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO PARA ENRIQUECIMENTO DE BANCO DE GERMOPLASMA ANIMAL

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção de título de Doutor em Ciências.
Departamento: Medicina Veterinária - ZMV
Área de Concentração: Biociência Animal.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

Pirassununga
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Machado, Luciana Cristina

MM149b Biologia da Reprodução do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e criopreservação do material genético para enriquecimento de banco de germoplasma animal / Luciana Cristina Machado ; orientador Carlos Eduardo Ambrósio. -- Pirassununga, 2016.

100 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Criopreservação. 2. Reprodução. 3. Banco de germoplasma. 4. Canídeos silvestres. 5. Início. I. Ambrósio, Carlos Eduardo , orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MACHADO, Luciana Cristina

Título: Biologia da reprodução do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e criopreservação do material genético para enriquecimento de banco de germoplasma animal.

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Data: 30/09/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Julgamento:_____

COMITE DE ÉTICA E PESQUISA (C.E.P. - FZEA): 14.1.1465.74.6

SISBIO: N° 47183-1

Aos meus queridos pais

Moacir Machado e Maria José da Silva Machado

Ao meu amado filho Murillo Machado Evangelista

Pelo incentivo constante,

E que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a DEUS acima de tudo, por me conceder esta preciosa oportunidade;

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio pela confiança em mim depositada e pelas grandes contribuições e apoio para a realização deste trabalho, cuja paciência, empenho e conselhos foram de extrema relevância para meu crescimento profissional e pessoal;

Aos meus familiares pela motivação e incentivo: Meus pais "Seu" Moacir, "Dona" Zezé, Eduardo, Denise, Duda e Isa, Juliana e Rodrigo, "Lêh", em especial ao meu filho Murillo a quem dedico todos os esforços e conquistas; Aos queridos Teresinha e Roberto pelas sábias e carinhosas palavras de sempre. Muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

Aos amigos da EE "Lauro de Araújo" EFM (Lagoa Branca - SP) e ETEC "Dr. Francisco Nogueira de Lima" (Casa Branca – SP) pela motivação, em especial aos meus queridos professores do Ensino Técnico José Carlos Pereira e José Carlos Pinheiro, a quem devo muito respeito e gratidão. Muito obrigado pela consideração a qual sempre tiveram comigo. Agradeço também às minhas queridas amigas de graduação, Maraísa e Tycha por sempre estarem ao meu lado.

Também deixo aqui meu muito obrigado aos inúmeros amigos que, distantes ou próximos, brasileiros ou estrangeiros, direta ou indiretamente deram sua contribuição para a concretização deste trabalho: docentes, funcionários, colegas de Graduação e Pós-Graduação da FZEA/USP, companheiros de "bandejão" e "laranjinha" e aos amigos do Laboratório de Anatomia Animal, Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e Laboratório de Células-Tronco e Terapias Gênicas (GDTI): Natália Juliana Nardelli

Gonçalves (Pós-Doutoranda), Valéria Lara Carregaro (Pós-Doutoranda), Alessandra de Oliveira Pinheiro (Doutoranda), Fábio Sérgio Cury (Doutorando), Janine Karla França (Doutoranda), Tiago Camara De Bem (Doutorando), Vanessa Cristina de Oliveira (Doutoranda), Ingrid Gomes (Mestranda), Jéssica Rodrigues Orlandin (Mestranda), Felipe Augusto Rós (Iniciação Científica). Deixo aqui meu agradecimento especial ao Prof. Dr. Atanásio Serafim Vidane (Universidade Eduardo Mondlane – Moçambique) pelos bons conselhos e orientações, e a Kelly Cristine dos Santos Roballo (Doutoranda), a qual colaborou intensamente na etapa de coleta e cultivo celular, obrigado pelos ensinamentos e acima de tudo, pela paciência a mim dedicada.

Meus especiais agradecimentos a Cristina Harumi Adania, Médica Veterinária e Coordenadora da Associação Mata Ciliar do município de Jundiaí – SP, cuja colaboração fora de extrema importância na disponibilização de animais para fins de obtenção de amostras teciduais. Obrigado por esta indispensável parceria. Estendo meus sinceros agradecimentos a toda sua equipe médica veterinária pela contenção e procedimentos cirúrgicos realizados.

Aos especialistas e técnicos responsáveis: Rose Eli Grassi Rici e Ronaldo Agostinho da Silva (Laboratório de Histologia e Microscopia Eletrônica – FMVZ/USP), Nilton Pedro dos Santos (Laboratório de Histologia – FZEA/ZMV/USP) e Gerlane Medeiros (UNEMAT – MT), pelo profissionalismo e pronto atendimento; Aos colegas de trabalho: Flávia Simone Munin e Julia Cristina Benassi (BDMV) pela colaboração e prestatividade e, acima de tudo, pela amizade e coleguismo.

Aos amigos Alecsandra Mara Ament de Araújo, Cláudia Scatolini Bonato Pavão, Joel Metzner da Cruz, Neimar dos Santos e Wagner Garrido dos Santos (Secretaria de Departamento – ZMV/FZEA/USP) pelo apoio moral, consideração e pelos incontáveis cafezinhos que tornaram meus dias indispensavelmente mais agradáveis.

E como não poderia deixar de mencionar, elevo aqui não apenas os meus agradecimentos, como também a minha gratidão aos “moradores” da Associação Mata Ciliar, participantes “ativos” nesta tese de doutorado: “Lilica”, “Leleca”, “Leleco”, “Lilico” e “Lulu” (*Cerdocyon thous*), torcendo para que esta pesquisa possa colaborar e ser mais um ponto de partida para estudos que priorizem a qualidade de vida aos espécimes que, assim como vocês, infelizmente não poderão voltar à vida livre e também,contribuir para a manutenção e preservação desta importante espécie a qual pertencem. Prof. Dr. Laerte Antônio Machado (*in memorian*) (Instituto Biológico de Campinas – SP), que eu saiba retribuir seus bons conselhos, sua consideração e sua amizade. Muito obrigado por cada palavra de otimismo proferida, as quais não serão esquecidas.

“Só uma sociedade bem informada a respeito da riqueza, do valor e da importância da biodiversidade é capaz de preservá-la.”

Washington Novaes

RESUMO

MACHADO, L.C. **Biologia da reprodução do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e criopreservação do material genético para enriquecimento de banco de germoplasma animal** [Biology of reproduction of Creb-Eating Fox (*Cerdocyon thous)* and cryopreservation of genetic material for enrichment of animal gene bank], 2016. 100p. Defesa de Tese de Doutorado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A expansão desordenada do processo de urbanização e da malha rodoviária sem a construção de corredores ecológicos que permitam a transposição segura de várias espécies de animais silvestres contribui para os elevados índices de mortalidade observados na atualidade e constitui uma ameaça para o declínio populacional de espécies, como o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*). Estima-se que o número de animais vitimados por atropelamentos chegue a aproximadamente 450 milhões de animais/ano nas diversas espécies, sendo: 400 milhões de pequenos vertebrados, 3 milhões de grandes vertebrados e aproximadamente 47 milhões de vertebrados de médio porte, a partir do estabelecimento de uma taxa média de 1,7 milhões de quilômetros à malha rodoviária do território brasileiro, levando-se em consideração a ampla diferença entre rodovias e estradas de asfalto e terra, pertencentes às esferas federal, estadual, e municipal. Uma estratégia para a conservação *ex situ* é o estudo da biologia da reprodução da espécie *Cerdocyon thous* é a criopreservação de seu patrimônio genético através da formação de um Banco de Germoplasma Animal, onde se contemplou o estudo do sistema reprodutor feminino de cinco espécimes por descrição morfológica e ultraestrutural, cultivo e criopreservação celular (fibroblastos). Foram utilizadas 7 (sete) fêmeas de *Cerdocyon thous*, (n=7), das quais 2 (duas) eram vítimas de atropelamento (Km 215 da Rodovia Anhanguera, Pirassununga – SP), tendo seus sistemas reprodutores dissecados e analisados macroscopicamente. Os respectivos animais foram encontrados em datas distintas em

período que compreende os meses de janeiro a julho do ano de 2015 com sinais de evisceração e um destes apresentava avançado estágio de decomposição. Foi realizado o estudo biométrico dos animais, onde se constatou que as fêmeas encontradas eram adultas. Os achados foram compilados por meio de técnicas histológicas (Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Massom, Reativo de Schiff ou "PAS" e Alcian Blue) e microscopia eletrônica de varredura. A partir da observação macroscópica do sistema reprodutor feminino da espécie em questão, constatou-se que o formato dos ovários apresenta forma similar a um grão de feijão e tubas uterinas com comprimentos variáveis entre 5 a 8 cm para os espécimes analisados. Constatou-se também, a presença de um útero bicornuado com aproximadamente 3 cm de comprimento e cornos uterinos compridos e estreitos (9 a 11 cm de comprimento); Como já observado em estudos realizados em outras espécies (domésticas e silvestres), a cérvix dos espécimes de *Cerdocyon thous* analisados faz comunicação entre o útero e a vagina. A vagina apresenta musculatura alongada e circular e a vulva uma conformação anatômica densa com clitóris bastante pronunciado. Microscopicamente, foram observados que os ovários apresentavam folículos primordiais formados por um ovócito e por células foliculares achatadas, bem como a presença de folículos primários unilaminares, este último constituído por um ovócito envolvido por uma camada de células da granulosa. A análise por microscopia eletrônica de varredura evidenciou a superfície ovariana, com característica irregular. As tubas uterinas apresentaram-se com epitélio de revestimento constituído de células ciliadas e células secretoras não ciliadas. Através de análise por microscopia eletrônica de varredura, foi possível verificar que parte da parede da tuba uterina apresentou uma mucosa intensamente "pregueada". Microscopicamente, o útero apresentou uma parede relativamente espessa e, externamente uma camada serosa, constituída de mesotélio e tecido conjuntivo e, dependendo da porção do órgão (adventícia), constituída de tecido conjuntivo sem

revestimento de mesotélio e microscopia eletrônica de varredura que evidenciou a superfície luminal, ilustrando a disposição dobrada do endométrio e a presença de fibras de músculo liso. A cérvix se apresentou com epitélio colunar simples, secretor de muco e por análise de microscopia eletrônica de varredura, foram observadas poucas fibras de músculo liso. Quanto à vagina, foi observado epitélio pavimentoso estratificado sobre um tecido conjuntivo denso, onde se constatou por microscopia eletrônica de varredura, a região de transição entre a cérvix e a vagina, onde se evidenciou a lâmina própria da mucosa vaginal, constituída por um tecido conjuntivo frouxo e, mais externamente, uma parede densa, constituída por uma camada muscular composta de fibras musculares lisas. A vulva e o clitóris foram observados recobertos por um epitélio pavimentoso estratificado com uma delgada camada de células queratinizadas na superfície. No que diz respeito à criação de uma linhagem celular (fibroblastos) para o enriquecimento de banco de germoplasma, os resultados demonstraram que as células de *Cerdocyon thous* apresentaram uma baixa capacidade clonogênica, especialmente quando comparadas ao cão doméstico. Por serem espécimes silvestres de histórico desconhecido (idade, hábitos alimentares), tais fatores poderiam implicar no tamanho dos telômeros das células (fibroblastos) e, consequentemente, ser um impedimento para uma satisfatória proliferação celular. Assim, o presente estudo teve caráter preservacionista, visando à conservação em longo prazo dos recursos genéticos desta espécie pertencente aos biomas brasileiros, sendo de grande relevância e os achados aqui contidos, um ponto de partida para a realização e continuidade de novas pesquisas com abordagem sobre a espécie em questão.

Palavras-Chave: Criopreservação; Reprodução; Banco de germoplasma; Canídeos silvestres.

ABSTRACT

MACHADO, LC. **Biology of reproduction of Creb-Eating Fox (*Cerdocyon thous*) and cryopreservation of genetic material is enrichment of animals gene bank**. 100p. Doctoral Thesis - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga (SP), 2016.

The disorderly expansion of the urbanization process and the road network without building ecological corridors that allow for the safe implementation of various species of wild animals contributes to the high mortality rates observed today and is a threat to the population decline of species such as the Creb-eating fox (*Cerdocyon thous*). It is estimated that the number of animals victims of road kill reach approximately 450 million animals / year in different species, of which: 400 million small vertebrates, 3 million of large vertebrates and approximately 47 million medium-sized vertebrates, from establishment of an average rate of 1.7 million kilometers of road network of Brazil, taking into account the wide difference between highways and asphalt roads and land belonging to the federal, state, and municipal. A strategy for ex situ conservation is the study of *Cerdocyon thous* species reproductive biology is cryopreservation of their genetic heritage through the formation of an Animal Germplasm Bank, where he contemplated the study of the female reproductive system of five specimens for morphological description and ultrastructural, cell culture and cryopreservation (fibroblasts). They used seven (7) female *Cerdocyon thous* (n = 7), of which two (2) were victims of running over (Km 215 of Anhanguera Highway, Pirassununga - SP) and their reproductive systems dissected and analyzed macroscopically. Their animals were found on different dates in a period comprising the months of January to July 2015 with evisceration signals and one of these had advanced stage of decomposition. biometric study of animals, which demonstrated that adult females were found, was performed. The findings were compiled by histological techniques (hematoxylin-eosin,

Masson's Trichrome, Schiff Reactive or "PAS" and Alcian Blue) and scanning electron microscopy. From macroscopic observation of the female reproductive system of the species concerned, it was found that the shape of the ovaries features similar to a grain of beans and uterine tubes with lengths ranging from 5-8 cm for the analyzed specimens. It was also found the presence of a bicorn uterus approximately 3 cm and narrow uterine horns (9-11 cm); as noted in studies in other species (domestic and wild), the cervix of *Cerdocyon thous* specimens analyzed is communication between the uterus and vagina. The vagina has lengthened and circular muscle and the vulva a dense anatomical conformation quite pronounced clitoris. Microscopically, it was observed that the ovaries had primordial follicles formed by a flattened oocyte and follicular cells, as well as the presence of unilaminares primary follicles, the latter consisting of an oocyte surrounded by a layer of granulosa cells. Analysis by scanning electron microscopy revealed the ovarian surface with irregular feature. The oviducts presented with epithelium composed of ciliated and non-ciliated secretory cells. Through analysis by scanning electron microscopy, we found that part of the oviduct wall showed a mucosa intensely "pleated". Microscopically, the uterus showed a relatively thick wall and externally a serous layer consisting of mesothelium and connective tissue and, depending on the body portion (adventitious), composed of connective tissue without mesothelium coating and scanning electron microscopy which showed the surface luminal illustrating the folded disposition of the endometrium and the presence of smooth muscle fibers. The cervix is presented with simple columnar epithelium, mucus secreting and analytical scanning electron microscopy; a few smooth muscle fibers were observed. As the vagina was observed stratified squamous epithelium on a dense connective tissue, where it was found by scanning electron microscopy, the transition region between the cervix and the vagina, where it showed the lamina propria of the vaginal mucosa, consisting of a connective tissue loose and more externally a thick wall consisting

of a muscular layer composed of smooth muscle fibers. The vulva and clitoris were observed covered by a stratified epithelium with a thin layer of keratinized cells on the surface. As regards the establishment of a cell line (fibroblasts) to the genebank enrichment, the results showed that cells had a lower *Cerdocyon thous* clonogenic capacity, especially when compared to the domestic dog. Being wild specimens of unknown history (age, diet), such factors could lead to the size of the telomeres of cells (fibroblasts) and thus be a hindrance to a satisfactory cell proliferation. Thus, the present study was preservationist character, aiming at long-term conservation of genetic resources of the species belonging to the Brazilian biomes, being of great importance and the findings contained herein, the starting point for the implementation and continuity of new research approach the species in question.

Key-words: Cryopreservation; Reproduction; Germplasm bank; Wild canids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Exemplar de *Cerdocyon thous* – Associação Mata Ciliar (Jundiaí – SP). Fonte: Machado, 2016_____36

Figura 2. Localização dos espécimes de *Cerdocyon thous* vítimas de atropelamento na Rodovia Anhanguera (050). Fonte: Google Maps, 2016_____55

Figura 3: Análise biométrica em *Cerdocyon thous*. Fonte: MACHADO, 2014_____56

Figura 4. Fotografia do sistema reprodutor feminino de *Cerdocyon thous:* A) Vulva (V) e clitóris (C); B) Ovário esquerdo (seta); C) Ovário direito (seta); D) Sistema reprodutor completo: ovários direito e esquerdo (setas), cornos uterinos (H), corpo do útero (U), vulva (V) e clítoris (C). Fonte: MACHADO, 2014. _____56

Figura 5. Fotomicrografia do ovário de *Cerdocyon thous*: A) Macroscopia do ovário (seta); B e D: microscopia eletrônica de varredura evidenciando folículos ovarianos (seta), nos aumentos de 30 e 100µm; C) Análise microscópica por técnica histológica (PAS e HE): Ovócito (O), ovócito primário (PO), células da Teca externa (TE), líquido folicular (FF), célula folicular (FC); Folículo contendo um ovócito envolvido por um conjunto de células da granulosa. O folículo apresenta-se envolvido por uma teca. Aumentos de 10 e 40x (20µm)_____58

Figura 6. Fotomicrografia da tuba uterina de *Cerdocyon thous*. A) Visão macroscópica (seta): Tuba uterina (UT), Fímbrias (F) e infundíbulo da tuba uterina (I); B) Análise por microscopia eletrônica de varredura indicando a tuba uterina (seta), em região próxima ao ovário (O); C e D: Análise microscópica por técnica histológica (HE): Luz da tuba uterina (seta), presença de tecido conjuntivo (CT) e seta indicando células ciliadas (CC), nos aumentos de 10 e 40x (20µm)_____59

Figura 7. Fotomicrografia do útero de *Cerdocyon thous*. A) Análise macroscópica: Cornos uterinos (representado pelas letras C), Corpo do útero (U) e cérvix (C); B e D) Análise microscópica pela técnica histológica (HE e Tricromo de Massom): Tecido conjuntivo (CT), epitélio simples (Ep), endométrio (E) e glândula retilínea em um endométrio em sua fase proliferativa (Gl), no aumento de 40x (20µm). C) Na análise por microscopia eletrônica de varredura, observa-se a

transição entre útero, cérvix e vagina, onde se evidencia a superfície luminal ilustrando a disposição dobrada do endométrio. Visualmente, a cérvix se apresenta com poucas fibras de músculo liso e a porção que faz saliência no lúmen da vagina é revestida por epitélio pavimentoso estratificado. Aumento de 1mm_____61

Figura 8. Fotomicrografia dos cornos uterinos de *Cerdocyon thous*. A e D) Análise por microscopia eletrônica de varredura dos cornos uterinos em cortes longitudinal e transversal, onde é possível verificar uma parede espessa constituída de músculo liso e sua estreita abertura (luz) e, mais externamente, tecido conjuntivo denso, nos aumentos de 200 e 300µm; B e C) Análise microscópica pela técnica histológica (Alcian Blue e PAS): Músculo liso (SM), luz (L), tecido conjuntivo (CT), dobras da mucosa e epitélio (Ep), ambos indicados por seta, nos aumentos de 10 e 40x (20µm)_____62

Figura 9. Fotomicrografia da vagina de *Cerdocyon thous*. A) Análise macroscópica: Porção onde se situa a vagina internamente (seta); B e D: Análise microscópica pela técnica histológica (PAS e HE): Vasos sanguíneos (BV), lâmina própria (LP), capilar (Ca), tecido conjuntivo (CT) e epitélio (Ep); C) Análise por microscopia eletrônica de varredura: Na imagem é observada a região de transição entre a cérvix e a vagina, onde se evidencia a lâmina própria da mucosa vaginal, constituída por um tecido conjuntivo frouxo. A seta indica a presença de secreção mucosa, sendo este um indicativo de que o animal se apresentava em fase reprodutiva. Mais externamente, observa-se que a parede da vagina é densa, constituída por uma camada muscular composta de fibras musculares lisas. Aumento de 1 mm_____63

Figura 10. Fotomicrografia da vulva de *Cerdocyon thous.* A) Análise macroscópica: Vulva (V) e clitóris (C), muito evidentes, onde os lábios maiores são preenchidos por uma densa camada de tecido adiposo; B, C e D) Análise microscópica pela técnica histológica (HE, PAS e Alcian Blue): Epitélio (Ep), vasos sanguíneos (BV), tecido conjuntivo (CT), músculo liso (SM), nos aumentos de 10 e 40x (20µm)_____64

Figura 11. Localização espacial da Associação Mata Ciliar (Jundiaí – SP). Fonte: Google Maps, 2016_____65

Figura 12. Contenção dos espécimes (*Cerdocyon thous*). Fonte: Machado, 2016_____66

Figura 13. Pesagem, monitoramento e análise biométrica dos espécimes (*Cerdocyon thous*). Fonte: Machado, 2016_____67

Figura 14. Procedimentos de coleta para obtenção de amostra tecidual. A e B) Tricotomia e higienização local; C e D) Biópsia epitelial. Fonte: Machado, 2016 68

Figura 15. Etapas de cultivo primário (fibroblastos) de *Cerdocyon thous*. A e B) Dilaceração do tecido com bisturi; C e D) Digestão celular (colagenase); E) "*Pellet*" obtido após centrifugação da amostra digerida; F, G e H) Cultivo em placas de Petri (100x 20mm/60x12mm); Acondicionamento em criotubos da amostra residual (epiderme) para análises posteriores. Fonte: Machado, 2016 68

Figura 16. Etapas de desenvolvimento de fibroblastos de *Cerdocyon thous*. Dia 1) A seta aponta para a presença de célula não aderida; Dia 5) A seta aponta para um aglomerado de tecido parcialmente digerido contendo células; Dia 11) Células em início de aderência à placa. Dia 18) Presença de fibroblastos aderidos à placa, no aumento de 20x (100µm). 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica de canídeos selvagens com ampla ocorrência no Brasil. (Fonte: Instituto Pró-Carnívoros, 2016)_____32

Tabela 2. Distribuição geográfica e status de consevação de canídeos selvagens com ampla ocorrência no Brasil. (Fonte: Instituto Pró-Carnívoros, 2016)_____33

Tabela 3. Composição dos diferentes meios de cultivo empregados para desenvolvimento de fibroblastos de *Cerdocyon thous*_____51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de crescimento (pré e pós-criopreservação) de fibroblastos de *Cerdocyon thous* 71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

bFGF/βFGF	Fibroblast Growth Factor basic
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CITES	Conventional International Trade in Engangered Species
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRMV	Conselho Regional de Medicina Veterinária
EtOH	Etanol
F1	Fêmea 1
F2	Fêmea 2
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
HE	Hematoxilina-Eosina
IUCN	International Union Conservation of Nature
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
LIF	Leukemia inhibitory factor
M1	Macho 1
M2	Macho 2
M3	Macho 3
MEF	Monolayer Embryonic Fibroblast
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PAS	Periodic Acid Shiff
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 25

2. JUSTIFICATIVA 29

3. REVISÃO DA LITERATURA 31

3.1. Mamíferos: Características Gerais 31

3.1.1 *Cerdocyon thous* 33

3.1.2. Ciclo Reprodutivo 35

3.1.3. Ameaças 37

3.1.4. Preservação da Espécie 38

3.2. Caracterização do Sistema Reprodutor Feminino de Carnívoros 40

3.3. A importância dos Bancos de Germoplasma Animal 42

4. OBJETIVOS 46

4.1. Objetivo geral 46

4.2. Objetivos específicos 46

5. MATERIAIS E MÉTODOS 48

5. 1 Procedência dos Animais 48

5.2 Descrição morfológica do sistema reprodutor feminino 48

5.3 Análise microscópica pela técnica histológica 48

5.4 Microscopia eletrônica de varredura 49

5.5 Procedimentos para coleta de material biológico 49

5.5.1 Coleta e transporte de biópsias de pele 50

5.5.2 Isolamento e cultivo das células fibroblásticas de *Cerdocyon thous* 50

5.5.3 Curva de Crescimento 51

5.5.4 Criopreservação de fibroblastos de *Cerdocyon thous* 52

5.5.5 Procedimentos de descongelamento e cultivo das células (fibroblastos) 52

6. RESULTADOS 55

6.1 Estudos macroscópicos e análise por técnica histológica 55

6.2 Cultivo celular para constituição ou enriquecimento de banco de germoplasma *(Cerdocyon thous)* 65

6.2.1 Obtenção das amostras teciduais (Epitélio) 65

6.2.2 Cultivo de fibroblastos de *Cerdocyon thous* 69

6.2.3 Curva de crescimento celular (pré e pós-criopreservação) de fibroblastos de *Cerdocyon thous* 70

7. DISCUSSÃO 73

8. CONCLUSÃO 78

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

APÊNDICES 90

Apêndice A: Aprovação do Comitê de Ética 91

Apêndice B: Aprovação do SISBIO 92

Apêndice C: Artigo Publicado 96

1.Introdução

1. INTRODUÇÃO

A União Mundial para a Conservação (IUCN) é a responsável pelo estabelecimento de categorias de conservação de espécies. Com o propósito de preservar as espécies tidas como ameaçadas (criticamente em perigo, em perigo e vulnerável), esta classificação auxilia na identificação de espécies que necessitam de maior atenção conservacionista. Isso permite a promoção de acordos, como a Convenção Internacional de Espécies Ameaçadas (CITES), e, também, outras medidas em prol da conservação da fauna e da flora (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

Com base nessas categorias, a IUCN preparou várias listas vermelhas de espécies ameaçadas de extinção, em diferenciados táxons, nas quais estão incluídos animais e plantas de todo o planeta (IUCN, 2015).

No Brasil, o Ministério do Meio Ambiente (MMA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), contando com a parceria da Fundação Biodiversitas para a Conservação da Diversidade Biológica, da Sociedade Brasileira de Zoologia e da "*Conservation International"*, elaboraram a lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Essa lista serve como referência tanto para programas de recuperação de espécies ameaçadas, prováveis implantações de unidades de conservação auxiliares em medidas atenuantes de impactos ambientais, quanto para pesquisadores e para a aplicação da Lei de Crimes Ambientais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015).

Apesar do *Cerdocyon thous* não ser uma espécie constante no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, um grande número de indivíduos deste canídeo silvestre e de outras espécies silvestres têm sido frequentemente vitimados por atropelamentos em estradas e rodovias, devido à ausência de corredores ecológicos para

transposição dos animais de um lado para o outro da rodovia. Estima-se que o número de animais vitimados por atropelamentos chegue a aproximadamente 450 milhões de animais/ano de diversas espécies, sendo: 400 milhões de pequenos vertebrados, 3 milhões de grandes vertebrados aproximadamente 47 milhões de vertebrados de médio porte, a partir do estabelecimento de uma taxa média de 1,7 milhões de quilômetros à malha rodoviária do território brasileiro, levando-se em consideração a ampla diferença entre rodovias e estradas de asfalto e terra, pertencentes às esferas federal, estadual, e municipal (O ECO, 2015).

Os elevados índices de mortalidade por atropelamentos de animais silvestres registrados em dias atuais se devem não só pela expansão da malha rodoviária, mas também ao que chamamos de "efeito de borda". Mesmo sendo os canídeos animais predadores, podem apresentar comportamento onívoro, em decorrência da variedade de alimentos ou se as condições ambientais assim o exigirem, incluindo desde frutos, insetos, crustáceos, peixes, pequenos vertebrados, pequenas aves e roedores, além de carniças e alimentos descartados pelo ser humano. Para a obtenção destes rejeitos alimentares, muitos animais se arriscam em áreas com grande tráfego. Apesar de ser considerada uma espécie comum e abundante, poucas pesquisas sobre reprodução de *Cerdocyon thous* foram realizadas, fazendo-se necessário o aprofundamento de estudos nesta vertente (WILSON, 1997; LOSKUTOFF, 1998; PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

O conhecimento da morfologia dos órgãos genitais e fisiologia de qualquer espécie são de suma importância para a sua sobrevivência, prosperidade ou extinção. Análises da diversidade dos sistemas reprodutivos são relevantes para a compreensão dos aspectos adaptativos e evolutivos envolvidos na sua diferenciação (PUKAZHENTHI & WILDT, 2004). Assim, fica evidente a importância em se conhecer e aprofundar sobre os aspectos

reprodutivos, morfológicos e ultraestruturais, bem como forma e posicionamento dos órgãos de *Cerdocyon thous*, como forma de se garantir a perpetuação desta espécie de relevante papel ecológico.

No intuito de minimizar as taxas de declínio das espécies, no que diz respeito à conservação de material genético de espécies criticamente ameaçadas de extinção, os chamados "bancos de recursos genéticos" ou "banco de germoplasma animal" são utilizados como repositórios de germoplasma (WILSON, 1997; PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Reservas genéticas de bancos diferem de um banco de células e tecidos armazenados, disponível somente como um recurso para a pesquisa genética porque efetivamente aumenta a "vida genética", dando continuidade como parte de programas de reprodução (Martins et al., 2007; Piovezan et al., 2012; COMIZZOLI & HOLT, 2014; Machado et al., 2016). Uma vez que o objetivo dos programas reprodutivos de espécies ameaçadas é a manutenção da diversidade genética máxima, torna-se evidente que os bancos de recursos genéticos contribuem diretamente para os objetivos de conservação de qualquer espécie, criticamente ameaçada ou não, uma vez que proporciona a manutenção do patrimônio genético, enfocando a relevância de pesquisas realizadas sobre a temática aqui apresentada.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Embora o *Cerdocyon thous* seja uma espécie comum e de ampla distribuição (EMMONS & FEERS, 1998), algumas informações sobre sua morfologia e comportamento ainda são desconhecidas, sendo de extrema relevância para a elaboração de estratégias de manejo e conservação da espécie, bem como do ambiente em que vivem. Pensando no ecossistema e em seu funcionamento, Fontana et al., (2003) sugerem que o declínio de uma espécie abundante e que cumpre um papel ecológico importante, pode ser encarado como mais preocupante que o desaparecimento de espécies que nunca foram numerosas e sempre desempenharam um papel ecológico limitado. Em outras palavras, garantir que as espécies comuns se mantenham comuns pode ser tão importante quanto salvar espécies raras (Fontana et al., 2003). Sob essa ótica, mesmo não estando ameaçados de extinção em suas áreas de ocorrência, canídeos silvestres como o *Cerdocyon thous* podem ser considerados importantes para a conservação dos ecossistemas em que estão inseridos devido a sua abundância e por desempenharem papel ecológico.

Portanto, esta pesquisa visa o estudo do sistema reprodutor feminino da espécie *Cerdocyon thous* por meio de descrição morfológica e ultraestrutural, forma e posicionamento dos órgãos genitais e da criopreservação do seu patrimônio genético através do enriquecimento de Banco de Germoplasma Animal, onde será contemplado e criopreservação das células (fibroblastos), objetivando em longo prazo a conservação dos seus recursos genéticos, constituindo um importante material para posteriores pesquisas sobre a temática apresentada nesta tese de doutorado.

3.Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Mamíferos: Características Gerais

Mamíferos são animais pertencentes à classe Mammalia, com grande diversidade de espécies. Suas principais características são o corpo coberto por pelos, a capacidade de manter a estabilidade da temperatura corporal, a fecundação interna o desenvolvimento do filhote dentro do corpo materno, a produção de leite por glândulas mamárias e os cuidados prolongados da mãe com a prole. Destaca-se, ainda, a maior capacidade do crânio correlacionada ao aumento do tamanho do encéfalo, que junto às demais características conferem ao grupo melhores condições de sobrevivência. Por outro lado, outras características tornam algumas espécies vulneráveis dentre elas o grande tamanho corporal, a organização social complexa, o tamanho populacional reduzido e/ou a distribuição geográfica reduzida (BRAGA, 2004).

Encontra-se taxonomicamente enquadrada na Classe Mammalia a Ordem Carnívora, esta que é uma ordem bastante ampla e complexa, que possui a importante função ecológica de regular as populações de presas. Apresentam várias adaptações morfológicas que possibilitam o sucesso durante a perseguição e consumo de caça, como corpo alongado, musculatura desenvolvida, e membros que permitem o alcance de grandes velocidades além de sentidos aguçados, dentes especializados e garras desenvolvidas (BRAGA, 2004). A Família Canidae é uma das famílias pertencentes à Ordem Carnivora. No Brasil, estão constituídas/representadas pelas espécies que seguem: *Crhysocyon brachyurus* (Lobo-Guará), *Spheothos venaticus* (cachorro-vinagre), *Lycalopex gimnocercus* (graxaim-do-campo), *Lycalopex vetulus* (raposinha-do-campo) e *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), sendo este último, objeto alvo desta

tese de doutorado. Outra espécie, *Atelocynus microtis*, ocorre estritamente na região Amazônica (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação taxonômica de canídeos selvagens com ampla ocorrência no Brasil. (Fonte: Adaptada do Instituto Pró-Carnívoros, 2003).

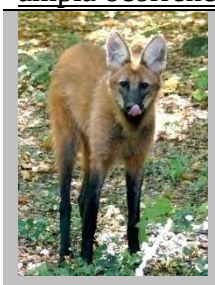
Crhysocyon brachyurus (Lobo-Guará)	*Spheothos venaticus* (Cachorro-Vinagre)	*Lycalopex gimnocercus* (Graxaim-do-Campo)	*Lycalopex vetulus* (Raposa-do-campo)	*Cerdocyon thous* (Cachorro-do-mato)
Classificação Científica	**Classificação Científica**	**Classificação Científica**	**Classificação Científica**	**Classificação Científica**
Reino: Animalia	**Reino:** Animalia	**Reino:** Animalia	**Reino:** Animalia	**Reino:** Animalia
Filo: Chordata	**Filo:** Chordata	**Filo:** Chordata	**Filo:** Chordata	**Filo:** Chordata
Classe: Mammalia	**Classe:** Mammalia	**Classe:** Mammalia	**Classe:** Mammalia	**Classe:** Mammalia
Ordem: Carnivora	**Ordem:** Carnivora	**Ordem:** Carnivora	**Ordem:** Carnivora	**Ordem:** Carnivora
Família: Canidae	**Família:** Canidae	**Família:** Canidae	**Família:** Canidae	**Família:** Canidae
Gênero *Chrysocyon* Smith, 1839	**Gênero:** *Spheothos* Lund, 1842	**Gênero** *Lycalopex* Fisher, 1814	**Gênero** *Lycalopex* Lund, 1842	**Gênero** *Cerdocyon* Linnaeus, 1766
Espécie *C. brachyurus*	**Espécie** *S. venaticus*	**Espécie** *L. gymnocercus*	**Espécie** *L. vetulus*	**Espécie** *C. thous*

Apesar da diversificação de canídeos selvagens existentes no Brasil, esta ainda é a região com maior carência de dados acerca de suas espécies, se comparado com outros países. As espécies *Atelocynus microtis* e *Lycalopex vetulus* apresentam poucas pesquisas devido à insuficiência de dados; *Speothos venaticus* é considerada pela IUCN vulnerável; *Chrysocyon Brachyurus* ameaçada, sendo estas duas últimas espécies as pertencentes como os únicos canídeos selvagens brasileiros que possuem "studybook", tanto regional quanto internacional, com a primeira publicação no ano de 1979 (para a espécie *Speothos venaticus*) e 1980 (para a espécie *Crhysocyon brachyurus*).

Da mesma forma como as espécies *Atelocynus microtis* e *Lycalopex vetulus*, a espécie *Lycalopex gymnocercus* também é pouco estudada. Para a espécie *Cerdocyon thous*, a grande maioria das pesquisas apresentam enfoque acerca de sua ecologia, ciclo reprodutivo, bem como estudos de caráter comportamental e preservacionista

(GINSBERG & MACDONALD, 1990; CLUTTON-BROCK, 1977; RAMOS-JUNIOR et. al., 2003; SILLERO-ZUBIRI & MACDONALD, 2004; Silva et. al., 2010; IUCN, 2014) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição geográfica e status de consevação de canídeos selvagens com ampla ocorrência no Brasil. (Fonte: Adaptada do Instituto Pró-Carnívoros, 2003).

				
Crhysocyon brachyurus **(Lobo-Guará)**	*Spheothos venaticus* **(Cachorro-Vinagre)**	*Lycalopex gimnocercus* **(Graxaim-do-Campo)**	*Lycalopex vetulus* **(Raposa-do-campo)**	*Cerdocyon thous* **(Cachorro-do-mato)**
Distribuição Geográfica	**Distribuição Geográfica**	**Distribuição Geográfica**	**Distribuição Geográfica**	**Distribuição Geográfica**
Status de Conservação	**Status de Conservação**	**Status de Conservação**	**Status de Conservação**	**Status de Conservação**

3.1.1 *Cerdocyon thous*

Popularmente conhecido como raposa-do-mato, graxaim, graxaim-do-mato, lobinho e cachorro-do-mato, o *Cerdocyon thous* pertence ao Filo Chordata, à classe Mammalia, à Ordem carnívora e à família Canidae, que por vezes é dividida em duas tribos: Vulpini e Canini, no qual se encontra o gênero Cerdocyon, cujo único representante é o *Cerdocyon thous* (Figura 1). Foi o primeiro canídeo sul-americano

descrito na literatura por Linnaeus (1766), com organização social caracterizada por uma composição que pode variar de dois a cinco indivíduos que forrageiam a uma distância de aproximadamente 100 metros entre si, mas geralmente não existindo cooperação durante as caçadas (BRADY, 1979; (BISBAL & OJASTI, 1980) MACDONALD & COURTENAY, 1996). Pode ser encontrado em vários biomas como Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Campos Sulinos, Pantanal. Utiliza bordas de matas e áreas alteradas e habitadas pelo homem como seu habitat, sendo constantemente atropelados em rodovias. Pode estar presente em quase toda a América do Sul, desde o Uruguai e norte da Argentina, até terras baixas da Bolívia, Venezuela, Colômbia, Guianas, Suriname e Brasil, apresentando neste último uma distribuição espacial que compreende todo o território brasileiro, com exceção das planícies da Bacia Amazônia (BISBAL & OJASTI, 1988, BERTA, 1988; MARINHO-FILHO & MEDRI, 2008).

Esta é uma dentre as espécies de maior ocorrência de mamíferos terrestres de médio e grande porte da região central do Brasil (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Tocantins). Apesar disso, alguns dados da ecologia básica dessa espécie, como área de uso e utilização de habitats, ainda são escassos para maior parte dos biomas brasileiros, principalmente para o Cerrado. Ainda, estudos existentes para a área de distribuição do *Cerdocyon thous* mostram variações consideráveis entre as regiões estudadas. Na Venezuela, a área de uso do *Cerdocyon thous* varia entre 0.45 a 1 km² (BRADY, 1979; Sunquist et al., 1982). No Brasil, a área de utilização varia entre 0.48 a 10.42 km² na região norte do país (MACDONALD & COURTENAY, 1996), de 1.4 a 11.1 km² em área alterada de Mata Atlântica (Myers et al., 2000), chegando a 12.8 km² em região de Cerrado (Marinho-Filho et al, 2002).

Espécimes de *Cerdocyon thous* demonstram preferência por áreas com formações mais abertas, como savana arbórea e mata do tipo capoeira e também, podem utilizar

ambientes de campo (BRADY, 1979; Sunquist et al., 1982; MACDONALD & COURTENAY, 1996; Myers et al., 2000).

Possui porte médio, o comprimento do corpo varia de 60 a 70 centímetros e a cauda mede aproximadamente 30 centímetros. Indivíduos adultos pesam entre 6 e 10 quilogramas. A pelagem varia de tons cinzentos e castanhos, com faixas de pelos pretos da nuca até a ponta da cauda, o peito e o ventre são claros, também possuem tonalidades amareladas São animais que possuem hábitos noturnos e crepusculares, ocasionalmente é encontrado de dia. Ao longo de suas trilhas marcam seu território por meio da vocalização e urinando sobre arbustos e ervas, detectadas por forte odor. É comum encontrá-lo buscando seu alimento sozinho, mas podem ocorrer aos pares ou em pequenos grupos familiares em busca de suas presas. Mas em geral, são caçadores solitários. Apesar de serem bons corredores, não são velozes se comparado aos felídeos como as chitas, por exemplo, e caçam as presas por corridas de resistência. (Rodrigues et al., 2013) .

3.1.2. Ciclo Reprodutivo

Apesar de ser considerada uma espécie comum, poucas pesquisas sobre reprodução de *Cerdocyon thous* foram realizadas, porque o sucesso reprodutivo em cativeiro é muitas vezes baixo, fazendo-se necessário o aprofundamento de estudos nesta vertente.

O ciclo reprodutivo desta espécie corresponde aos fenômenos observados em todos os mamíferos, exceto em alguns primatas, apresentando períodos regulares, com períodos limitados de receptividade sexual, o que ocorre em intervalos característicos para cada espécie. Compreende-se intervalo de ciclo como sendo o tempo desde o início

do período de receptividade sexual até o período seguinte, ou como o intervalo entre sucessivas ovulações. Os canídeos domésticos atingem a puberdade quando estão em média com 7 a 8 meses de idade, com pequena variação de tempo de acordo com o porte da raça (até 9 – 12 meses), sendo comum apresentarem ciclos em intervalos menores ou maiores, até que se estabeleça a normalidade. Normalmente as cadelas possuem um intervalo de seis meses entre cada ciclo. Em comparação com canídeos domésticos, fêmeas de *Cerdocyon thous* podem gerar, em média, duas ninhadas por ano, a cada sete ou oito meses. O período de gestação para a espécie é de cerca de dois meses, nascendo de três a seis filhotes com 120 a 160 gramas cada. A independência dos filhotes ocorre entre o quinto e sexto mês de vida e a maturidade sexual é alcançada com cerca de nove meses de idade (CRUSCO, 2005; Rodrigues et al., 2013).

Figura 1. Fêmea de *Cerdocyon thous* - Associação Mata Ciliar (Jundiaí - SP). Fonte: MACHADO, 2016.

3.1.3. Ameaças

É do conhecimento de todos que a degradação ambiental desencadeia o declínio e a extinção de muitas espécies existentes no planeta (Purvis et al., 2000; PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Medidas emergenciais devem ser tomadas para evitar o agravamento desse quadro crítico. A conservação *in situ* é sem dúvida a melhor forma de conservar a fauna e a flora. Porém, a sua idealização depende de fatores que são trabalhados em longo prazo, como a educação ambiental (WILSON, 1997).

Entre os grupos de animais mais comumente afetados pela fragmentação e modificação do habitat destacam-se os carnívoros. Animais desse grupo geralmente ocupam posições de alto nível trófico (CRAWSHAW, 1995), possuem baixas densidades populacionais baixas taxas reprodutivas e elevada longevidade. Necessitam de extensas áreas e realizam dispersões de longas distâncias. Devido a esse conjunto de características, esses animais tornam-se mais susceptíveis a ameaças de extinção (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Também, os mamíferos da Ordem Carnivora, constituem o principal grupo de predadores de vertebrados dos ecossistemas terrestres (Pitman et al., 2002).

Como exposto anteriormente, as maiores forças que determinam a evolução, a composição e a função da comunidade de carnívoros são a fragmentação (Dayan et al., 1989) e a competição (ROSENZWEIG, 1966). Em áreas ocupadas por seres humanos a competição e a fragmentação aparecem fortemente ligadas, isso porque o novo mosaico de vegetação propicia ambientes de alta qualidade para espécies generalistas (GOODRICH & BURSKIRK, 1995). Entre os carnívoros, seguindo o padrão anteriormente abordado, animais generalistas seriam potencialmente menos susceptíveis às mudanças ambientais. O *Cerdocyon thous*, por exemplo, é considerado um animal

generalista e oportunista, beneficiando-se em parte de algumas alterações antrópicas, como o suprimento extra de alimentos gerados pelo lixo humano ou mesmo por plantações e criações domésticas (MONTGOMERY & LUBIN, 1978; BISBAL & OJASTI, 1980; Sunquist et al., 1982; Motta-Junior et al., 1994; FACURE & GIARETTA, 1996; FACURE & MONTEIRO-FILHO, 1996; MACDONALD & COUTERNAY, 1996; Dotto et al., 2001; PEDÓ, 2002; ALMEIDA, 2003; CHEIDA, 2003).

3.1.4. Preservação da Espécie

A manutenção da fauna e da flora em seu habitat natural é denominada de conservação *in situ*. Essa é, incontestavelmente, a melhor estratégia para a preservação da diversidade biológica, pelo fato de permitir a continuação dos processos evolucionários naturais. Existem várias espécies que ainda não foram nomeadas nem descritas em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Somente a conservação *in situ* permitirá que se conheça mais dessas espécies para que seja possível desenvolver estratégias de conservação para elas. A conservação *in situ* pode-se apresentar ineficiente em casos de populações reduzidas ou quando a maioria de indivíduos remanescentes está localizada em áreas desprotegidas. Existem grupos animais que possuem um menor número de espécies e, além disso, para garantir sua sobrevivência, necessitam de espaço, por exemplo, grandes vertebrados. Sendo assim, é provável que as estratégias de conservação *ex situ* sejam a única alternativa para evitar a extinção desses animais (WILSON, 1997; PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

A conservação *ex situ* diz respeito a estratégias de conservação que são efetuadas fora dos ambientes naturais (SANTOS, 2000). Para os animais, a conservação *ex situ*

inclui bancos de germoplasma, zoológicos, criações em cativeiro, fazendas com criação de caça e aquários (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

A conservação *in situ* e *ex situ*, quando integradas, complementam uma à outra, de forma que, quando aliados a programas de reintrodução, indivíduos de populações *ex situ* podem ser soltos em seu habitat natural, para auxiliar a conservação *in situ* (NIJMAN, 2006). Há, também, a possibilidade de se desenvolver pesquisa da biologia de indivíduos viventes em cativeiro, para criação de novas ideias sobre as estratégias de conservação *in situ*. Populações *ex situ* que se reproduzem sem maiores dificuldades possibilitam que se evite a retirada de indivíduos selvagens de seu habitat para a pesquisa ou para serem colocados como vitrine. Quando estão à mostra, esses animais em cativeiro podem ser um instrumento de conscientização sobre a importância da conservação de espécies *in situ* e *ex situ* (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

A conservação *ex situ* por meio dos bancos de germoplasma, aparece como alternativa imediata de conservação de material genético em potencial (WILSON, 1997; Hiemstra et al., 2005). Os bancos podem ser abastecidos de germoplasma de populações com pequeno ou com um grande número de indivíduos (permitindo a variabilidade). Esse material poderá ser usado posteriormente, para auxiliar no aumento populacional se necessário. Quando a população está em pequeno número, para aumentar sua variabilidade genética, podem ser utilizados germoplasmas de indivíduos de outras regiões (WILSON, 1997). Em casos extremos, há, ainda, a possibilidade do uso das células somáticas para multiplicação de indivíduos pelo processo de clonagem (TROUNSON, 1998; RYDER, 2002).

O material genético de qualquer animal pode ser perdido a qualquer momento por morte animal, representando uma redução em seu patrimônio genético (pool gênico) e possivelmente uma perda de genes importantes para a espécie. Nesse caso, esforços

podem ser realizados por meio de utilização das técnicas de reprodução assistida para evitar perda total desse material genético de importância. Vários são os fatores de ameaça incidentes sobre o *Cerdocyon thous*. A descaracterização dos ambientes uma grande variedade de espécies dos ambientes naturais afetam uma grande variedade de espécies, principalmente àquelas de menor plasticidade que ocupam ambientes específicos, ou ainda aquelas que necessitam de grandes áreas. Assim, mesmo que a espécie em questão não conste na lista das espécies em ameaça de extinção, a preservação deve ser realizada, uma vez que possui a importante função ecológica de atuar como uma espécie reguladora das populações de presas (Martins et al., 2007; Piovezan et al., 2012; Machado et al., 2016).

3.2. Caracterização do Sistema Reprodutor Feminino de Carnívoros

a) Ovários

Os ovários são órgãos pares e situam-se na região sublombar caudalmente aos rins, sendo essa localização variável em diferentes espécies devido a um deslocamento desses órgãos, o que acontece tanto para espécies domésticas como para espécies silvestres. Em felinos e canídeos domésticos e silvestres, os ovários permanecem na região sublombar, caudalmente aos rins; Os ovários possuem um formato elíptico e reniforme e sua constituição se dá através da observação de um corte transversal no qual se encontra internamente uma zona medular, uma parte de tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos, estroma, uma estrutura densa e uma zona parenquimatosa externa. A camada externa é recoberta por uma túnica albugínea, que recobre a camada simples de células da gônada. (SISSON & GROSSMAN, 1995; COLVILLE, 2010; HORST & HANS, 2011; KONIG & LIEBICH, 2011).

b) Tuba Uterina

A tuba uterina é par e apresenta um lúmen bastante estreito e ainda um trajeto bastante sinuoso para a maioria das espécies domésticas e silvestres. Está suspensa por uma camada serosa (mesossalpinge) com formato que se assemelha a um funil (infundíbulo da tuba uterina), cuja função é receber a o ovócito que vai ser liberado no momento da ovulação, uma estrutura com pregas na mucosa e na margem conhecida como fímbrias. As pregas da mucosa vão forma um aspecto radiado e ainda delimitando ao centro o óstio abdominal da tuba uterina, que estabelecerá uma conexão entre a cavidade peritoneal e o meio externo. A fecundação ocorre na ampola uterina, permanecendo por alguns dias e sendo encaminhado pelo estreito e sinuoso segmento da tuba uterina para a extremidade do corno uterino através do óstio uterino da tuba. Canídeos (silvestres e/ou domésticos) apresentam uma papila que representa uma região propícia a armazenar agentes infecciosos. Nas demais espécies a abertura da tuba uterina para os cornos uterinos vai acontecendo gradualmente. (SISSON & GROSSMAN, 1995; Frandson et al., 2005; COLVILLE, 2010; HORST & HANS, 2011).

c) Útero

O útero bicornuado é caracterizado por dois cornos uterinos e um único corpo uterino e um colo uterino (cérvix). Nos carnívoros silvestres e domésticos, os cornos uterinos se estendem na cavidade abdominal alcançando a bolsa ovárica que se encontra localizada, caudalmente aos rins. (COLVILLE, 2010; Dyce et al., 2010; HORST & HANS, 2011).

d) Vagina

É o segmento que representa o órgão copulatório da fêmea que compreende do óstio uterino externo até o óstio uretral externo. As células da mucosa vaginal

modificam-se nas dependências do cio hormonal e são utilizadas como indicadores de cio em canídeos silvestres e domésticos (COLVILLE, 2010; Dyce et al., 2010; HORST & HANS, 2011).

e) Vulva

Constituída pelos lábios vulvares que se unem conjuntamente nos ângulos dorsal e ventral. No angulo dorsal é redondo e no angulo ventral é agudo, sendo esta característica bastante pronunciada em espécies domésticas e silvestres de canídeos e felinos. Também, para a maioria das espécies (silvestres e domésticas), o clítoris está alojado na fossa clitoriana do vestíbulo da vagina, cujo formato pode armazenar agentes infecciosos. (Dyce et al., 2010; HORST & HANS, 2011).

3.3. A importância dos Bancos de Germoplasma Animal

A extinção é um processo lento e natural que deve manter equilíbrio em relação ao número de especiações, mutações e modificações das frequências dos alelos que geram novas espécies. A exploração excessiva do meio ambiente desencadeia a diminuição da biodiversidade, uma vez que a taxa de extinção se torna maior que a especiação. A atual perda de espécies é algo sem precedentes e pode ser irreversível (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

A criopreservação de germoplasma é uma alternativa que diminui as limitações impostas pelo tempo e pela distância para a conservação de diversas espécies silvestres em risco de extinção (LOKUSTOFF, 1998). Com a criopreservação de Germoplasma em botijões de nitrogênio líquido a -196º C, o material biológico mantém quase as mesmas características após o descongelamento (SANTOS, 2000).

Estratégias de preservação que utilizam a criopreservação têm grande potencial para ajudar a manter e proteger espécies raras e ameaçadas, especialmente para auxiliar gerenciamento ou “resgate” dos genomas de indivíduos geneticamente valiosos. No entanto, as aplicações em larga escala ainda são limitadas, em decorrência de variações fisiológicas significativas entre as espécies, bem como a ausência de conhecimentos fundamentais sobre as características reprodutivas básicas (COMIZZOLI & HOLT, 2014). Bancos de recursos genéticos são repositórios de germoplasma (gametas, embriões, produtos sanguíneos, tecidos e DNA) para programas de conservação definidos, os quais são ligados diretamente com as biotecnologias para a execução do objetivo final, que é a reprodução animal. Uma possibilidade para preservar o germoplasma de animais silvestres é o isolamento, cultivo e criopreservação de células somáticas como: testiculares, foliculares e fibroblastos, podendo servir para caracterizações moleculares e também para a multiplicação animal pela técnica de transferência de núcleos (clonagem) (HOLT & COMIZZOLI, 2014).

Bancos de germoplasma devem preferencialmente, conter material genético com variabilidade relativamente grande, para que as populações em que esse germoplasma será utilizado não sofram limitações genéticas. Existem bancos de germoplasma em vários zoológicos, universidades, organizações de animais de criação, instituições de pesquisa e laboratórios de vida silvestre. Todavia, eles são, geralmente, pouco utilizados, por conta das instalações normalmente rudimentares (TROUNSON, 1998).

Independentemente do risco de extinção, a conservação deve ser realizada não só pelo direito de que os animais têm de existir, mas também pelas aplicações possíveis em atividades humanitárias. Espécies de plantas e animais que podem ser úteis no futuro estão sendo perdidas antes que seja comprovada tal serventia para os seres

humanos (WILSON, 1997). Dessa forma, fica clara a relevância da criação e/ou enriquecimento de um banco de germoplasma, como o realizado nesta tese de doutorado, a partir do cultivo de células (fibroblastos), servindo as células cultivadas e criopreservadas como uma importante fonte para pesquisas que visam elucidar e contribuir para a conservação desta espécie pertencente aos biomas brasileiros.

4.Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Realizar o estudo morfológico através de parâmetros histológicos do sistema reprodutor feminino do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), bem como do enriquecimento de banco de germoplasma animal para a criopreservação do patrimônio genético, auxiliares na reprodução deste canídeo silvestre.

4.2. Objetivos específicos

- Estudar descritivamente o sistema reprodutor feminino do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*);
- Estudar anatomicamente a conformação e posição do aparelho genital feminino e sua caracterização através de estudo morfológico e ultraestrutural;
- Obter e cultivar células (fibroblastos) da espécie *Cerdocyon thous* para o enriquecimento de banco de germoplasma animal, tendo como objetivo a preservação do seu patrimônio genético, onde a utilização deste material será empregada em pesquisas futuras sobre reprodução e preservação desta espécie.

5. ***Materiais e Métodos***

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5. 1 Procedência dos Animais

A obtenção de material biológico desta pesquisa encontrou-se de acordo com os princípios adotados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), sob aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP – FZEA) n° 14.1.1465.74.6 e SISBIO n° 47183-1.

5.2 Descrição morfológica do sistema reprodutor feminino

Sistemas reprodutores de fêmeas de *Cerdocyon thous* (n=2) foram analisados macroscopicamente e fragmentos de cada órgão do sistema reprodutor feminino foram seccionados para posteriores análises microscópicas através das seguintes técnicas histológicas: Hematoxilina-Eosina, Tricromo de Massom, Reativo de Shiff (PAS) e Alcian Blue.

5.3 Análise microscópica pela técnica histológica

O estudo do sistema reprodutor feminino de espécimes de *Cerdocyon thous* foi realizado através da dissecação, secção em pequenos fragmentos e fixação em solução de paraformoldeído a 4%, posteriormente submetidos à técnica histológica, desidratação em EtOH com concentrações crescentes (de 70, 80, 90 e 99%), diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica corados com Hematoxilina-Eosina (HE), Tricromo de Masson; PAS (Reativo de Shiff) e Alcian Blue (TOLOSA et al., 2003). Os dados histológicos foram interpretados conforme os parâmetros descritos por BANKS (1992), BACHA & WHERNER (2003).

5.4 Microscopia eletrônica de varredura

Pequenos fragmentos do sistema reprodutor feminino de *Cerdocyon thous* foram utilizados, os quais foram submersos em glutaraldeído a 2,5% com tampão de fosfato para a fixação. Após 48h de fixação, o material coletado foi lavado três vezes em tampão fosfato 0,1M com pH 7, 4, por 10 minutos. Após 30 minutos de fixação, o material foi submetido à técnica de pós-fixação com tetróxido de ósmio por 2 horas girando no escuro a 45º. O material foi lavado novamente com tampão fosfato a 0,1 molar com pH de 7,4 por 10 min. Para desidratar foi utilizada, uma série crescente de EtOH (de 70 a 100%) por 15 minutos cada e EtOH 99% por 15 minutos, repetido por quatro vezes. A total remoção do EtOH e secagem foi realizada em um equipamento CPD 020 – BALZERS - UNION, para posterior metalização com ouro.

Na última etapa do processo o material foi colocado em *"stubs"* de alumínio contendo cola de carbono para a fixação das peças em estufa para secagem por 12 horas. Com o material fixado, este foi colocado no metalizador (EMITECH – K 550) para o banho de ouro, sendo esta a última etapa do protocolo. Todo o material metalizado em ouro seguiu para análise em microscópio eletrônico de varredura (LEO – 435 VP).

5.5 Procedimentos para coleta de material biológico

A coleta foi realizada no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do município de Jundiaí – SP no dia 27 de janeiro de 2016, mediante apresentação e aceite do projeto de pesquisa e documento comprobatório de aprovação do Comitê de Ética e autorização junto ao SISBIO. Assim, no intuito de se garantir a segurança na obtenção das células cultivadas (fibroblastos), optou-se pela adoção de procedimentos apenas em animais de cativeiro, descartando a utilização de tecidos de animais mortos para esta finalidade. A coleta de tecido epitelial foi realizada por equipe Médica

Veterinária da Associação Mata Ciliar - CETAS, devidamente licenciada junto ao órgão competente (CRMV- Conselho Regional de Medicina Veterinária).

5.5.1 Coleta e transporte de biópsias de pele

O procedimento de coleta de amostras epiteliais para posterior cultivo celular (fibroblastos) foi realizada em animais de cativeiro, considerados saudáveis, disponibilizados em parceria estabelecida com a Associação Mata Ciliar (CETAS) no município de Jundiaí – SP conforme descrito acima (Figura 11).

5.5.2 Isolamento e cultivo das células fibroblásticas de *Cerdocyon thous*

Para o isolamento e cultivo dos fibroblastos, foram utilizadas amostras de tecido epitelial de cinco espécimes de *Cerdocyon thous* (3 machos e 2 fêmeas). As amostras teciduais foram submetidas à fragmentação mecânica em placas de Petri (100 x 20mm) estéreis (TPP, Suíça) e os fragmentos transferidos para tubos de Falcon para digestão em colagenase em estufa a 5% de CO_2 e 38,5ºC e observados a cada 15 minutos. Após a digestão, os fragmentos foram transferidos para placas de cultivo com dimensões de 100 x 20mm (Macho 1, Macho 2 e Macho 3) e 60 x 15mm (Fêmea 1 e Fêmea 2), de acordo com o tamanho do fragmento coletado. As células foram cultivadas em meio αMEM (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Hyclone, Logan, Utah, EUA), 1% estreptomicina/penicilina (Sigma-Aldrich@) e 1µl por ml de βFGF (PeproTech Inc., USA) a 5% de CO_2 e 38,5ºC, após verificarmos ser esta a melhor composição de meio para o cultivo a ser empregado (Tabela 3).

Tabela 3. Composição dos diferentes meios de cultivo empregados para desenvolvimento de fibroblastos de *Cerdocyon thous*.

Days	Board	Culture medium	%
	Male 1 (M1)	DMEM/F12 (GIBCO@)	87
	Male 2 (M2)	SFB (FBS@)	10
1° - 6°	Male 3 (M3)	Penicilin/Streptomycin (Sigma-Aldrich@)	1
	Female 1 (F1)	Glutamine	1
	Female 2 (F2)	Aminoacid no essential	1
		DMEM/F12 (GIBCO@)	77
		SFB (FBS@)	20
7° - 18°	Male 3 (M3)	Penicilin/Streptomycin (Sigma-Aldrich@)	1
		Glutamine	1
		Aminoacid no essential	1
	Male 1 (M1)	DMEM/F12 (GIBCO@)	87
	Male 2 (M2)	SFB (FBS@)	10
7° - 26°	Female 1 (F1)	Penicilin/Streptomycin (Sigma-Aldrich@)	1
	Female 2 (F2)	Glutamine	1
		Aminoacid no essential	1
		βFGF (PreproTech@)	*

**Added each culture Exchange - 1µl/ml culture medium)*

5.5.3 Curva de Crescimento

Também foi realizada a curva de crescimento celular, para avaliar a capacidade clonogênica, por quantificação direta do cultivo por contagem celular. O plaqueamento foi realizado em uma densidade $3x10^4$ em placa (Macho 1). Em cada repique, foi plaqueado igual número de células ($3x10^4$) em um volume determinado com a seguinte fórmula abaixo:

$$\frac{Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4}{4} \quad X\ 10^4 \quad X \quad \textit{fator de diluição*} = \textit{n° de células / ml}$$

Fator de diluição = 1 ml

5.5.4 Criopreservação de fibroblastos de *Cerdocyon thous*

Para a criopreservação as células foram tripsinizadas por 5 minutos e inativadas com meio de cultivo αMEM (Gibco@) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 1µl por ml de βFGF (PeproTech@) as células foram transferidas para tubos de Falcon com capacidade de 15ml, centrifugadas a 1.500 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante formado foi retirado e o "pellet" ressuspendido em meio para congelamento, composto por 45% de αMEM (Gibco@) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 1µl por ml de βFGF (PeproTech@), 10% DMSO (Synth@, Brasil) e 45% de soro fetal bovino previamente preparado e distribuído em criotubos. Os criotubos permaneceram alocados em dispositivos próprios para congelamento (*Mr.Frosty*), no qual permite o congelamento de -1ºC por minuto e armazenadas em freezer (-80ºC) "overnight". Por fim, as células foram imersas em nitrogênio líquido, onde permanecerão armazenadas por tempo indeterminado, até o seu devido uso, nas passagens P0 a P3.

5.5.5 Procedimentos de descongelamento e cultivo das células (fibroblastos)

As células cultivadas e criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas para realização da curva de crescimento celular. Foi necessária a utilização banho-maria a 38°C e retirada do criotubo do nitrogênio líquido, mantendo por 30s na água aquecida. Logo após, fez-se a transferência do conteúdo para o tubo de Falcon com 15 ml com meio de cultivo αMEM (Gibco@) suplementado com soro fetal bovino, antibioticos e βFGF (PeproTech@) e homogenizado seguido de centrifugação por 5 minutos a 1500 r.p.m., onde o sobrenadante foi desprezado e o "*pellet*" reconstituído com 1 ml de meio de cultivo. Logo após o processo de reconstrução do

"*pellet",* o conteúdo foi transferido para placas de cultivo contendo 3ml de meio cultivo e mantidas em condições de cultivo a 5% de CO_2 em ambiente a 38,5ºC.

6.Resultados

6. RESULTADOS

6.1 Estudos macroscópicos e análise por técnica histológica

Duas fêmeas de *Cerdocyon thous* foram encontradas evisceradas (um dos espécimes em avançado estágio de decomposição) em períodos distintos, compreendendo os meses de janeiro a julho de 2015. Ambas vieram a óbito por atropelamento no Km 215 da Rodovia Anhanguera (050), no município de Pirassununga – SP (Figura 2).

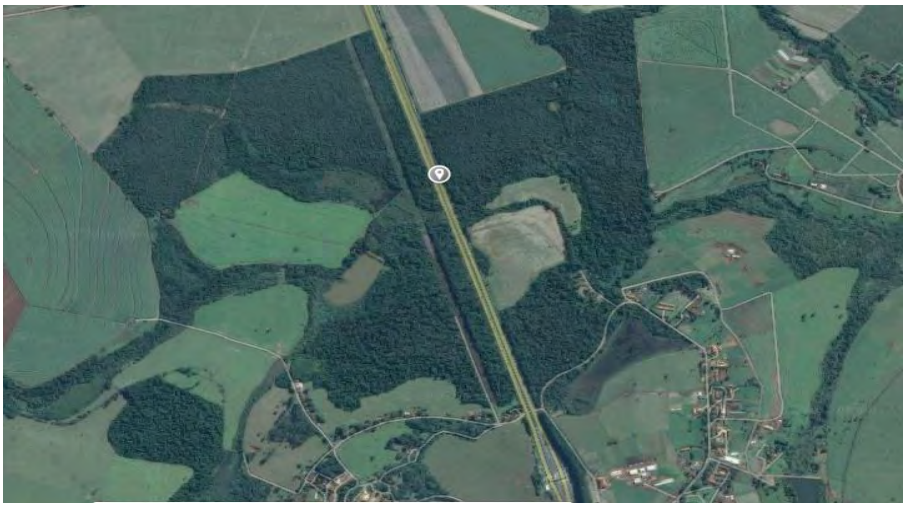


Figura 2. Localização dos espécimes de *Cerdocyon thous* vítimas de atropelamento na Rodovia Anhanguera (050). Fonte: Google Maps, 2016.

Através de estudo biométrico, constatou-se que as fêmeas encontradas eram adultas, com tamanho aproximado entre 80 e 90 cm (medida compreendida da cabeça até a cauda) e altura dos espécimes variando entre 27 e 30 cm (Figura 3). Os espécimes tiveram seus sistemas reprodutores dissecados e analisados macroscopicamente (Figura 4).

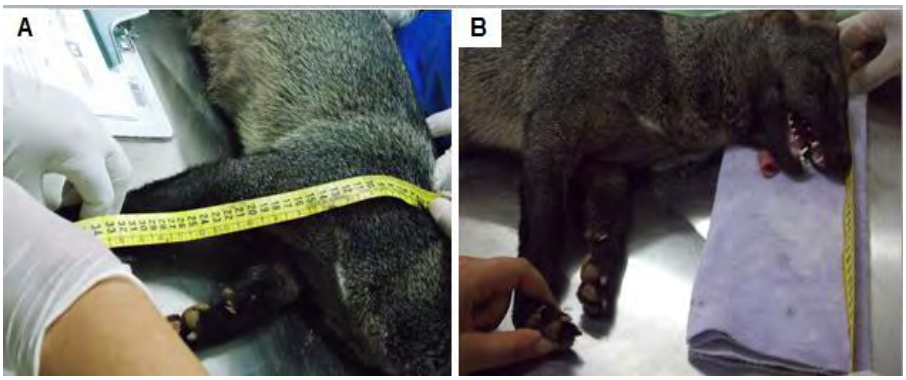


Figura 3. Análise biométrica em *Cerdocyon thous*. Fonte: MACHADO, 2014.

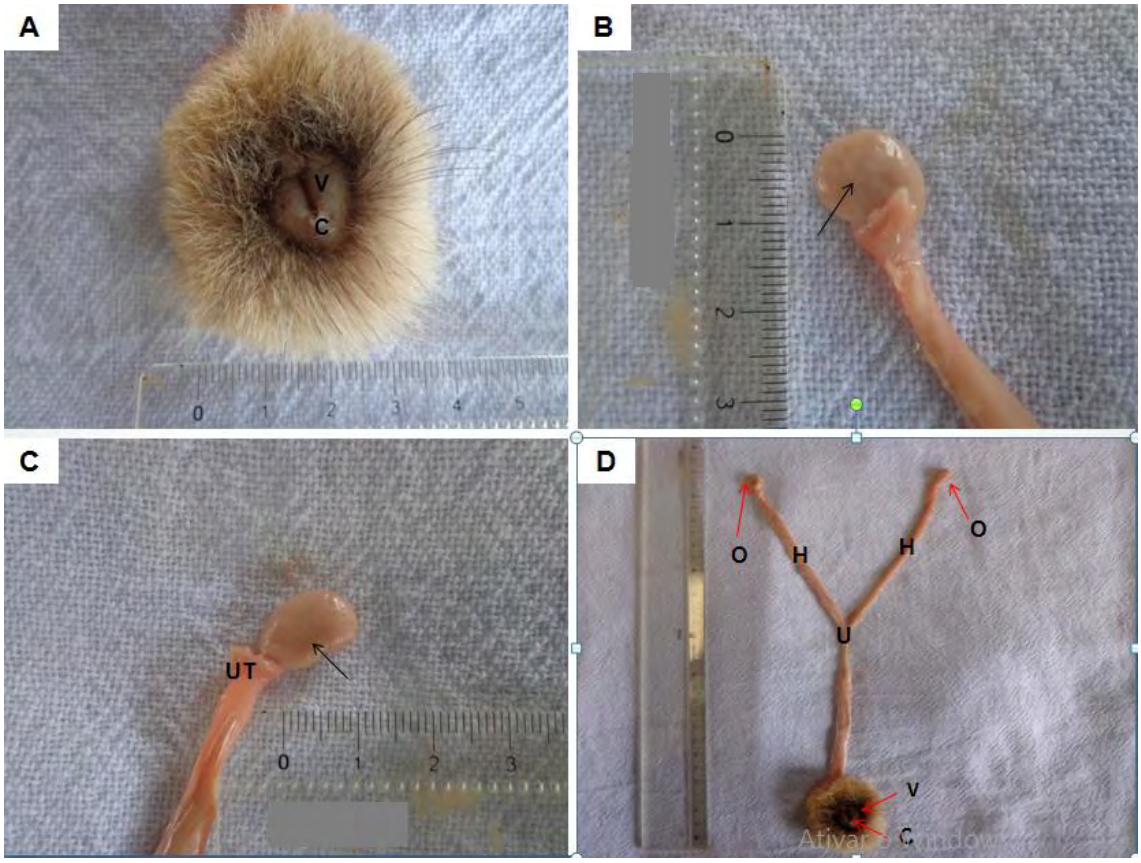


Figura 4. Fotografia do sistema reprodutor feminino de *Cerdocyon thous:* A) Vulva (V) e clitóris (C); B) Ovário esquerdo (seta); C) Ovário direito (seta); D) Sistema reprodutor completo: ovários direito e esquerdo (setas), cornos uterinos (H), corpo do útero (U), vulva (V) e clítoris (C). Fonte: MACHADO, 2014.

O estudo macroscópico do sistema reprodutor feminino de *Cerdocyon thous* permitiu uma análise visual da conformação morfológica e posicionamento dos órgãos desta espécie (Figura 4).

Posteriormente ao estudo macroscópico, as estruturas foram seccionadas para análise microscópica por técnica histológica (Hematoxilina-Eosina, Tricromo de Masson, PAS e Alcian Blue) e microscopia eletrônica de varredura, conforme descritos a seguir.

A) Ovários

Os ovários (direito e esquerdo) estão situados na cavidade abdominal, mais especificamente localizados na região sublombar, em contato direto com os intestinos, próximos dos rins e são sustentados pelos ligamentos largos e vasos sanguíneos (construído por uma veia e uma artéria). Apresentam-se consistentes, superfície externa lisa, com 1 cm de comprimento e 1 cm de largura e aspecto similar ao de um grão de feijão. Visualmente, não foram constatadas diferenças (no que diz respeito aos aspectos morfológicos) entre os ovários direito e esquerdo (Figura 4A).

Microscopicamente, foi observado que os ovários apresentavam folículos primordiais formados por um ovócito e por células foliculares achatadas, bem como a presença de folículo primário unilaminar, este último constituído por um ovócito envolvido por uma camada de células foliculares cubóides, também denominadas células da granulosa (Figura 5C), em aumento de 10 e 40x (20µm). A análise por microscopia eletrônica de varredura evidenciou a superfície ovariana, com característica irregular, bem como a presença de folículos ovarianos (Figura 5B e C).

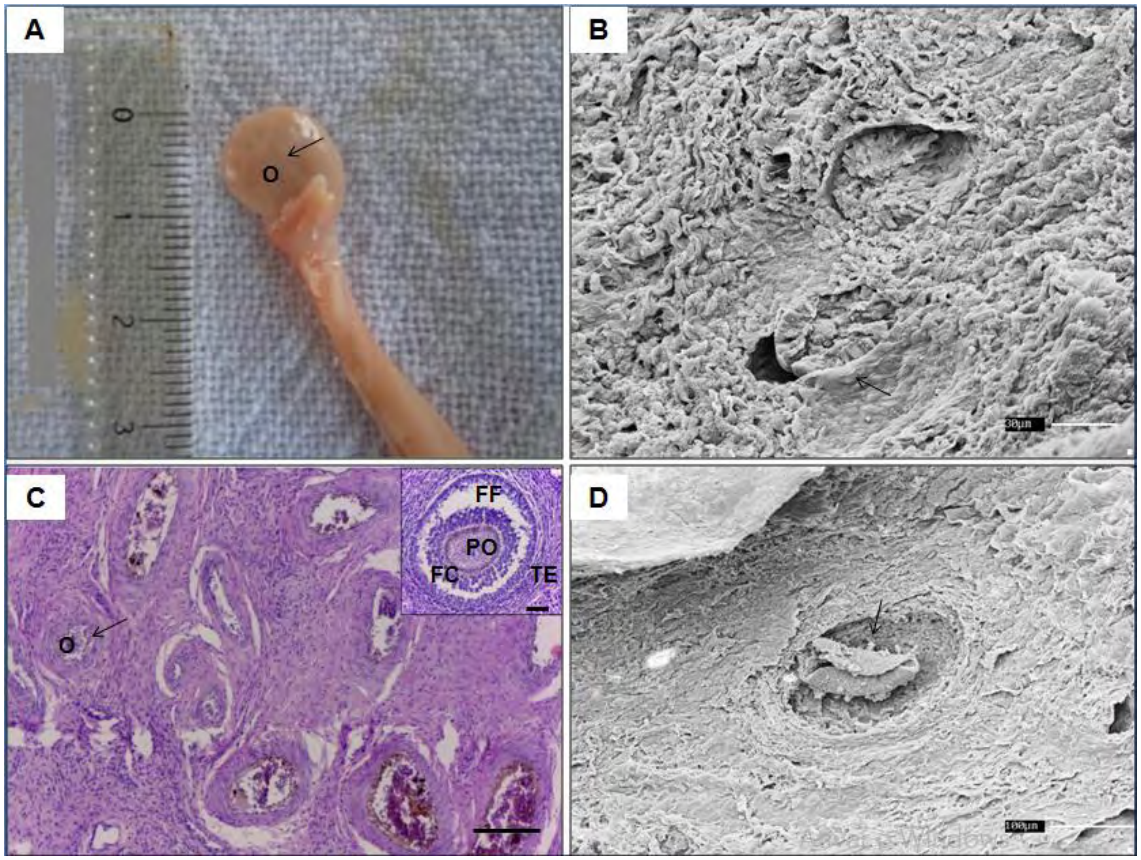


Figura 5. Fotomicrografia do ovário de *Cerdocyon thous*: A) Macroscopia do ovário (seta); B e D: microscopia eletrônica de varredura evidenciando folículos ovarianos (seta), nos aumentos de 30 e 100µm; C) Análise microscópica por técnica histológica (PAS e HE): Ovócito (O), ovócito primário (PO), células da Teca externa (TE), líquido folicular (FF), célula folicular (FC); Folículo contendo um ovócito envolvido por um conjunto de células da granulosa. O folículo apresenta-se envolvido por uma teca. Aumentos de 10 e 40x (20µm).

B) Tuba uterina

As tubas uterinas (direita e esquerda) realizam a comunicação entre os ovários e o útero. São tubos musculares de grande mobilidade, apresentando nos espécimes de *Cerdocyon thous* comprimento variando entre 5 a 8 cm de comprimento, sendo uma de suas extremidades com sutil abertura na cavidade peritoneal próximo ao ovário (infundíbulo) com prolongamentos em forma de franja (fímbrias), e um canal flexuoso que se abre no interior no útero (extremidade intramural) (Figura 6A).

Microscopicamente, foi verificado que o epitélio de revestimento das tubas uterinas é constituído de células ciliadas e células secretoras não ciliadas (Figura 6D), característica que está relacionada à função de contribuírem para o transporte do ovócito ou zigoto até o útero. Através de análise por microscopia eletrônica de varredura, é possível verificar que parte da parede da tuba uterina apresentou uma mucosa intensamente "pregueada", sendo este um indicativo de ser esta uma região próxima ao ovário (Figura 6B).

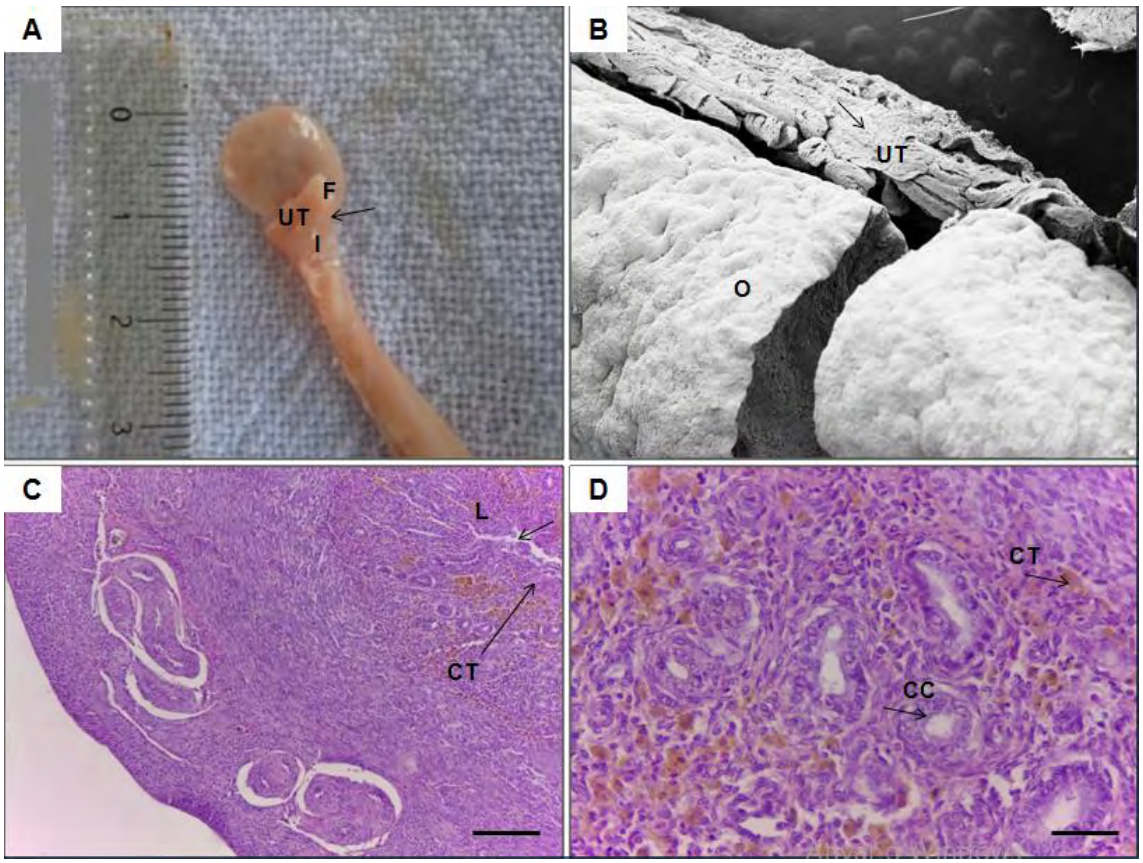


Figura 6. Fotomicrografia da tuba uterina de *Cerdocyon thous*. A) Visão macroscópica (seta): Tuba uterina (UT), Fímbrias (F) e infundíbulo da tuba uterina (I); B) Análise por microscopia eletrônica de varredura indicando a tuba uterina (seta), em região próxima ao ovário (O); C e D: Análise microscópica por técnica histológica (HE): Luz da tuba uterina (seta), presença de tecido conjuntivo (CT) e seta indicando células ciliadas (CC), nos aumentos de 10 e 40x (20µm).

C) Útero

É formado pela cérvix, corpo do útero e cornos uterinos (direito e esquerdo), conforme pode ser observado na Figura 7A. Com conformação cilíndrica, o útero na espécie *Cerdocyon thous* apresenta aproximadamente 3 cm de comprimento. Os cornos uterinos em número de dois são relativamente compridos e estreitos em relação ao corpo do útero, com tamanho variável (de 9 a 11 cm de comprimento), sendo esta uma característica presente nos carnívoros, os quais se estendem pela cavidade abdominal alcançando a bolsa ovárica (Figura 8A, B, C e D).

Microscopicamente, o útero apresenta uma parede relativamente espessa e, externamente uma camada serosa, constituída de mesotélio e tecido conjuntivo e, dependendo da porção do órgão (adventícia), constituída de tecido conjuntivo sem revestimento de mesotélio, bem como uma espessa camada de músculo liso (miométrio) e mucosa uterina (miométrio) (Figuras 7 e 8).

D) Cérvix

A cérvix é a região intermediária, como um canal em forma de anel único que realiza a comunicação entre o útero (cranialmente) e a vagina (caudalmente) (Figura 7C), tendo início no óstio uterino interno, finalizando no óstio uterino externo. Microscopicamente, a cérvix se apresenta com poucas fibras de músculo liso, sendo a porção que faz saliência no lúmen da vagina revestida por um epitélio pavimentoso estratificado. Apresenta também um epitélio colunar simples, com células das glândulas mucosas responsável pela proliferação de muco, especialmente durante o período de fertilidade.

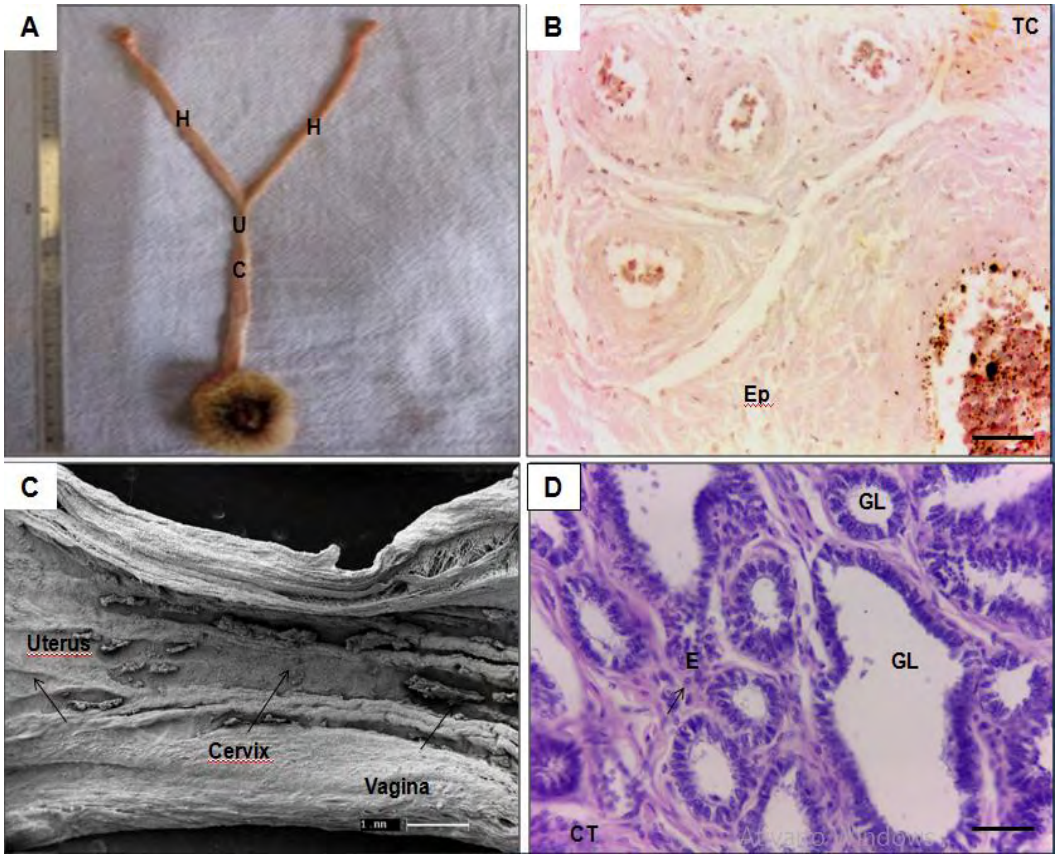


Figura 7. Fotomicrografia do útero de *Cerdocyon thous*. A) Análise macroscópica: Cornos uterinos (representado pelas letras C), Corpo do útero (U) e cérvix (C); B e D) Análise microscópica pela técnica histológica (HE e Tricromo de Massom): Tecido conjuntivo (CT), epitélio simples (Ep), endométrio (E) e glândula retilínea em um endométrio em sua fase proliferativa (Gl), no aumento de 40x (20µm). C) Na análise por microscopia eletrônica de varredura, observa-se a transição entre útero, cérvix e vagina, onde se evidencia a superfície luminal ilustrando a disposição dobrada do endométrio. Visualmente, a cérvix se apresenta com poucas fibras de músculo liso e a porção que faz saliência no lúmen da vagina é revestida por epitélio pavimentoso estratificado. Aumento de 1mm.

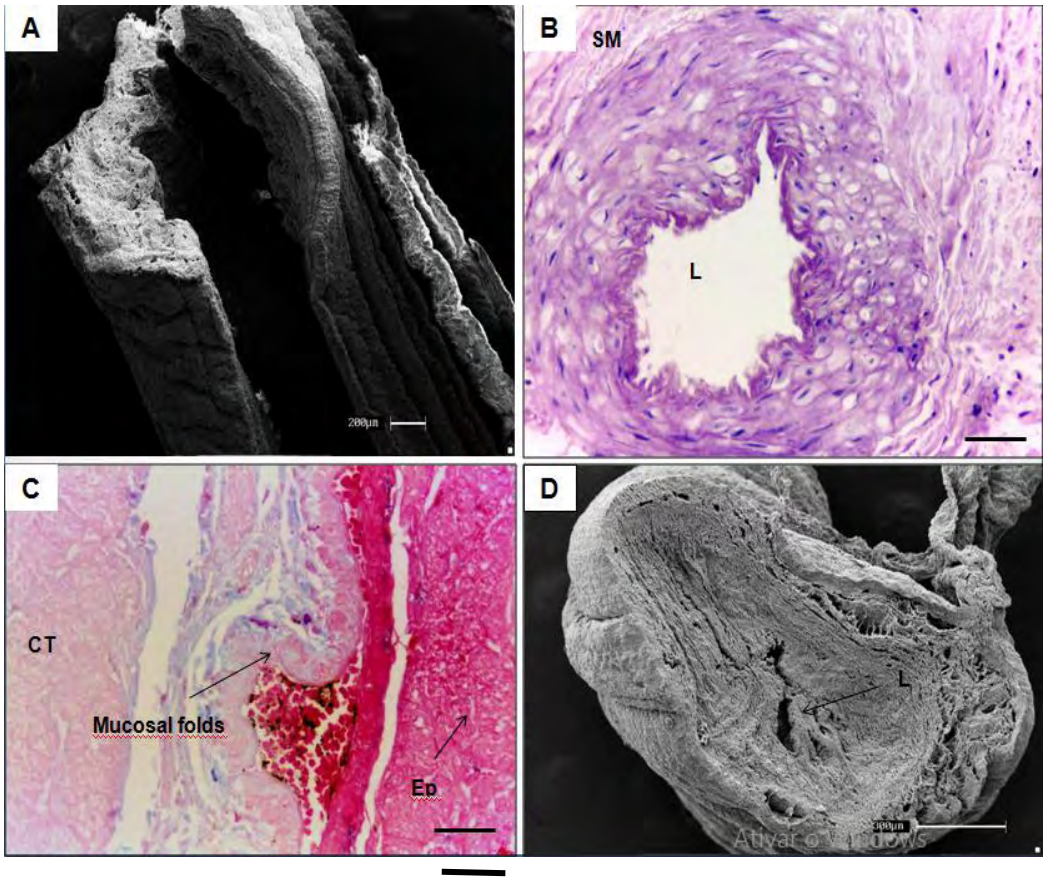


Figura 8. Fotomicrografia dos cornos uterinos de *Cerdocyon thous*. A e D) Análise por microscopia eletrônica de varredura dos cornos uterinos em cortes longitudinal e transversal, onde é possível verificar uma parede espessa constituída de músculo liso e sua estreita abertura (luz) e, mais externamente, tecido conjuntivo denso, nos aumentos de 200 e 300µm; B e C) Análise microscópica pela técnica histológica (Alcian Blue e PAS): Músculo liso (SM), luz (L), tecido conjuntivo (CT), dobras da mucosa e epitélio (Ep), ambos indicados por seta, nos aumentos de 10 e 40x (20µm).

E) Vagina

Constituída de fibras musculares potentes de forma circular, relativamente alongadas e forrada internamente por membrana mucosa formando pregas longitudinais. Microscopicamente, observou-se um epitélio pavimentoso estratificado, sobre um tecido conjuntivo denso, com citoplasma das células epiteliais visualizados com coloração clara, em decorrência da grande quantidade de glicogênio depositado no lúmen da vagina quando as células do epitélio vaginal sofrem descamação. Isto acontece porque as bactérias presentes na vagina metabolizam o glicogênio e produzem

ácido lático, acidificando o pH vaginal, o que contribui como agente protetor contra alguns patógenos (Figura 9).

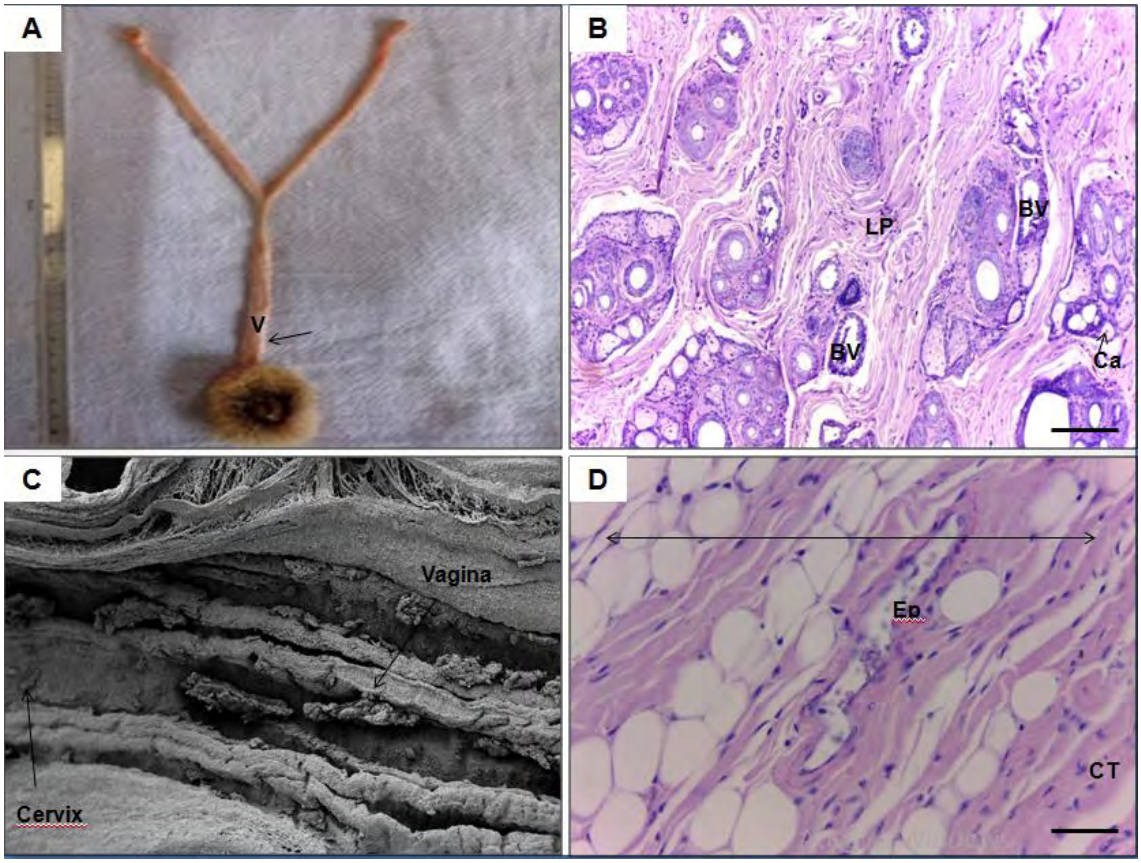


Figura 9. Fotomicrografia da vagina de *Cerdocyon thous*. A) Análise macroscópica: Porção onde se situa a vagina internamente (seta); B e D: Análise microscópica pela técnica histológica (PAS e HE): Vasos sanguíneos (BV), lâmina própria (LP), capilar (Ca), tecido conjuntivo (CT) e epitélio (Ep); C) Análise por microscopia eletrônica de varredura: Na imagem é observada a região de transição entre a cérvix e a vagina, onde se evidencia a lâmina própria da mucosa vaginal, constituída por um tecido conjuntivo frouxo. A seta indica a presença de secreção mucosa, sendo este um indicativo de que o animal se apresentava em fase reprodutiva. Mais externamente, observa-se que a parede da vagina é densa, constituída por uma camada muscular composta de fibras musculares lisas. Aumento de 1 mm.

F) Vulva e Clítoris

A vulva apresentou-se com lábios externos grossos formando uma comissura inferior aguda, o clitóris, medindo entre 2 a 3 cm de comprimento, relativamente pronunciado para a espécie. Microscopicamente, o clitóris é coberto por um epitélio

pavimentoso estratificado, com uma delgada camada de células queratinizadas na superfície (Figura 10).

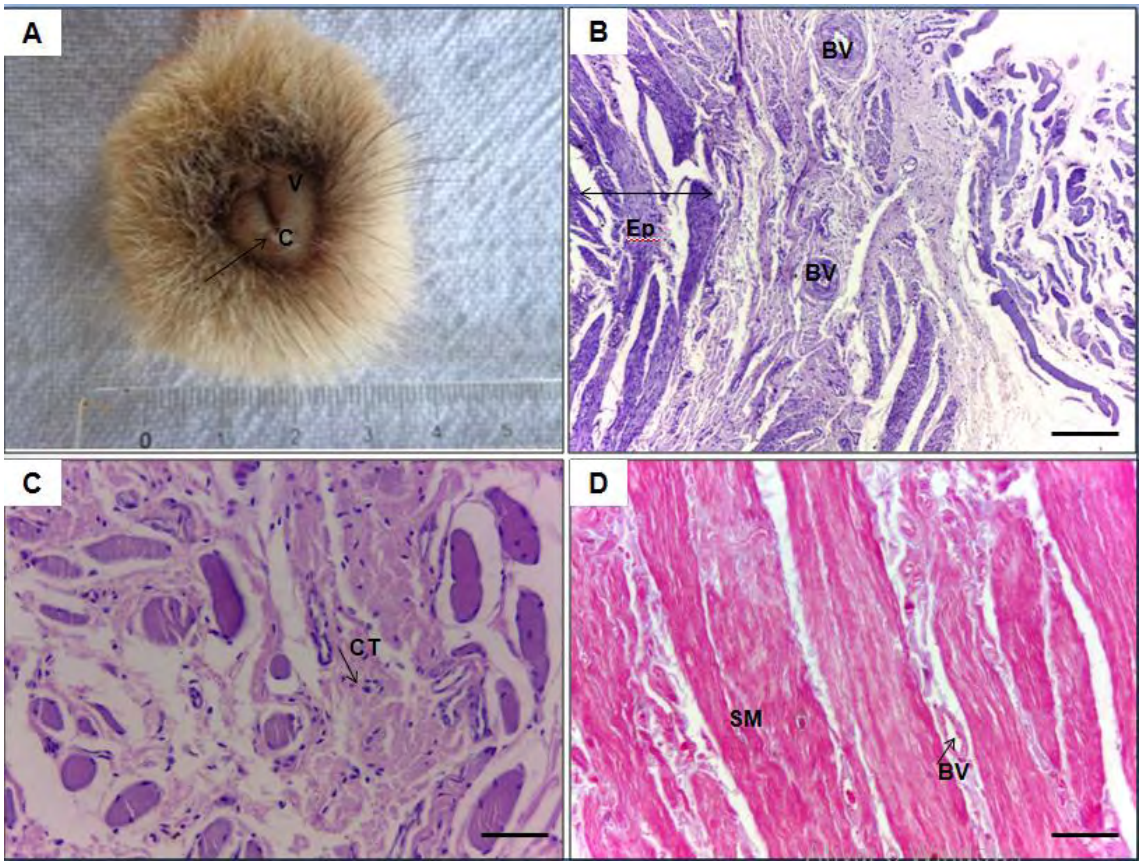


Figura 10. Fotomicrografia da vulva de *Cerdocyon thous.* A) Análise macroscópica: Vulva (V) e clitóris (C), muito evidentes, onde os lábios maiores são preenchidos por uma densa camada de tecido adiposo; B, C e D) Análise microscópica pela técnica histológica (HE, PAS e Alcian Blue): Epitélio (Ep), vasos sanguíneos (BV), tecido conjuntivo (CT), músculo liso (SM), nos aumentos de 10 e 40x (20µm).

Através das imagens obtidas em diferentes aumentos e por diferentes técnicas, também foi possível observar que as fotomicrografias expressaram histologicamente, as diferentes organizações celulares e teciduais dos órgãos que compõem o sistema reprodutor feminino, observadas nas Figuras 5 a 10.

6.2 Cultivo celular para constituição ou enriquecimento de banco de germoplasma *(Cerdocyon thous)*

6.2.1 Obtenção das amostras teciduais (Epitélio)

Foi realizada a contenção física de cinco espécimes de *Cerdocyon thous* (três machos e duas fêmeas), mantidos em jejum por 12 horas pela equipe Médica Veterinária do empreendimento (Associação Mata Ciliar - Jundiaí/SP) (Figura 11).

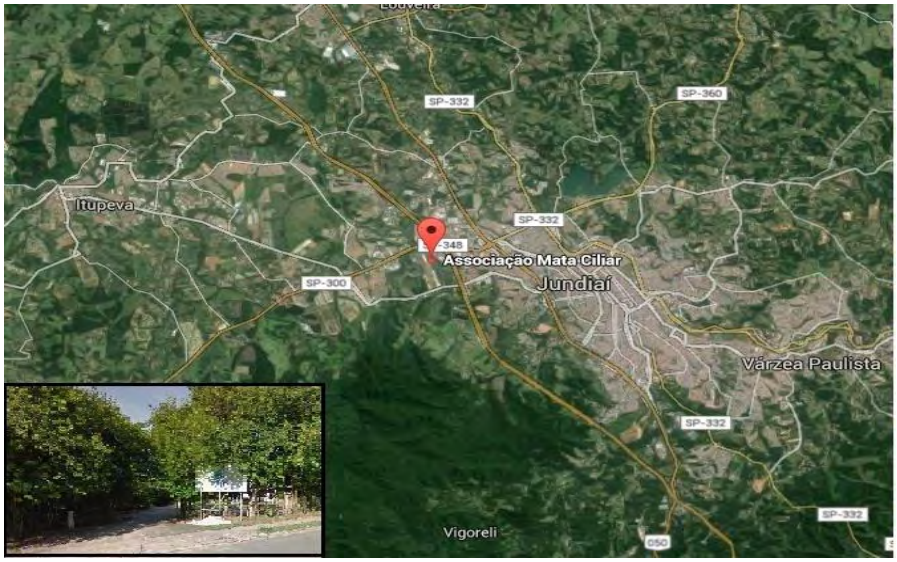


Figura 11. Localização espacial da Associação Mata Ciliar (Jundiaí – SP). Fonte: Google Maps, 2016.

Com o auxílio de um puçá, os animais foram capturados no recinto e imobilizados com auxílio de escudo. Em seguida, realizou-se o protocolo de contenção química, com injeção intramuscular dos fármacos: tiletaminazolazepan (7mg/kg); cetamina e xilazina (12 e 1mg/kg); cetamina, xilazina e atropina (12, 1,0 e 0,04mg/kg); cetamina e midazolam (12 e 0,5mg/kg) e cetamina e acepromazina (12 e 0,1mg/kg). Foram preparados três dardos, para o caso dos primeiros disparos não acertarem a musculatura do animal (Figura 12).

Figura 12. Contenção dos espécimes (*Cerdocyon thous*). Fonte: Machado, 2016.

Em duplas e em intervalos de aproximadamente 50 minutos (tempo médio de realização dos procedimentos), espécimes de *Cerdocyon thous* foram encaminhados ao centro cirúrgico do próprio empreendimento para procedimento simultâneo. Durante todo o tempo da contenção, as frequências respiratória e cardíaca foram monitoradas, assim como a temperatura corporal. Os animais foram pesados em balança digital (Toledo®), e submetidos a estudo biométrico (Figura 13)**.** Os espécimes apresentaram peso variando entre 7 a 9 kg, medindo aproximadamente entre 65 e 80 cm de comprimento.

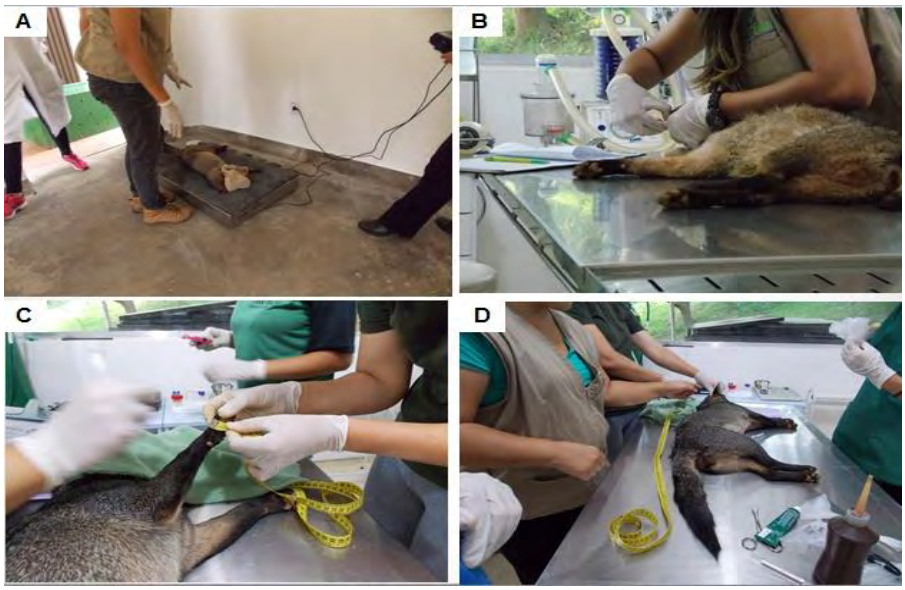


Figura 13. Pesagem, monitoramento e análise biométrica dos espécimes (*Cerdocyon thous*). Fonte: Machado, 2016.

Estabilizada as condições vitais dos animais iniciaram-se os procedimentos para a coleta de tecido epitelial. Antes do procedimento de retirada de amostra tecidual, a área da pele a ser utilizada foi higienizada com escova, água, sabão e EtOH 70%, para realização da tricotomia na área para retirada dos pêlos (Figura 14). Com o auxílio de pinça e bisturi, pequenas amostras teciduais da região da virilha foram retiradas, com dimensões variáveis entre 0,5 a 1,2 cm de diâmetro e posteriormente armazenadas individualmente em tubos de Falcon de 50 ml devidamente identificados, contendo solução PBS e estreptomicina/penicilina e colocados em isopor contendo gelo. O material coletado foi transportado em caixa de isopor contendo gelo e encaminhado para o Laboratório de Terapias Gênicas (cultivo celular) localizado no Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga para início do cultivo celular (fibroblastos) (Figura 15).

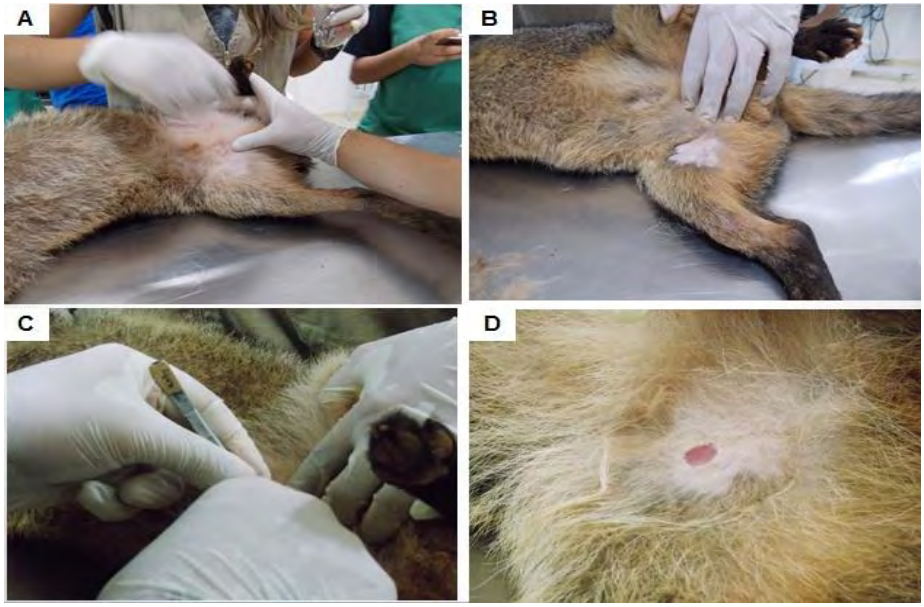


Figura 14. Procedimentos de coleta para obtenção de amostra tecidual. A e B) Tricotomia e higienização local; C e D) Biópsia epitelial. Fonte: Machado, 2016.

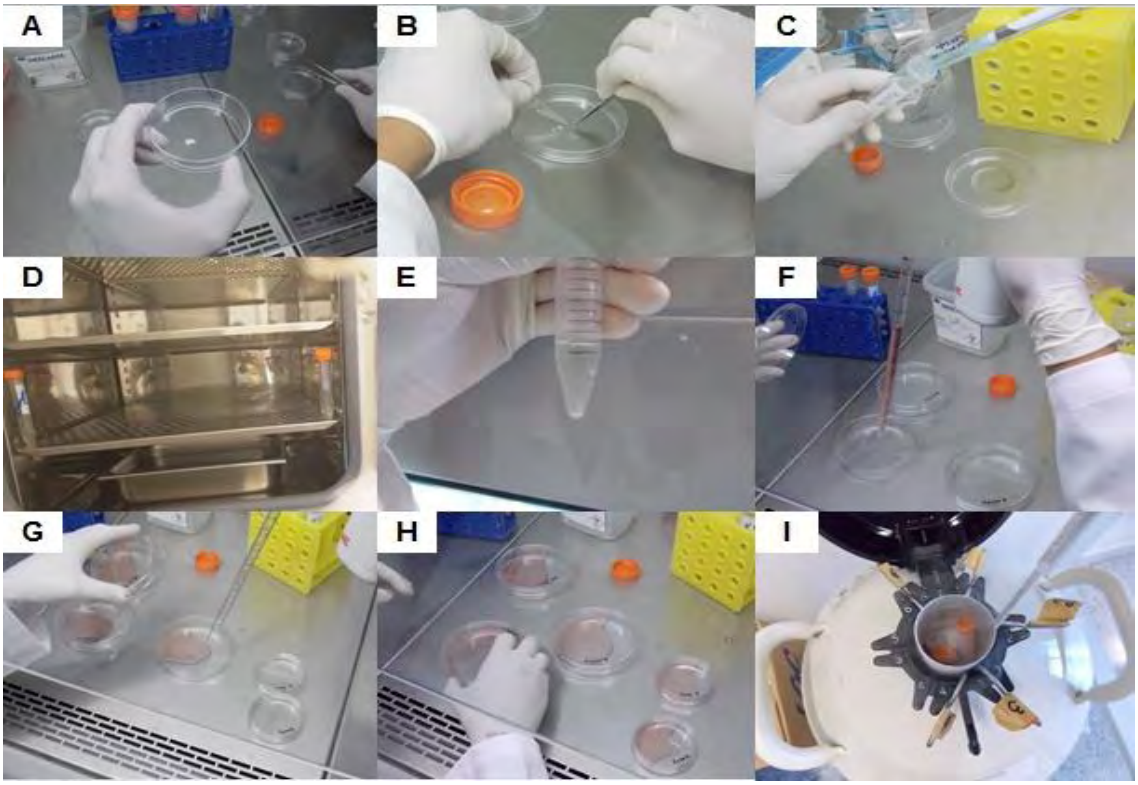


Figura 15. Etapas de cultivo primário (fibroblastos) de *Cerdocyon thous*. A e B) Dilaceração do tecido com bisturi; C e D) Digestão celular (colagenase); E) "*Pellet*" obtido após centrifugação da amostra digerida; F, G e H) Cultivo em placas de Petri (100x20mm/60x12mm); Acondicionamento em criotubos da amostra residual (epiderme) para análises posteriores. Fonte: Machado, 2016.

6.2.2 Cultivo de fibroblastos de *Cerdocyon thous*

Houve necessidade de adequação do protocolo a partir da utilização de meios de cultivo com composições diferentes (Tabela 3), bem como transferência de 1ml de cada placa (Macho 1-M1, Macho 2-M2, Macho 3-M3, Fêmea 1-F1 e Fêmea 2-F2) para placas menores (10 x 35mm), no intuito de aumentar a superfície de contato, uma vez que os fibroblastos demonstravam um crescimento significativamente lento. O meio de cultivo de todas as placas foi trocado parcialmente (50%) a cada três dias. Somente após o 18º dia de cultivo, foi possível observar células aderidas à placa, quando se optou pela utilização de meio de cultivo αMEM (Gibco@), suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina e βFGF (PeproTech@) a partir do 16° dia de cultivo, o que resultou em um crescimento celular favorável (Figura 16).

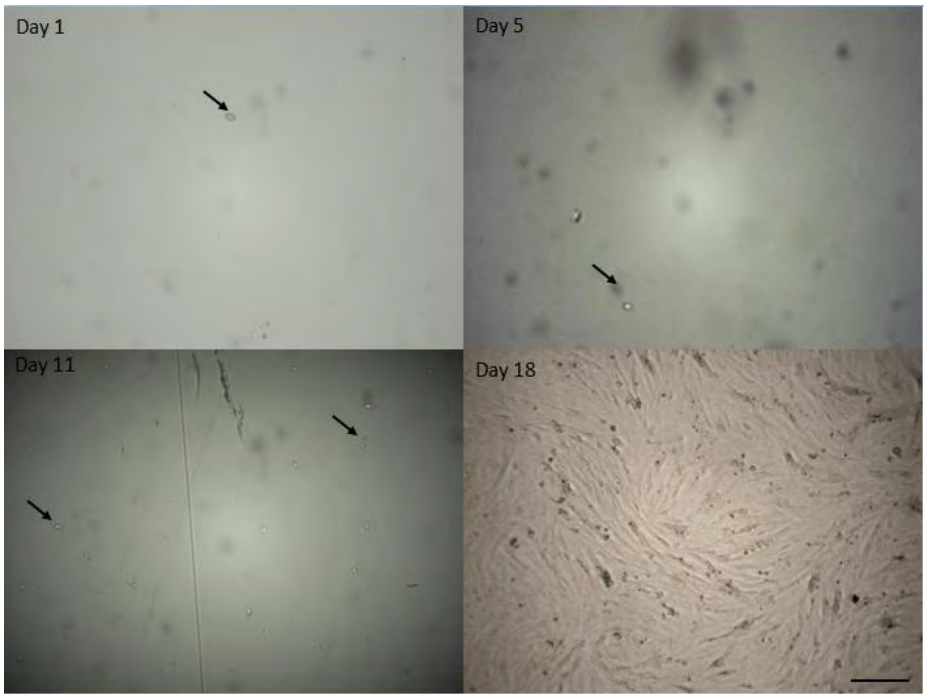


Figura 16. Etapas de desenvolvimento de fibroblastos de *Cerdocyon thous*. Dia 1) A seta aponta para a presença de célula não aderida; Dia 5) A seta aponta para um aglomerado de tecido parcialmente digerido contendo células; Dia 11) Células em início de aderência à placa. Dia 18) Presença de fibroblastos aderidos à placa, no aumento de 20x (100µm).

As placas M1, M2, M3, F1 e F2 (35 x 10mm) foram descartadas no 26º dia de cultivo por não apresentarem desenvolvimento celular, assim como as placas M3 (100mm), F1 e F2 (60mm). A placa Macho 2 (100mm) atingiu confluência de 80% no 33º dia de cultivo, sofrendo tripsinização e contagem celular. Um montante de 260.000 células foram criopreservadas em passagem "P0".

Na placa M1 (100 x 60mm) as células tiveram propagação celular, atingindo confluência de 80% em seu 26º dia de cultivo. A placa também foi trispinizada realizada a contagem celular. Antes da criopreservação, um número de 30.000 células foi plaqueado para realização da cinética de crescimento celular. O restante (220.000 células) foi criopreservado em passagem "P0".

6.2.3 Curva de crescimento celular (pré e pós-criopreservação) de fibroblastos de *Cerdocyon thous*

A curva de crescimento celular foi realizada a fim de se avaliar a capacidade em cultivo e o repique celular, com plaqueamento em uma densidade $3x10^4$ por placa de Petri.

Após estabelecimento do cultivo celular, 30.000 células (fibroblastos) foram cultivados em placa de Petri (60 x 15mm) até atingirem confluência de 80-90%, as células sofreram tripsinização como já descrito em passagens anteriores e seu número total determinado pela contagem celular em câmara de Neubauer. Subsequentemente, igual número de células foi plaqueado ($3x10^4$) em volume determinado com a fórmula anteriormente descrita.

Os resultados obtidos na curva de crescimento celular foram analisados e estão constantes no Gráfico 1.

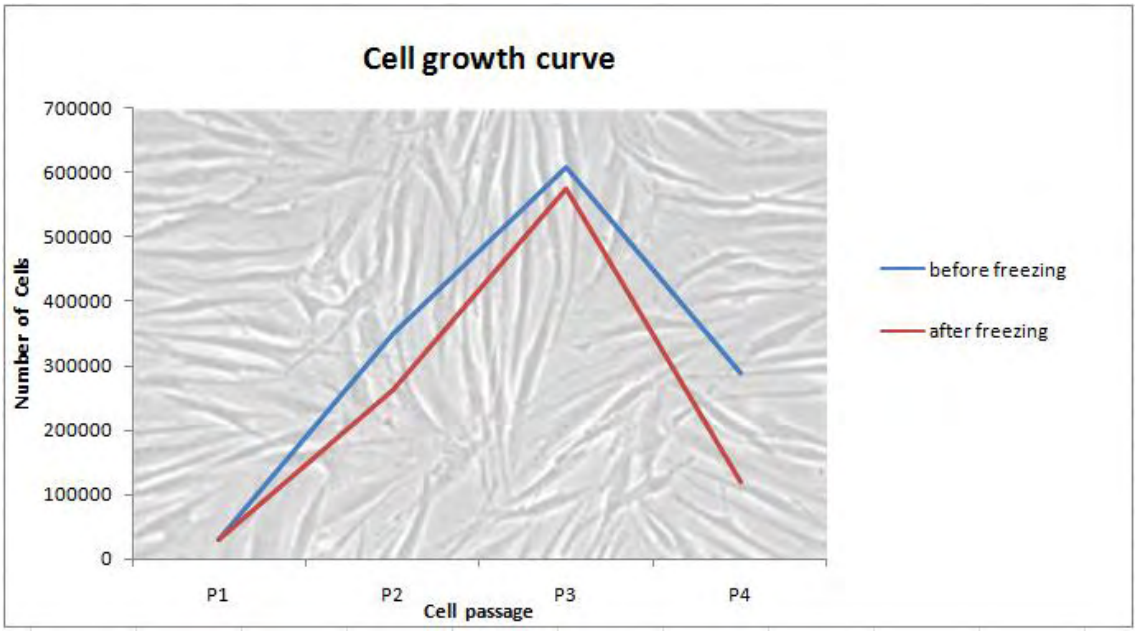


Gráfico 1. Curva de crescimento (pré e pós-criopreservação) de fibroblastos de *Cerdocyon thous.*

A curva de crescimento celular mostrou o comportamento das células (fibroblastos) em suas diferentes situações: pré-congelamento (representado pela linha azul do Gráfico 1) e pós-congelamento (representado pela linha vermelha do Gráfico 1). Ambas apresentaram um desenvolvimento semelhante, com discreta vantagem para as células pré-congelamento, apresentando um ápice de 610.000 células durante a passagem P3. Tanto para as células pré-congelamento quanto para as células pós-congelamento, foi verificado um declínio a partir da passagem P4 seguida de apoptose.

A partir da realização da cinética de crescimento celular, foi observada que houve um declínio no desenvolvimento pós-congelamento das células (fibroblastos) de *Cerdocyon thous* e dificuldade de cultivo após a 4ª passagem (P4). Porém, foi possível a criação de um banco de células (fibroblastos) viáveis.

7.Discussão

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizado o estudo descritivo dos órgãos que compõem o sistema reprodutor feminino de *Cerdocyon thous*, bem como a criopreservação de células para a constituição e o enriquecimento de um banco de germoplasma animal.

Observando-se os resultados obtidos a partir da observação macroscópica do sistema reprodutor feminino da espécie em questão, constatou-se que os ovários em número de dois, possuem coloração clara e formato similar a de um grão de feijão, com superfície regular, da mesma forma como descrito por Dyce et al., (2004), apontando para a similaridade com os ovários de canídeos e felinos domésticos. Microscopicamente, apresentavam folículos primordiais formados por um ovócito, células foliculares achatadas e folículo primário unilaminar, este último constituído por um ovócito envolvido por uma camada de células foliculares cubóides ou células da granulosa. Os diferentes estágios de desenvolvimento folicular encontrados nesta espécie é semelhante ao descrito de forma genérica para os mamíferos (DERIVAUX, 1980) e também são descritos por Behringer et al., (2006).

As tubas uterinas apresentaram-se com coloração clara, compreendendo um comprimento de 5 a 8 cm na espécie estudada, ligando-se à bolsa ovárica cranialmente e ao corno uterino caudalmente, remetendo às características encontradas em canídeos e felinos domésticos (Dyce et al., 2004). Microscopicamente, recoberta por tecido conjuntivo, semelhante às de outras espécies de mamíferos (WICK & KRESS, 2001; BANKS, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Também foi constatada a presença de útero bicornuado e cornos uterinos compridos e estreitos tais quais as características atribuídas ao útero de fêmeas de canídeos e felinos

domésticos (ATWOOD, 1955; SCHWARZE & SCHRÖDER, 1970; Nickel et al., 1979; GETTY, 1997; KÖNIG & LIEBICH, 2004), bem como em espécies silvestres como as pacas (MATAMOROS, 1981) e o gato maracajá (Arantes et al., 2014). Na análise microscópica por técnica histológica (Hematoxilina-Eosina, Tricromo de Masson, PAS e Alcian Blue), observou-se que o útero de *Cerdocyon thous* apresentou características semelhantes às descritas para as espécies domésticas, ou seja, contando com a presença das camadas: serosa, muscular e mucosa (perimétrio, miométrio e endométrio), respectivamente assim conhecido (SCHWARZE & SCHRÖDER, 1970; Nickel et al., 1979; BANKS, 1992; Dellmann et al., 1993; GARTNER, 1999; Dyce et al., 2004; KÖNIG & LIEBICH, 2004 e JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Na análise por microscopia eletrônica de varredura se evidenciou para os espécimes estudados, presença de mucosa formada por epitélio simples apoiado em tecido conjuntivo frouxo. Tais características se assemelham aos dos canídeos domésticos, nas quais o epitélio uterino apresenta a mesma conformação (BANKS, 1992; Dellmann et al., 1993). Foram poucos os achados na literatura onde foi feito o emprego de microscopia eletrônica de varredura como complementação, aprofundamento e compilação dos resultados obtidos por técnicas histológicas tradicionais para estudos sobre o sistema reprodutor feminino de canídeos silvestres, como os realizados em babirusa, por exemplo, por Ziemer et al., (2009).

Como já observado em estudos realizados em outras espécies (domésticas e silvestres), a cérvix dos espécimes analisados estabeleceu comunicação entre o útero e a vagina, compreendendo do óstio uterino e finalizando no óstio uterino externo, se posicionando cranialmente ao útero e caudalmente à vagina, da mesma forma como em canídeos e felinos domésticos (Dyce et al., 2004), com parede relativamente espessa assim como nas fêmeas de porco espinho (Mayor et al., 2003). Foi verificado

microscopicamente, que a cérvix compõe-se de uma camada serosa constituída ou não de mesotélio, dependendo da porção do órgão (adventícia) (BANKS, 1992; Dellmann et al., 1993; GARTNER, 1999; Dyce et al., 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A vagina apresentou proeminência significativa nos espécimes de *Cerdocyon thous* estudados; A vulva uma conformação anatômica densa e clítoris bem evidente, sendo este um indício de que as fêmeas se apresentavam reprodutivamente maduras. Os achados entram em concordância com as características encontradas em canídeos e felinos domésticos (Pough et al., 2003; Dyce et al., 2004) e felinos silvestres como o gato maracajá (Arantes et al., 2014). Microscopicamente apresentou-se com um epitélio pavimentoso estratificado, sobre um tecido conjuntivo denso, em consonância com os achados descritos por BANKS (1992), GARTNER (1999) e JUNQUEIRA & CARNEIRO (2008).

A respeito dos achados de cultivo celular, obtivemos sucesso no isolamento, cultivo e propagação de células fibloblásticas de *Cerdocyon thous.* Para o sucesso do cultivo, foi verificado que fibroblastos requerem de fatores que auxiliam no seu desenvolvimento e sua proliferação. Em nossos experimentos, ficou demonstrado que a adição do suplemento ßFGF ao meio de cultivo promoveu a proliferação e a intensa formação de colônias. Isto foi muito bem reportado em animais de laboratório como coelhos por Kakegawa et al., (2008) e camundongos por Resnick et al., (1998), em animais domésticos como o cão (Han et al., 2003, Caamaño et al. 2008, Bai et al. 2012) e em espécies silvestres (León-Quinto et al. 2011), onde foi constatado que o ßFGF estimula a proliferação das células e multiplicação dos tecidos, diferentemente da sua não utilização, em que foi observado que as células demandaram maior tempo de cultivo. Associou-se o tempo para estabelecimento do cultivo primário (P0) a pequena quantidade de amostra tecidual obtida.

León-Quintino et al., (2011) reportou que a dificuldade na obtenção tecidual de animais silvestres, especialmente àquelas espécies ameaçadas de extinção, bem como a obtenção de uma pequena quantidade de fragmentos teciduais destes animais podem ser apontados como fatores interferentes na proliferação celular, porém, um problema que pode ser resolvido a partir da utilização de meios de cultura suplementados com fatores de crescimento como Monolayer Embryonic Fibroblast (MEFs), Leukemia inhibitory factor (LIF) e Fibroblast Growth Factor basic (bFGF/βFGF), conferindo ao cultivo uma elevada capacidade de crescimento. Valores similares no que tange a visualização, tanto da formação de colônias quanto da proliferação e desenvolvimento celular, também foram reportados por Durcova-Hills, Hustin e McLaren (2001) em camundongos, suínos por Lee & Piedrahita (2000) e canídeos silvestres por León-Quinto et al., (2011). Portanto, em cultivo, quando adicionado tal fator de crescimento (ßFGF) ficou evidente que este promoveu um aumento da população das células fibroblásticas, mantendo o cultivo mais homogêneo (CHENG et al., 1994). Assim, neste estudo houve a obtenção de linhagem de células fibroblásticas para o enriquecimento de banco de germoplasma (até a 3ª passagem), as quais posteriormente foram criopreservadas e contribuirão com estudos posteriores pertinentes à conservação do *Cerdocyon thous*.

8.Conclusão

8. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos e resultados obtidos nesse estudo podem ser feitas as seguintes conclusões:

1. Os achados do estudo sobre o sistema reprodutor feminino do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) abordaram aspectos de descrição morfológica e ultraestrutural, forma e posicionamento dos órgãos genitais, cultivo e criopreservação das células (fibroblastos), este último com intuito preservacionista por longo período dos recursos genéticos e enriquecimento de Banco de Germoplasma Animal, imprescindível para o conhecimento dos aspectos biológicos e reprodutivos básicos desta importante espécie, favorecendo os conhecimentos sobre a sua preservação.

2. As características do trato reprodutivo das fêmeas de *Cerdocyon thous* são semelhantes às de espécies de carnívoros silvestres e domésticos, sendo: ovários consistentes, com forma semelhante a um grão de feijão; tubas uterinas que realizam comunicação entre o ovário e o útero, com sutil abertura na cavidade peritoneal próximo ao útero; útero bicornuado, com cornos compridos e estreitos, cérvix em forma de anel único realizando a comunicação entre o útero e a vagina; vagina constituída de fibras musculares de forma circular; vulva com lábios externos grossos e clitóris formando uma comissura inferior aguda;

3. Foi possível a criação de um banco de células viáveis;

4. Os dados, relatados nesse estudo, sobre a morfologia do sistema reprodutor feminino e a constituição de um banco de germoplasma são inéditos na literatura para a espécie aqui estudada.

5. Os achados desta pesquisa constituem um importante material a fim de elucidar e contribuir com estudos posteriores realizados em *Cerdocyon thous*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. Dieta e distribuição espacial de canídeos silvestres no Parque Estadual de Itapuã. Dissertação de Bacharelado. Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

ARANTES, R. C; HONORATO, A. G.; SOARES, M. J.; LIMA, A. K. F.; FERNANDES, B. M. Descrição do sistema genital feminino de jaguatirica (Leopardus pardalis). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 40, São Paulo, 2014. Resumos. São Paulo: Medicina Veterinária e Zootecnia. 2014. 80p.

ATWOOD, W. J. Comparative anatomy. 2° ed., 424p. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1955.

BACHA JR, WHERNER. J.; BACHA, L.M. Atlas colorido de histologia veterinária. 2.ed. 457p. São Paulo: Roca, 2003.

BAI C.; WANG D.; SU X.; ZHANG M.; GUAN W.; MA Y. Establishment and biological research of the Jining Grey goat fibroblast line. Veterinary Animal Science, 36:659-667. Turkey, 2012.

BALMFORD, A.; BOND, W. Trends in the stateof nature and their implications for human well-being. Ecology Letters, [S.l.], v. 8, p. 1218-1234, 2005.

BANKS, W.J. Histologia Veterinária Aplicada. 2. ed. 560p. São Paulo: Manole, 1992.

BRADY, C.A. Observation on the behavior and ecology of the Crab-eating-fox (*Cerdocyon thous*). In: Eisenberg, J.F. Vertebrate ecology in the Nothern Neotropics. Smithsonian Istitution Press, Washington, DC, p161-171, 1979.

BRAGA, F.G. Influência da agricultura na distribuição especial do *Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758 (veado-campeiro) em Piraí do Sul, Paraná – parâmetros populacionais e uso do ambiente. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 84, 2004.

BEHRINGER, R. R.; EAKIN, G. S.; RENFREE, M. B. Mamamalian diversity: gametes, embryos and reproduction. Reproduction, Fertility and Development, v. 18, p. 99-107, 2006.

BERTA, A. Quaternay evolution and biogeography of the large South American Canidae (Mammalia, Carnivora). University of California Publications, Geological Sciences, 132:1-149, 1988.

BISBAL, F.; OJASTI, J. Nicho trofico del zorro *Cerdocyon thous* (Mammalia, Carnivora). Acta Biologica Venezolana, 10(4): 469-496, 1980.

CAAMAÑO, J.N.; RODRIGUEZ, A.; SALAS, A.; MUNOZ, M.; DIEZ, C.; PRATHER, R.S.; GOMEZ, E. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured brown bear fibroblast cells. Cell. Biol. Int. 32:855-859, 2008

CASTRO, A. C. S.; BERNEDSON, W. E.; CARDOSO, F.M. Kinetics and quantification of spermatogenesis: morphological basis its application in studies of mammalian reproduction. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.21.n.1.p. 25 – 34 1997.

CHEIDA, C.C. Dieta, dispersão de sementes e comportamento de forrageio do cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) em uma área de Floresta Atlântica: Reserva Natural de Salto Morato, Guaraqueçaba, Paraná. Dissertação de Bacharelado, Instituto de Biologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio grande do Sul, 2003.

CHENG, L.; GEARING, D.P.; WHITE, L.S.; COMPTON, D.L. SCHOOLEY, K. Role of leikemia inhibitory factor and this receptor in mouse primordial germ cells growth. development, v.12, p.3145-3153, 1994.

CLUTTON-BROCK, T.H. Man-Made dogs. Science, 197: 1340-1342, 1977

COLVILLE, J. O Sistema Urinário. In: COLVILLE, T. P.; BASSERT, M. J. Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária. Elsevier 2(16): 374-386. Rio de Janeiro, 2010.

COMIZZOLI, P.; HOLT, W.V. Recent Advances and Prospects in Germplasm Preservation of Rare and Endangered Species. Advances in Experimental Medicine and Biology, 753: 331-356, 2014.

CRAWSHAW JR., P. G. Comparative ecology of ocelot (*Felis pardalis*) and jaguar (*Panthera onca*) in a protected subtropical forest in Brazil and Argentina. Tese de Doutorado. University Florida. 190 p. Florida, 1995.

CRUSCO, S. E. Fisiologia do ciclo estral em cadelas. 2005. Disponível em: http://www.bichoonline.com.br/artigos/Xsc0001.html. Acesso em 07 abr. 2016.

DAYAN, T.D.S.; SIMBERLOFF, E.T.; CHERNOV, E.Y; YOM-TOV, Y. Inter and intra-specific character displacement in mustelids. Ecology 70: 1526-1539, 1989.

DELLMANN, V. Histologia Veterinária. 2. ed. p.257-260. Acribia: Zaragoza, 1993.

DERIVAUX, J. Reprodução dos animais domésticos 1. fisiologia, 2. O macho, inseminação artificial 3. patologia. Acriba, p. 03- 68, 446 p. Zaragoza, 1980.

DIDIO, L.J.A. Tratado de Anatomia Aplicada. 1. ed. p.622-652. São Paulo: Editora Póllus, 1999.

DOTTO, J.P.C.; FÁBIAN, M.E.; MENEGHETTI, J.O. Atuação de *Pseudalopex gymnocercus* (Fisher, 1814)e de *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) (Mammalia, Canidae) como fator de mortalidade de cordeiros no sul do Brasil. Boletín de La Sociedad de Biología de Concepción, 72:51-58, 2001.

DURCOVA-HILLS, G.; HUSTIN, F.X.; McLARE]N, A.A. Pluripotential stem cells derived from migrating primordial germ cells. Differentiation, v.68, p.220-226, 2001.

DYCE, R.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. O Tratado de Anatomia Veterinária. 3. ed. 816 p. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

EWING, L.L.; ZIRBIN, B.R.; COCHRAN, R.C. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. Endocrinology, v.105, n.5, p.1135-1142. New York, 1979.

EMMONS, L. H. A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. Revista Ecologia (Terre Vie.). 43: 133-157, 1998.

FACURE, K.G.; GIARETTA, A.A. Food habit of carnivores in coastal Atlantic Forest of South eastern Brazil. Mammalia 60(3):499-502, 1996.

FACURE, K.G.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Feeding habits of Creb-eating-fox, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) in a suburban área ofSoutheasternBrazil. Mammalia 60(1):147-149, 1996.

FONTANA, C.S.; BENKE, G.A.; REIS, R.E. Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D.The testis of Domestic Animals. In: REGADERA, T. Male Reproduction. A multidisciplinary overview Madrid: Churchill livingstone, p.197-219, 1998.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A.D. Anatomia e fisiologia dos animais da fazenda. 6: 454p. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

GALVANI, A. The challenge of the food sufficiency through tolerant crops. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, [S.l.], v. 6, p. 3-16, 2007.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de histologia. p. 365-368. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999.

GETTY, R. Anatomia dos Animais Domésticos. v.5: p.147-153, Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

GINSBERG, J.R.; D.W. MACDONALD. Foxes, wolves, jackals and dogs: an action plan for the conservation of canids. Gland, IUCN/SSC Canid Specialist Group & IUCN/SSC Wolf Specialist Group, 117p., 1990.

GOODRICH, J.M.; BUSKIRK, S.W. Control of abundant native vertebrates for conservation of endangered species. Conservation Biology, 9: 1357-1364, 1995.

HAN, Z.M.; CHEN, D.Y.; LI, J.S.; SUN, Q.Y.; WANG, P.Y.; DU, J.; ZHANG, H.M. Flow cytometric cell-cycle analysis of cultured fibroblasts from the giant panda, Ailuropoda melanoleuca L. Cell. Biol. Int. 27: 349-353, 2003.

HIEMSTRA, S.J. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. The role of biotechnology, 1:5-7, 2005.

HOLT, W.V.; COMIZZOLI, P. Conclusions: Environmental Change, Wildlife Conservation and Reproduction. Advances in Experimental Medicine and Biology, p. 503-514, 2014.

HORST, E. K; HANS. G. L. Anatomia dos animais domésticos. Texto e atlas colorido. 4ª edição, Editora Artmed, 2011.

IUCN. Red list of threatened species. Disponivel em: <http://www.redlist.org>**.** Acesso em: 28 de abril de 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10. ed., 448p. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOLBE, T.; HOLTZ, W. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididimal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. Theriogenology, (S.I.), 52:671-682, 1999.

KAKEGAWA, R.; TERAMURA, T.; TAKEHARA, T.; ANZAI, M.; MITITANI, T.; MATSUMOTO, K.; SAEKI, K.; SAGAWA, N.; FUKUDA, K.; HOSOI, Y. Isolation and

culture of habbit primordial germ cells. The Journal of Reproduction and Development, v. 54, n. 5, p. 352-357, 2008.

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

LEE, C.K.; PIEDRAHITA, J. Effects of growth Factors and Feeder Cells on Porcine Primordial Germ Cells in Vitro. Cloning, v.2, p.197-205, 2000.

LEÓN-QUINTO, T; SIMÓN, M.A.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍN, F.; BERNAT, S., T.; Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. Criobiology, 62:2, pp.145-151, 2011.

LIPPERTS, H. Anatomia texto y altas. p.425. Madrid: Marbón, 1999.

LOKUSTOFF, N.M. Biology, technology and strategy of genetic resource banking in conservation programs for wildlife. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, L.; GIANAROLI, L. (Eds.). Gametes: development and function. Rome: Senoro Symposia, 1998.

MACDONALD, D.W.; COUTERNAY, O. Enduring social relationships in a population of Creb-eating zorros, *Cerdocyon thous*, in Amazonian, Brazil (Carnivora, Canidae). The Journal of Zoology, 239:329-355, 1996.

MACHADO, L.C.; OLIVEIRA, V.C.; PARAVENTI, M.D.; CARDOSO, R.N.R.; MARTINS, D.S.; AMBRÓSIO, C.E. Maintenance of brazilian biodiversity by germplasm bank. Pesq. Vet. Bras. 36:62-66, 2016.

MARINHO-FILHO, J., RODRIGUES, F.H.G. & JUAREZ, K.M. The cerrado mammals: diversity, ecology, and natural history. *In*: The Cerrado of Brazil. (P.S. OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS, R.J.). p. 267-284. Nova Iorque: Editora Columbia University, 2002.

MARINHO-FILHO, J.; MEDRI, I.M. Priodontes maximus (Kerr, 1792). *In*: Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (MACHADO, A.B.M.,

DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P.). MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA), p.707-709. Brasília, 2008.

MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Comparison of two methods obstaing spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. Theriogenology, (S.I.), 65:471-485, 2005.

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epidydimal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. Animal Reproduction Science, Amsterdan, 101:326-331, 2007.

MATAMOROS, Y. Anatomia e histologia dei sistema reproductor dei tepezcuinte *(Cunicullus paca).* Revista de Biologia Tropical, v. 29, n. 1, p. 155-164. San Jose, 1981.

MAYOR, P.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; JORI, F.; FENECH, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Reproductive functional anatomy and oestrous cycle pattern of the female brush-tailed porcupine (*Atherurus africanus*, Gray 1842) from Gabon. Animal Reproduction Science, Amsterdan, v.77, p.247-259, 2003.

MENEZES, D. J. A. Morfologia dos órgãos genitais da cutia (*Dasyprota aguti*, Linnaus, 1766). Dissertação (Mestrado em anatomia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, 169p., 2001.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>. Acesso em 05 de maio de 2015.

MONTGOMERY, G.G.; LUBIN, Y. Social structure and food habits of the creb-eating-fox in Venezuela Llanos. Acta Cientifica Venezolana, 29:382-383, 1978.

MOTTA-JUNIOR, J.C.; LOMBARDI, J.A.; TALAMONI, S.A. Notes on Creb-eating-fox (*Dusycion thous*). Seed dispersal food habits in south eastern Brazil. Mammalia. 58(1):156-159, 1994.

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature. 403: 845-853, 2000.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. The viscera of the domestic mammals. 2: p.351-389. Berlim: Verlag Paul Parey, 1979.

NIJMAN, V. In-Situand Ex-Situ status of the *Javan Gibbonand* the role of zoos in conservation of the species. Contribution to Zoology, 1(75):3-4, 2006.

O ECO. Disponível em**:** http://www.oeco.org.br/convidados/27587-o-pesquisador-que-quer-salvar-animais-com-um-celular. Acessoem: 12/09/2015.

PEDÓ, E. Dieta do graxaim-do-mato *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae), na Reserva Biológica do Lami, sul do Brasil. Dissertação de Bacharelado. Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

PIMENTEL, D. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. Human Ecology, 1(35):653–668, 2007.

PIOVEZAN, U.; CARNEIRO, P.C.F.; MAUÉS, M.S.; PAIVA, S.R.; ALENCAR, J.R.M.; ALBUQUERQUE, N.I.; MARQUES, J.R.F.; PEREIRA, F.M.; PINHEIRO, S.M.; RESENDE, E.K. Rede de recursos genéticos animais da Embrapa: espécies nativas com potencial econômico. Embrapa. Disponível em: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/936036/1/10.pdf. Acesso em 10 de outubro de 2015.

PITMAN, M. R. P. L.; OLIVEIRA, T. G.; PAULA, R. C.; INDRUSIAK, C. Manual de identificação, prevenção e controle de predação por carnívoros. Brasília, 83p, 2002.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. Biologia da conservação. 327p. Londrina: Planta, 2001.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. A vida dos vertebrados. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PUKAZHENTHI, B.; D. E. WILDT. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? Reproductive Fertility Development. 16: 33–46, 2004.

PURVIS, A. Predicting extinction risk in declining species. Proceedings of The Royal Society Biological Sciences, 267(1):1947-1952, 2000.

RAMOS-JÚNIOR, V.A.; C. PESSUTI; CHIEREGATTO, C.A.F.S. Guia de identificação dos canídeos silvestres brasileiros. Sorocaba, Comunicação Ambiental, 35p. 2003.

RESNICK, J.L.; ORTIZ, M.; KELLER, J.R.; DONOVAN, P.J. Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth. Biological Reproduction, v. 59, p.1224-1229, 1998.

RODRIGUES, R.G.A; GOMES, A.V.; BIRCK, A.J.; FILADELPHO, A.L. Discribe the arm and shouder muscles of the dog eating fox *Cerdocyon thous.* Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária – Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral de Garça – FAEF; AnoXI , nº 21, julho de 2013.

ROSENSZWEIG, M.L. Community structure in sympatric Carnivora. Journal of Mammalogy, 47:602-612, 1966.

RUSSELL, L.D.; REN, H.P.; SINHO-HIKIN, I. A comparative study in twelve Mammalia species of volume densities volume and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. American Journal Anatomy, 1:21-30, 1990.

RYDER, O. A. Cloning advances and challenges for conservation. Trends in biotechnology, 20(6): 231-232, 2002.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de Germoplasma vegetal. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, (S.I.), 12:70-84, 2000.

SILLERO-ZUBIRI, C. & M. HOFFMANN. 2004. *Chrysocyon brachyurus*. *In*: IUCN (Ed.). IUCN red list of threatened species. Available in the Word Wide Web at: http://www.iucnredlist.org Acesso em 06 de novembro de 2006.

SILVA, E. L. F.; GUIÃO-LEITE, F. L.; SOUZA, T. D.; ROSSI JUNIOR, J. L.; MARCHESI, M. D.; ALVES, D. C. Avaliação da idade em cachorros-do-mato, *Cerdocyon*

thous (Linnaeus, 1758), por meio da mensuração do diâmetro do canal pulpar. v. 8, p. 114-116. Espírito Santo: (Natureza on Line), 2010.

SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. Anatomy of the Domestic Animals. 4a ed. p. 382-384. Columbus: Ohio, 1995.

STACHECKI, J.J.; COHEN, J. An overview of oocyte cryopreservation. Reproductive Biomedicine Online, (S.I.), v.9, p.152-163, 2004.

SUNQUIST, M.E.; SUNQUIST, F.; DANEKE, D.E. Ecological separation in a Venezuelan llanos carnivore community. *In:* Neotropical Mammalogy (REDFORD, K.H.; EISEMBERG, J.F.). Sandhill Crane Press. UFRGS, Departamento de Geografia. Itapuã: Análise preliminar do espaço geográfico. Porto Alegre, 1982.

SCHWARZE, E.; SCHRÖDER, L. Compêndio de Anatomia Veterinária: sistema visceral. v. 2, p. 277-286. Zaragoza: Acribia, 1970.

TOLOSA, E.; LI, W.; YASUDA, Y.; WIENHOLD, W.; DENZIN, L.K.; LAUTWEIN, A.; DRIESSEN, C.; SCHNORRER, P.; WEBER, E.; STEVANOVIC, S.; KUREK, R.; MELMS, A. BROMME, D. Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. The Journal of Clinical Investigation, 112(4):517-526, 2003.

TROUNSON, A. Manipulation of development: opportunites for animal breeding. Gametes: development and function, (S.I.), p. 485-498, 1998.

VÁSQUEZ, B.; DEL SOL, M. Complejo prostático em elconejo (*Oryctolagus cuniculus).* Revista Chilena de Anatomia, v. 20, n.2, p.175-180, 2002.

WICK, R.; KRESS, A. Ultrastructural changes in the uterine luminal and glandular epithelium during the oestrous cycle of the marsupial Monodelphis domestica (Grey Short-Tailed Opossum). Cells Tissues Organs, v. 170, p. 111-131, 2001.

WILSON, E. O. Biodiversidade. 657p. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

Apêndices

Apêndice A: Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa

CONCLUSÃO DE PARECER ÉTICO

Processo USP: 14.1.1465.74.6

Projeto: Biologia da reprodução do cachorro-do-mato (Cerdocyon Thous) e criopreservação do material genético para enriquecimento dos bancos de germoplasma animal.

Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo do conteúdo sobre a solicitação enviada e parecer gerado.

Recomendação do Comitê de Ética:

☒ **Aprovação.**

☐ **Não aprovado.**

☐ **Considerado em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados.**

☐ **Retirado de pauta.**

Pirassununga, 17 de dezembro de 2014.

Notifique-se o interessado.

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins - Presidente do CEP/FZEA

Via do Parecer retirada pelo interessado:

Nome/Assinatura: Juana Cristina Machado

Data: 20/12/2014

Apêndice B: Aprovação do SISBIO

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47183-1	Data da Emissão: 23/05/2016 09:22	Data para Revalidação*: 22/06/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Luciana Cristina Machado	CPF: 285.523.518-97
Título do Projeto: BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO CACHORRO-DO-MATO (CERDOCYON THOUS) E CRIOPRESERVAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO PARA ENRIQUECIMENTO DOS BANCOS DE GERMOPLASMA ANIMAL	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Formação de um banco de germoplasma animal	04/2016	12/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Carlos Eduardo Ambrósio	Orientador responsavel pela pesquisa	255.397.158-37	280664242 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PIRASSUNUNGA	SP	Animais vitimados por atropelamentos na Rodovia Anhanguera	Fora de UC Federal
2	ARARAS	SP	Animais vitimados por atropelamentos na Rodovia Anhanguera	Fora de UC Federal
3	LEME	SP	Animais vitimados por atropelamentos na Rodovia Anhanguera	Fora de UC Federal
4	PORTO FERREIRA	SP	Animais vitimados por atropelamentos na Rodovia Anhanguera	Fora de UC Federal
5	LIMEIRA	SP	Animais vitimados por atropelamentos na Rodovia Anhanguera	Fora de UC Federal
6	SANTA RITA DO PASSA QUATRO	SP	Animais vitimados por atropelamentos na Rodovia Anhanguera	Fora de UC Federal
7	JUNDIAI	SP	Centro de Triagem de Animais Silvestres - CETAS	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 56964275

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47183-1	Data da Emissão: 23/05/2016 09:22	Data para Revalidação*: 22/06/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Luciana Cristina Machado	CPF: 285.523.518-97
Título do Projeto: BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO CACHORRO-DO-MATO (CERDOCYON THOUS) E CRIOPRESERVAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO PARA ENRIQUECIMENTO DOS BANCOS DE GERMOPLASMA ANIMAL	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

SISBIO

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cerdocyon thous
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Cerdocyon thous

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Outras amostras biológicas(Epiderme de Cerdocyon thous de animais oriundos do CETAS - JundiaÃ- - SP)
2	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Outros métodos de captura/coleta(Animais que vieram A Aªbito vitimados por atropelamentos em rodovias)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	

SISBIO

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 56964275

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47183-1	Data da Emissão: 23/05/2016 09:22	Data para Revalidação*: 22/06/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Luciana Cristina Machado	CPF: 285.523.518-97
Título do Projeto: BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO CACHORRO-DO-MATO (CERDOCYON THOUS) E CRIOPRESERVAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO PARA ENRIQUECIMENTO DOS BANCOS DE GERMOPLASMA ANIMAL	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 56964275

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47183-1	Data da Emissão: 23/05/2016 09:22	Data para Revalidação*: 22/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Luciana Cristina Machado	CPF: 285.523.518-97
Título do Projeto: BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO CACHORRO-DO-MATO (CERDOCYON THOUS) E CRIOPRESERVAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO PARA ENRIQUECIMENTO DOS BANCOS DE GERMOPLASMA ANIMAL	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

SISBIO

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 56964275

Apêndice C: Artigo Publicado

Pesq. Vet. Bras. 36(1):62-66, janeiro 2016

Topic of General Interest

Maintenance of Brazilian Biodiversity by germplasm bank[1]

Luciana C. Machado[2*], Vanessa C. Oliveira[2], Mariana D. Paraventi[2], Rafaela N.R. Cardoso[2], Daniele S. Martins[2] and Carlos E. Ambrósio[2]

ABSTRACT.- Machado L.C., Oliveira V.C., Paraventi M.D., Cardoso R.N.R., Martins D.S. & Ambrósio C.E. 2016. **Maintenance of Brazilian Biodiversity by germplasm bank.** *Pesquisa Veterinária Brasileira 36(1):62-66.* Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte 225, Pirassununga, SP13635-900, Brazil. E-mail: lucianabiologa@usp.br

Currently the importance of using alternative strategies for biodiversity conservation is emphasized and since the establishment of germplasm bank is an alternative to the conservation of endangered species. This is a technique of great importance for the maintenance of Brazilian fauna. Since the early70'sthere was a growing concern about the need to preserve essential genetic resources for food and agriculture, mainly for conservation of genetic material from farm animals. Thus was created the Brasilia Zoo, in July 2010, the first Germplasm Bank of Wild Animals in Latin America, as an alternative strategy for the conservation of threatened or endangered species, using both gametes and somatic cells and stem cells. Then we argue to create new banks or research networks among different regions with aimed to tissue preservation.

INDEX TERMS: Preservation, germoplasm bank, threatened species, cryopreservation, biotecnology.

RESUMO.- [**Manutenção da Biodiversidade Brasileira através de bancos de germoplasma.**] Atualmente, a importância do uso de estratégias alternativas para a preservação da biodiversidade é ressaltada e, visto que a criação de bancos de germoplasma é uma alternativa para a conservação de espécies ameaçadas, esta é uma técnica de suma importância para a manutenção da fauna brasileira. Desde o começo da década de 70 houve uma crescente preocupação sobre a necessidade de se preservar recursos genéticos essenciais para alimentação e agricultura, voltados principalmente, para a conservação de material genético de animais de produção. Deste modo, foi criado pelo Jardim Zoológico de Brasília, em julho de 2010, o primeiro Banco de Germoplasma de Animais Selvagens da América Latina, como uma estratégia alternativa para a conservação de espécies ameaçadas ou em perigo de extinção, utilizando tanto gametas como células somáticas e células-tronco. Com isto ponderamos na criação de novos bancos ou redes de pesquisa inter-regionais que foquem nesta preservação tecidual.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Preservação, banco de germoplasma, espécies em extinção, criopreservação, biotecnologia.

INTRODUCTION

The biodiversity present in Brazil is one of the most significant in the world and its wealth, both animals and vegetables are the subject of great interest in various sectors, among which stands out the scientific community and there are interest in the preservation of the present species. (Costa & Martins 2008).

According to Houghton et al. 2011, it is estimated that in a few years endangered species will become extinct and others endangered because of the interference of both climate and vegetation, which can cause fragmentation of the habitats and impede the species migration, and these date are current. Although some initiatives to prevent the loss of biodiversity, such as the expansion of protected areas, cannot be avoided, because of referred them areas do not protect all animals or species of interest (Silva et al. 2012).

Preservation of the species depends of the minimum number of viable individuals. The loss of the populations

[1] Received on May 12, 2015.
Accepted for publication on November 25, 2015.

[2] Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo,Av. Duque de Caxias Norte 225, Pirassununga, SP 13635-900, Brazil. *Corresponding author: lucianabiologa@usp.br

is an unprecedented and may irreversible fate. To ensure a minimum of biodiversity, maintenance and perpetuation of the species, which cannot be sure secured, it is necessary the proper management of populations (Costa & Martins 2008).

Genetic resources are comprised by the genetic variability organized in a number of different materials among themselves, called germplasm. Each germplasm unit is formed by the genetic material of living organisms of current or potential interest. Consequently, the germplasm is the element of genetic resources operated and used in research in general, especially for genetic improvement programs (Ministério do Meio Ambiente 1998).

Currently, the importance of using alternative strategies for biodiversity conservation is emphasized and the establishment of germplasm bank is an alternative for the endangered species conservation; this is a short technical importance for the maintenance of the Brazilian fauna. The introduction of DNA collections can be used in numerous conservation studies as discrimination of endangered species, reproductive management strategies, selecting a preservation of a species status and currently these banks assist in monitoring the biodiversity protection laws as, for example, in identifying whale species from samples collected in the meat trade (Santos et al. 2002).

The germplasm banks are a fundamental role in the study of biodiversity and conservation. The possibilities facing a genomic collection are essential, when discussing the management and recovery of several species and may be noted endangered species and even extinct. Today it is possible to apply genetic knowledge in biotechnology research, evolutionary, comparative, taxonomic and ecological studies, saying the scientific and technological potential of genomic reserves (Santos et al. 2002).

LITERATURE REVIEW

Events in Brazil linked to concern of preservation of the species

Since the beginning of the 70 decade there was an increasing concern about the need to preserve essential genetic resources for food and agriculture. In 1974 was created Embrapa - Brazilian Agricultural Research Corporation - a research center whose mission was to coordinate appropriate resources to manage the genetic resources of the country and still responsible for it nowadays. The main activities involve enrichment, by collecting germplasm introduction, exchange and quarantine conservation: in situ (or in nature or on the farm) and ex situ (seeds in cold storage; explants in vitro culture, the micro-organisms; cryopreservation of semen, embryos and oocytes); characterization: phenotypic, genetic and information (Mariante et al. 2009).

Biological diversity is the key for life maintenance and there is no doubt that habitat destruction is the main factor responsible for the reduction of biodiversity or the total number of species that exist on the planet. Several attempts have been made to halt the population of various species decline rates. One of the suggested programs concerns the conservation of genetic material, specifically sperm, and embryos oocytes of endangered species knew as "genetic resource banks" or "genome bank". It is used as repositories germplasm, which can be use in artificial insemination or embryo transfer when necessary, and a storage interface programs ex situ and in situ. Genetic reserves of banks differ from one bank of stored cells and tissues available only as a resource for genetic research. The objective of the program is simple and directly applicable because of the effectively increase of the "genetic life" individuals value, and may continue as part of reproductive programs, even after its death. Since the objective of the reproductive programs for endangered species is the maintenance of maximum genetic diversity, it is clear that banks of genetic resources directly contribute to conservation objective (Loskutoff 1998; Holt & Pickard 1999).

Germplasm Bank in Brazil

The United Nations established the Convention on Biological Diversity (CDB), which included Brazil from Decree No. 2519 of March 16, 1998, and provided the access and technology transfer for the conservation, genetic heritage and protection, access to associated traditional knowledge, benefit sharing and access to genetic heritage existing in the country. Thereby, the CDB has implemented laws which aim protect the genetic heritage of a country and ensures the exchange with other countries, allowing for example, Brazil to have access and benefit from advances in genetic resources obtained internationally (Silva et al. 2012).

Banks of genetic resources are repositories of germplasm (gametes, embryos, blood products, tissues and DNA) to defined conservation programs, which are directly linked with biotechnology for the implementation of the ultimate goal, which is the animal reproduction. One possibility to preserve the wild germplasm of animals is the isolation, culture and cryopreservation of somatic cells such as: testicular, follicle and fibroblasts, and it can be used for molecular characterization and by nuclear transfer technique (cloning) might multiply the number of animals that are extinct or endangered (Martins et al. 2007).

In July 2011, the Workshop Germplasm of Brazil was organized by the Paulista Agency of Agrobussines Technology (APTA), from Agriculture and Supply Secretary (SAA) and the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) of the Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA) approved the creation of a national system curatorial germplasm. The proposal aimed to encourage other countries to create their systems of germplasm bank of curatorial and biological collections, and encourage the government to invest on this conservation in order to combat piracy, through the formation of a Brazilian network that includes public institutions research (Embrapa, Ministry of Agriculture and National Board of Agricultural Research of State Systems). In Brazil, the germplasm banks coordinated by Embrapa Genetic Resources and Biotechnology are meant primarily for the conservation of genetic material of producing animal.

There was created by the Zoo of Brasília, in July of 2010, the first Bank of Germplasm Bank of Wild Animals of Latin America, as an alternative strategy for the conservation of threatened species or in extinction danger, using as much gametes as somatic cells and stem cells. In 2007, the La-

boratory of Germplasm Conservation, was create in the University Federal Rural of the Semi-arid - UFERSA, accomplishing researches destined to the collection and cryopreservation of gametes of different wild species (Silva et al. 2012).

In 1999, the Institute of Biological Sciences from University Federal of Minas Gerais created a Bank of DNA of the Brazilian fauna species, as birds and mammals. Also the National Research Institute of Amazonia (INPA) has a collection of plants, animals and microorganisms species from Amazonia, many preserved cryogenically living with collections of tissue and DNA samples of species of fish and small mammals (Santos et al . 2002). Fortunately, the institutions have been increasing for creating germplasm bank facing the Brazilian wild species, to create alternative strategies for the preservation of endangered species or in extinction risk.

The Ideal Germplasm Bank

The cryopreservation allows, theoretically, the indefinite conservation of biological material without deterioration over the time. Genetic germplasm banks have as the main focus the recovery of extinct populations, or species with unique biological importance characteristics to be preserved, or species locally adapted or in extinction risk (Silva et al. 2012).

The success and safety of semen cryopreservation, oocyte and embryo requires care, and some points should be considered, such as: the screening of the donor avoiding infectious diseases and the achievement of good health practices and procedures to ensure appropriate and less risk of contamination during collection, transport and storage, as well as higher rates of post thawing survival (Bielanski & Vajta 2009). It is recommended and proposed that the germplasm banks contain a wide variety of genetic material, from future populations which appear to leave or can suffer genetic limitations (Costa & Martins 2008).

Cryopreservation of tissue and cells

The reproductive system has the main organs responsible for the perpetuation of the species. The ovaries are paired organs and are located in sublumbar region caudal to the kidneys, this variable being located in different species because of a movement of these organs. It is the sexual hormone production and function, as well as release of germ cells as shown in Figure 1 (Liu et al. 2006, Horst & Hans 2011). In Figure 2 shows the primary male reproductive organ, the morphofunctional view distinguished into two compartments, the tubular compartment formed by the seminiferous tubules and where spermatogenesis occur (Castro et al. 1997).

The germ cells are responsible for originating the gametes lineage in mammals. The viability of the tissue from reproductive system after freezing can generate fertilized oocytes, as well as offspring of several species with cryopreservation of ovarian and testicular tissue, enabling to generate genebanks. With technological advances, these lineages can contribute to the generation of germplasm banks that is extremely important for the preservation of genetic material and perpetuation of the species at risk of extinction.

The cells from the skin are also sources of genetic information that can be cryopreserved in a simple and efficient manner. Skin tissues are used to perform more banks, as a source of somatic cells for different applications. The

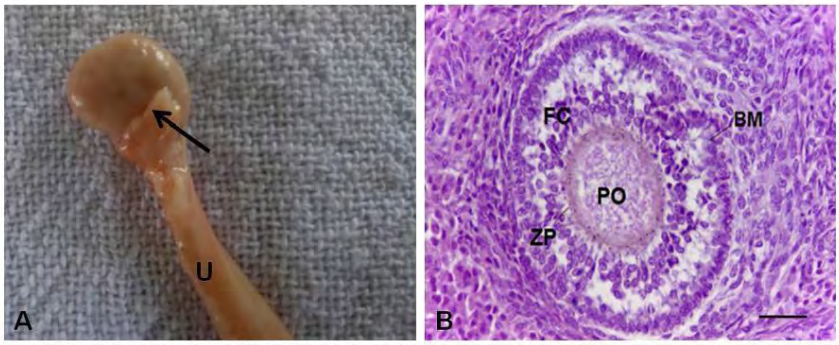


Fig.1. Ovary of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). (**A**) Ovary (arrow) and uterine horn (U). (**B**) The pelucide zone (ZP), primary oocytes (PO), basal membrane (BM) and folicular cell (FC). HE, bar = 20µm.

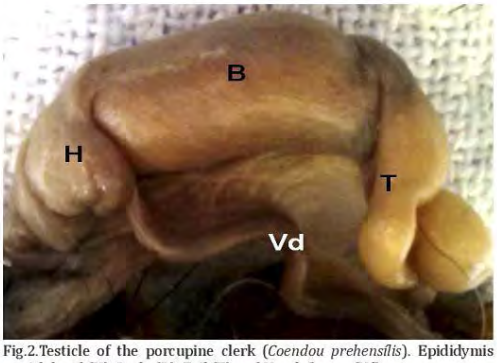


Fig.2. Testicle of the porcupine clerk (*Coendou prehensilis*). Epididymis with head (H), Body (B), Tail (T) and Vas deferens (Vd).

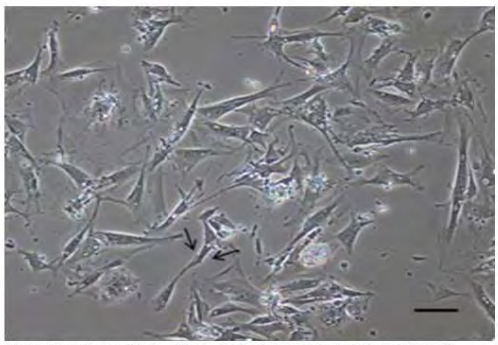


Fig.3. Fibroblast culture of Blue-and -yellow Macaw (*Ara ararauna*).

Figure 3 shows the fibroblast line are the most commonly used, because they are differentiated adult cells and considered a good source for IPSC (Induced Pluripotent Stem Cells), drug testing, molecular studies in other applications. To realize the cryopreservation, is used as a cryoprotectant glycerol or dimethylsulfoxide (DMSO) in suspension and storage at - 80°C (Hiemstra et al. 2005). After having conditioned in germplasm banks, the somatic cells can be used for cloning, for example (Silva et al. 2012).

Cryopreservation of spermatozoids

Among the ex situ techniques, the main is the cryopreservation of male gametes. The collection techniques are mainly eletroejaculation, rectal massage and artificial vagina, and the main cryoprotectants based on glycerol, with effective results in wild species such as impalas, giraffes, and buffaloes, among others. Testicular biopsy is an elective methodology for the collection of material for physiology and reproductive pathologies study in wildlife, providing enough material for histological analysis (Lopate et al. 1989, Threlfall & Lopate 1993, Attia et al. 2000, Crosta et al. 2003, Azevedoet al. 2006, Mascarenhaset al. 2006, Guião--Leiteet al. 2006, Bittencourtet al. 2007).

The differences in the effectiveness of the cryopreservation technique seem to be due the particularities of each species and have been described with success in the cryopreservation of gametes of wild cat, jaguar, leopard, cathetus and monkeys. A new technique still in development and has been getting the attention, it consists in isolate the spermatozoids from the epididymis from cryopreservation. Nowadays the most common form is to obtain the gametes from epididymis of dead animals, leaving the testicle and cooling before the extraction this new technology can an alternative (Costa & Martins 2008).

Cryopreservation of embryos

The cryopreservation of embryos is the most successful instrument in the preservation of genetic resources of wild animals. This technique depends of factors such as the origin of the embryo (in vivo or in vitro), the stage of development at the moment of freezing and the specie (Silva et al. 2012), more recently appeared as an alternative to conventional cryopreservation process of vitrification of the oocytes and embryos. This technique uses less equipment and has high applicability in the field, and the direct transition from solid to liquid phase, which results in no formation of ice crystals which damage the cell, preserving the embryo with more effectiveness (Costa & Martins 2008). The cryoprotectant elected continues, however, the ethylene glycol, due to its low toxicity and high permeability (Silva et al. 2012).

Cryopreservation of oocytes

The cryopreservation of female gametes is extremely important, which may be carried out storage of ovarian tissue, the isolated follicles or oocytes from mature or immature (Silva et al. 2012). Currently, there is significant progress with fast protocols in cryopreservation of oocytes for recovering viable oocytes after freezing and thawing. (Costa & Martins 2008).

The gametes can be obtained easily by follicular puncture, ovarian tissue biopsy, ovariectomy or ovarian harvest immediately post mortem. For conservation, the most frequently used solution is coconut water in refrigerated powder by a maximum of 36 hours and cryopreservation slow freezing, which can be used in low concentrations of cryoprotectants. This technique is the gradual temperature decrease, controlled by a programmable freezer (Silva et al. 2012).

DISCUSSION AND CONCLUSION

The biological diversity is the key for sustaining life as we know it and there is no doubt that the habitat destruction is the main factor responsible for the reduction of biodiversity or the total number of species that exist on the planet (Loskutoff 1998). The genetic material of any animal can be lost at any time per animal death, a reduction in their genetic heritage (gene pool) and possibly a loss of important genes for the species. In this case, efforts can be made through the use of assisted reproduction techniques to prevent total loss of genetic material of importance (Martins et al. 2007).

Regardless of the risk of extinction, conservation must be carried out not only by the law of the animals have to exist, but also for possible applications in humanitarian activities. Species of plants and animals that may be useful in the future are being lost before such usefulness is tested for humans (Wilson 1997).

Extinction is a slow and natural process that should keep balance in the number of speciation, mutations and changes to the frequencies of the alleles that generate new species. The excessive operating environment causes the reduction of biodiversity, since the extinction ratio becomes greater than speciation. The current loss of species is unprecedented and may be irreversible (Primack & Rodrigues 2001).

Therefore, technological advances in the conservation area have contributed to the generation of germplasm banks, and have an exceptionally important for the perpetuation of the species at risk of extinction. Due to significant biodiversity both, animal and vegetable, in Brazil, the

germplasm banks have been the subject of great interest in the preservation and maintenance of the genetic patrimony.

To ensure a minimum biodiversity and the maintenance and perpetuation of the species, it is necessary the appropriate manipulation of the populations, with that it is used alternative strategies for the preservation of the biodiversity, where the creation of germplasm banks is stood out as an alternative for the conservation of threatened species. The technique has been assuming as an addition importance for the maintenance and preservation of the Brazilian fauna, contemplating the cryopreservation of somatic cells as testicular cells, follicular and fibroblasts, long-term in order to conserve their genetic resources as an important material for further research. Several banks appeared in the last years with the intention of preservation of the Brazilian fauna, but they are still many necessary studies in that area and investments for a fauna warranty. It is stood out although the best form of maintenance of the fauna continues being the preservation of the natural atmospheres of those animals.

Acknowledgements.- The authors would like to thank the graduate students Fabio Sergio Cury and Kelly Cristine Santos Roballo for the collaboration and technical assistance and the financial support of CNPq (Proc. 449708/2014-4) and FAPESP (2013/09392-9).

REFERENCES

Attia K.A., Zaki A.A., Eilts B.E., Paccamont D.L., Hosgood G., Dietrich M.A., Horohov D.W. & Blowin D.C. 2000. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. Theriogenology 53:1355-1363.

Azevedo M.H.F., Paula T.A.R., Matta S.L.P., Fonseca C.C & Neves M.T.D. 2006. Morfologia testicular e túbulo seminífero da onça pintada (*Panthera onca*). Revta Ceres 53(307):374-381.

Bielanski A. & Vajta G. 2009. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. Human Reprod. 24(10): 2457-2467.

Bittencout V.L., Paula T.A.R., Matta S.L.P., Fonseca C.C., Costa D.S., Benjamin L.A. & Costa E.P. 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatic production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus* Illiger, 1811). Micron 38:584-589.

Castro A.C.S., Bernedson W.E. & Cardoso F.M. 1997. Kinetics and quantification of spermatogenesis: morphological basis its application in studies of mammalian reproduction. Revta Bras. Reprod. Anim. 21(1):25-34.

Costa P.M. & Martins C.F. 2008. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de Reprodução. Ciênc. Saúde, Univ. Brasília, 6(1):39-55.

Crosta L., Gerlach H., Burckle H.M. & Timossi L. 2003. Physiology, diagnosis and diseases of the avian reproductive tract. Vet. Clin. Exotic Anim. Pract. 6:57-83.

Dyce R.M., Sack W.O. & Wensing C.J.G. 2004. O Tratado de Anatomia Veterinária. Vol.3. Elsevier, Rio de Janeiro. 816p.

Ewing L.L., Zirbin B.R. & Cochran R.C. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. Endocrinology 105(5):1135-1142.

Guião-Leite F.L., Paula T.A.R., Matta S.L.P., Fonseca C.S., Neves M.T. & Barros J.B.G. 2006. Cycle and duration of the seminiferous ephiteliumin puma (*Puma concolor*). Anim. Reprod. Sci. 91:307-316.

Hiemstra S.J., Van der Lende T. & Woelders H. 2005. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies, p.45-60. In: Ruane J. & Sonnino A. (Eds), The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources. Vol.1. FAO, Rome.

Holt W.V. & Pickard A.R. 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. Institute of Zoology, Regent's Park, London, 4(3):143-150.

Horst E.K. & Hans G.L. 2011. Anatomia dos Animais Domésticos: texto e atlas colorido. 4ª ed. Artmed, São Paulo. 411p.

Houghton J.T., Ding Y., Griggs D.J., Noguer M., Van Der Linde P.J., Dai X., Maskell K. & Johnson C.A. 2001. Climate Change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, UK. 944p.

Liu K., Rajareddy S., Liu L., Jagarlamudi K., Boman K., Selstam G. & Reddy P. 2006. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. Dev. Biol. 299:1-11.

Lopate C., Threlfall W.R. & Rosol T.J. 1989. Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. Theriogenology 32:585-602.

Lokustoff N.M. 1998. Biology, technology and strategy of genetic resource banking in conservation programs for wildlife, p.275-286. In: Lauria A., Gandolfi L. & Gianaroli L. (Eds), Gametes: development and function. Serono Symposia, Rome.

Mariante A.S., Albuquerque M.S.M., Egito A.A., McManus C., Lopes M.A. & Paiva S.R. 2009. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. Embrapa Genetic Resources and Biotechnology 1(20):204-212.

Martins C.F., Rumpf R., Pereira D.C. & Dode M.N. 2007. Cryopreservation of epidydimal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. Anim. Reprod. Sci. 101:326-331.

Mascarenhas R.M., Paula T.A.R., Carreta J.R.M., Ribeiro E.C.S., Borboleta R. & Matta S.L.P. 2006. Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índice de células de Sertoli em cães. Revta Ceres 53(305):100-105.

Ministério do Meio Ambiente 1998. Convenção sobre Diversidade Biológica. Artigo 9, Conservação "Ex-situ", MMA, Brasília, DF. 37p.

Primack R.B. & Rodrigues E. 2001. Biologia da Conservação. Planta. Londrina. 327p.

Santos F.R., Guimarães P.E.M. & Redondo R.A.F. 2002. Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade. Lundiana 3(2):93-98.

Silva A.R., Souza A.L.P., Santos E.A.A., Lima G.L., Peixoto G.C.X., Souza P.C. & Castelo T.S. 2012. Formação de Bancos de Germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no brasil. Ciência Animal 22(1):219-234.

Threlfall W.R & Lopate C. 1993. Testicular biopsy, p.943-949. In: McKinnon A.O. & Voss J. (Eds), Equine Reproduction. Blackwell Publishing, Philadelphia.

Wilson E.O. 1997. Biodiversidade. Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 657p.