

AUGUSTO LUIZ FAINO ALVES

MÉTODOS DE COLETA, AVALIAÇÃO E PRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
PACAS (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) (CUNICULIDAE)
EM DOIS DIFERENTES DILUENTES

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

RIO BRANCO
ACRE – BRASIL
MARÇO-2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

A474m Alves, Augusto Luiz Faino, 1992-

Metodos de coleta, avaliação e preservação de sêmen de Pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766) em dois diferentes diluentes / Augusto Luiz Faino Alves. – 2018.

62 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, 2018.

Incluem referências bibliográficas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Vânia Maria França Ribeiro

1. Pacas. 2. Animais silvestres. 3. Biotecnologia. I. Título.

CDD: 639.3

Bibliotecária: Maria do Socorro de Oliveira Cordeiro CRB-11/667

AUGUSTO LUIZ FAINO ALVES

MÉTODOS DE COLETA, AVALIAÇÃO E PRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
PACAS (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) (CUNICULIDAE)
EM DOIS DIFERENTES DILUENTES

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA: 12 de março de 2018.

Prof. Dr. Jefferson Viana Alves Diniz
IFAC

Prof. Dr. Rafael Augusto Satrapa
UFAC

Profa. Dra. Vânia Maria França Ribeiro
UFAC
(Orientadora)

A Deus, primeiramente.
A minha mãe, Silwâny Alves Faino.
Ao meu Pai, José Alves Neto.
A minha irmã, Karine Faino Alves.
A minha orientadora, Dra. Vânia Maria França Ribeiro.
Aos meus familiares e amigos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar saúde e disposição para vencer os obstáculos.

À minha mãe por estar sempre disposta a me auxiliar e consolar em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e foram à base para tudo que realizei nestes anos.

À minha orientadora, por estes anos de apoio e ensinamentos, e ao meu Co-orientador, Dr. Fernando de Andrade Souza pelo auxílio prestado.

Aos amigos pelas horas de alegria e descontração.

A Universidade Federal do Acre (UFAC) e ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental (PPGESPA) pelas oportunidades oferecidas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

*“Entregue seu caminho ao senhor,
confia nele e o mais ele fará.”*

Salmos:37-5

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFAC

Título do projeto: Métodos de coleta, avaliação e preservação de sêmen de pacas
(*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) em dois diferentes diluentes.

Processo número: 23107.007421/2017-25

Protocolo número: 14/2017

Responsável: Prof^a. Dr^a. Vânia Maria França Ribeiro

Data de aprovação: 06/06/2017

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Água de coco em pó
HOST	Teste hiposmótico
Kg	Quilograma
Mg	Miligramas
ml	Mililitros
mOsm/L	Miliosmol por litro
Moti.	Motilidade
V	Volt
Vol.	Volume
µl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Paca fêmea adulta criada em cativeiro.....	4
Figura 2. A- Remoção de fezes. B- Limpeza da região inguinal de pacas macho.	18
Figura 3. a - Testículos retirados imersos em solução salina; b- Temperatura de 39°C para transporte do material até o laboratório; c- Epidídimo dissecado, disposto em placa de Petri; d- Corpo e cauda do epidídimo imersos em 1ml de diluente e recebendo cortes transversais.	20
Figura 4. Cabeças isoladas observadas no HOST a partir de 10min de incubação a 39°C.	32
Figura 5. Aglomeração de células espermáticas observadas no HOST após 15min de incubação a 39°C.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios (\pm DP) do volume, concentração, motilidade e vigor observados em dois momentos utilizando a técnica de eletroejaculação em pacas.	23
Tabela 2 - Tabulação de volume, cor, motilidade, vigor e concentração dos ejaculados obtidos na primeira semana de eletroestimulação de pacas macho em cativeiro.	24
Tabela 3 - Tabulação de volume, cor, motilidade, vigor e concentração dos ejaculados obtidos na segunda semana de eletroestimulação de pacas macho em cativeiro.	24
Tabela 4 - Valores médios (\pm DP) da motilidade, vigor, integridade de membrana e resposta osmótica dos espermatozoides epididimários da paca diluídos em água de coco (ACP123) e um diluente à base de leite (Botusemen special®).....	29
Tabela 5 - Valores médios (\pm DP) da motilidade, vigor, integridade de membrana e resposta osmótica das amostras de espermatozoides resfriados à 5°C em dois tipos de diluentes após 24h de armazenamento.	30
Tabela 6 - Comparação entre volume, concentração, motilidade e vigor das amostras coletadas através da eletroejaculação e recuperação epididimária com água de coco e diluente comercial à base de leite.	34

RESUMO

ALVES, Augusto Luiz Faino. Universidade Federal do Acre, Março de 2018. **Métodos de coleta, avaliação e preservação de sêmen de pacas (*Cuniculus paca* Linnaeus,1766) (Cuniculidae) em dois diferentes diluentes.** Orientador: Vânia Maria França Ribeiro, Co-orientador: Fernando de Andrade Souza. O objetivo deste estudo foi de avaliar a eficiência de dois métodos de coleta de sêmen de pacas, bem como, avaliar dois diluentes (ACP 123 e Botusemen special®) na conservação de espermatozoides desta espécie. Ao todo, sete animais foram submetidos a dois métodos para recuperação espermática: a eletroejaculação e a recuperação de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo por flutuação. Este último, com diluição em dois meios: ACP123 e Botusemen special®. O protocolo anestésico foi feito com acepromazina 1% (0,1 mg/kg/IM) e associação de quetamina (20mg/kg) e xilazina (1,5mg/kg). As amostras coletadas pelo método de eletroejaculação obtiveram volume médio de 0,43ml ($\pm 0,33$ DP), concentração média de $45,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml ($\pm 42,44$ DP) motilidade de 33,33% ($\pm 32,14$ DP) e vigor médio de 2,6 ($\pm 1,15$ DP). As amostras obtidas diretamente da cauda do epidídimo tiveram volume médio de 1,5ml, concentração média de $197,1 \times 10^6$ espermatozoides/ml ($\pm 84,9$ DP), sendo as médias da motilidade e vigor do diluente ACP 123, 63,8% ($\pm 34,2$ DP) e 4,2 ($\pm 1,7$ DP) respectivamente. Por outro lado, as amostras diluídas em Botusemen Special® apresentaram motilidade média de 29,8% ($\pm 34,2$ DP) e vigor médio de 2,4 ($\pm 1,9$ DP). A integridade de membrana dos espermatozoides quando diluídos com ACP 123 foi conservada em 84% ($\pm 0,07$ DP) e a viabilidade de membrana mantida em 53,9% ($\pm 3,78$ DP), enquanto o diluente Botusemen special® manteve 73% ($\pm 0,21$ DP) das células espermáticas integras e 39% ($\pm 17,9$ DP) de membranas viáveis. Os resultados foram comparados pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney e descritos por médias e desvio padrão. Conclui-se, portanto que, a coleta epididimária obteve melhores resultados com relação aos parâmetros espermáticos em comparação ao protocolo de eletroejaculação. As avaliações dos diferentes diluidores indicaram que o diluente ACP-123 proporcionou melhor viabilidade espermática em comparação com o diluente comercial Botusemen special®, porém, ambos os compostos não conservaram as amostras espermáticas até o tempo de 24h.

Palavras-chave: Animais silvestres, Biotecnologia, Refrigeração, Eletroejaculação, Espermatozoides epididimários.

ABSTRACT

ALVES, Augusto Luiz Faino. Universidade Federal do Acre, March 2018. **Methods of collection, evaluation and preservation of paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) (Cuniculidae) semen in two different diluents.** Advisor: Vânia Maria França Ribeiro, Co-advisor: Fernando de Andrade Souza. The objective of this study was to evaluate the efficiency of two methods of collecting semen from bales and to evaluate two diluents (ACP 123 and Botusemen special[®]) in the conservation of spermatozoa of this species. In all, seven animals were submitted to two methods of sperm retrieval: the electroejaculation and the recovery of the spermatozoa directly from the tail of the epididymis by flotation. The latter, with dilution in two media: ACP 123 and Botusemen special[®]. The anesthetic protocol was performed with acepromazine 1% (0.1 mg/kg/IM) and combination of ketamine (20 mg/kg) and xylazine (1.5 mg/kg). The samples collected by the electroejaculation method obtained an average volume of 0.43 ml (± 0.33 DP), mean concentration of 45.5×10^6 spermatozoa/ml (± 4.44 DP), motility of 33.33% (± 32.14 DP) and mean vigor of 2.6 (± 1.15 DP). Samples obtained directly from the tail of the epididymis had a mean volume of 1.5 ml, mean concentration of 197.1×10^6 spermatozoa/ml (± 84.9 DP). The mean motility and vigor of the ACP 123 diluent, 63.8% (± 34.2 DP) and 4.2 (± 1.7 DP), respectively. On the other hand, the samples diluted in Botusemen Special[®] presented mean motility of 29.8% (± 34.2 DP) and mean vigor of 2.4 (± 1.9 DP). Sperm membrane integrity when diluted with ACP 123 was conserved at 84% (± 0.07 DP) and membrane viability maintained at 53.9% (± 3.78 DP), while Botusemen special[®] Diluent maintained 73% (± 0.21 DP) of whole spermatozoa and 39% (± 17.9 DP) of viable membranes. The results were compared by the Wilcoxon-Mann-Whitney test and described by means and standard deviation. It was concluded, therefore, that the collection of the epididymis obtained better results in relation to the sperm parameters compared to the protocol of electroejaculation. The evaluations of the different diluents indicated that the ACP-123 diluent provided better sperm viability when compared to the commercial diluent Botusemen special[®], however, both compounds did not retain the sperm samples for up to 24h.

Keywords: Wild animals, Biotechnology, Refrigeration, Electro-ejaculation, epididymis spermatozoa.

SUMÁRIO

págs.

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A paca	3
2.2 Interesse comercial.....	4
2.3 Aspectos reprodutivos da paca.....	5
2.4 Anatomia reprodutiva do macho.....	6
2.5 Espermatogênese.....	7
2.6 Biotecnologias para processamento de sêmen	8
2.6.1 Eletroejaculação	9
2.6.2 Uso de espermatozoides epididimários.....	10
2.7 Métodos de obtenção de espermatozoides da cauda do epidídimo.....	11
2.7.1 Métodos com necessidade de orquiectomia	11
2.7.1.1 Técnica de fluxo retrógrado	11
2.7.1.2 Método de flutuação	11
2.7.1.3 Método de perfuração	12
2.7.2 Métodos sem a necessidade de orquiectomia	12
2.7.2.1 Técnica de aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo.....	12
2.7.2.2 Aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo	13
2.8 Resfriamento do sêmen	13
2.9 Avaliação da viabilidade	15
2.9.1 Integridade da membrana	15
2.9.2 Funcionalidade da membrana	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Anestesia	18
3.2 Eletroejaculação.....	18
3.3 Flutuação	19
3.4 Testes de viabilidade	21
3.4.1 Teste da resposta osmótica (teste hiposmótico)	21
3.4.2 Teste de integridade de membrana.....	21
3.5 Resfriamento.....	22
3.6 Análise Estatística.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Eletroejaculação.....	23
4.2 Espermatozoides epididimários	28
4.3 Testes de viabilidade	31
4.3.1 Viabilidade espermática	31
4.3.2 Integridade da membrana	33
4.4 Comparativo de duas Técnicas de coleta de sêmen em pacas.....	34
5 CONCLUSÃO.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a criação e comercialização de produtos e subprodutos da fauna silvestre brasileira são regulamentadas pela IN IBAMA Nº 7, de 30 de Abril de 2015. A criação de pacas na forma de agricultura familiar pode ser importante economicamente, considerando que já existe o hábito da população em consumir carne de animais silvestres e um mercado para carnes exóticas.

Na América Latina, a paca está entre as espécies mais caçadas, principalmente por causa de sua carne, cotada como a mais apreciada entre todas as carnes de caça (SANTOS, 1984; DEUTSCH; PUGLIA, 1988).

Correntes conservacionistas atuais apontam a criação de animais silvestres com finalidade comercial como um dos caminhos para a preservação de algumas espécies da fauna brasileira (HOSKEN, 1999).

Entretanto, para que se obtenha sucesso com empreendimentos dessa natureza é necessário que os padrões de criação de animais silvestres se assemelhem aos da criação de animais domésticos, o que se consegue após sua domesticação (MASON, 1984; NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 1999)

Com relação à domesticação da paca, diversos autores, (NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 1999; HOSKEN; SILVEIRA, 2001; LAMEIRA, 2002, RIBEIRO; ZAMORA, 2008) relataram experiências exitosas na criação e domesticação desta espécie em cativeiro.

Guimarães et al. (2008), relatam que fêmeas de pacas reproduzem bem em cativeiro, indicando uma adaptação satisfatória a esse sistema de criação. O conhecimento sobre o manejo reprodutivo em cativeiro significa atender à crescente demanda deste sistema alternativo de produção animal existente no setor econômico.

De acordo com Lameira (2002), a implantação de técnicas de manejo adequadas e da biotecnologia permitirá a seleção genética que resultará no aumento da eficiência reprodutiva e produtiva deste animal.

A biotecnologia destinada ao sêmen permite disseminar e preservar o material genético de diferentes espécies. Atualmente a eletroejaculação é o método de eleição para a coleta de sêmen em animais silvestres (TEBET ET al. 2006). O uso de espermatozoides epididimários também apresenta resultados positivos em diversas espécies, dentre elas os homens (BORGES et al., 1998), veados (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006), equinos (MONTEIRO, 2009), bovinos (BERTOL, 2012), cães (ANGRIMANI et al., 2013), gatos (EMERECIANO et al., 2013) e cutias (CASTELO, 2015).

O uso de biotécnicas reprodutivas, como a criopreservação de sêmen, apresenta relevante potencial como ferramenta para a conservação e permite a perspectiva para a implantação de programas de inseminação artificial e difusão de germoplasma dos animais zootecnicamente superiores entre criatórios distantes (CASTELO, 2015).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de um protocolo de eletroejaculação e a flutuação como método de recuperação epididimária de espermatozoides de paca, bem como, avaliar dois diluentes (ACP 123 e Botusemen special[®]) de refrigeração na conservação de espermatozoides epididimários desta espécie a 5°C.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A paca

A paca (*Cuniculus paca*) é considerada um dos maiores roedores do Brasil. Segundo Bonilla-Morales et al. (2013), possuem a seguinte escala zoológica: Reino: Animal; Filo: Chordata; Subfilo: Vertebrata; Classe: Mammalia; Ordem: Rodentia; Subordem: Hystricomorpha; Superfamília: Cavioidea; Família: Cuniculidae; Gênero: *Cuniculus*; Espécie: *Cuniculus paca*.

A distribuição geográfica desta espécie compreende os seguintes países: Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Costa Rica, Equador, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, México (leste e sul), Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Trindade e Tobago, Uruguai, Venezuela e a República Boliviana; além destes países, a paca foi incluída nas faunas de Algéria e Cuba (EMMONS, 2016).

É uma espécie noturna e ocupa preferencialmente florestas úmidas, contudo ocorre em uma variedade de locais, podendo ser encontradas em manguezais, florestas decíduas e semidecíduas, usualmente procuram áreas florestadas próximas a cursos de água (BORGES, 2004; ZUCARATTO et al., 2010).

Caracterizam-se pelo seu pelame duro e eriçado, vermelho com manchas brancas, apresentam peso de 7 a 10kg para ambos os sexos e comprimento médio de 60 a 70cm (CARRETA-JUNIOR, 2008; MONTEMEZZO, 2014; Figura 1). A paca é considerada generalista quanto a dieta, e alimenta-se principalmente de frutos disponíveis no decorrer das estações. Segundo Scotti (2010), a paca se alimenta de frutas, verduras, raízes, tubérculos e cereais. Zucaratto et al. (2010) citam ainda a importância da paca como semeadora de sementes, fato que contribui para a manutenção e regeneração das florestas tropicais.



Figura 1. Paca fêmea adulta criada em cativeiro.

2.2 Interesse comercial

A carne da paca vem sendo utilizada como fonte de proteína há várias décadas por populações indígenas e rurais. Segundo Hosken e Silveira (2001) e Ribeiro et al (2016) a paca é considerada a espécie que possui a carne mais apreciada de todas as espécies silvestres brasileiras.

Esse grande interesse tem causado impactos em populações de pacas, como relatado por Montemezzo (2014) a ação predatória de caçadores e degradação de florestas tem reduzido a população em toda América do Sul.

Estas afirmações também foram observadas por Ribeiro et al. (2016), que por meio de entrevistas a populares na cidade de Rio Branco/Acre, concluiu que a maioria das pessoas adquirem carne de animais silvestres por meio de caça ilegal apesar de conhecerem a legislação proibitiva.

Existe uma demanda ainda pouco explorada da carne de paca no mercado, sendo quase que integralmente suprida por produtos ilegais. Assim criatórios legalizados têm sido implantados para uso comercial da carne da paca (NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 1999; MONTEMEZZO, 2014).

Em estudo sobre o mercado para silvestres no estado do Paraná, Montenezzo (2014) destaca esta atividade como sendo uma opção viável para pequenos produtores que tendem a diversificar as atividades na propriedade afim de minimizar a concorrência com grandes proprietários de terras.

Para a escolha de animais silvestres que serão criados comercialmente, deve-se analisar seu potencial de produção, adaptação e rusticidade. Dentre elas a paca (*Cuniculus paca*) mostra-se adaptável ao cativeiro, com bons índices de produção, não reduzindo seu rendimento de reprodução em cativeiro (HOSKEN; SILVEIRA, 2001).

Os atrativos para novos criadores vêm do baixo custo de alimentação, necessidade de pouco espaço e de pouca mão de obra. Em sistemas intensivos a criação ocorre em baias, variando de 12 a 24 metros quadrados, mantendo uma divisão de cria, recria e terminação. Galpões de alvenaria são bastante viáveis, tendo facilidade de instalação (MATHIAS, 2014).

Atualmente no Brasil, existem três categorias de criação de pacas. A primeira delas é de subsistência, pois o produtor consome toda a carne produzida, ou vende alguns quilos eventualmente, nesta faixa de produção encontram-se 90% dos produtores atualmente. A segunda categoria é a intermediária, na qual o criador tem de 40 a 60 matrizes e abate animais duas ou três vezes ao ano, já tendo então início comercial. A terceira fase é de grande porte, criatórios com mais de 60 matrizes e abates regulares (HOSKEN, 2013).

2.3 Aspectos reprodutivos da paca

Os aspectos reprodutivos ainda não são completamente elucidados. Muitos estudos descrevem apenas as características morfológicas do aparelho reprodutivo desses animais (BORGES, 2004). Segundo Carretta-Junior (2008) a paca atinge a maturidade sexual aos 10 meses. Já em relatório SEMANART (2011), relata que a paca atinge a maturidade sexual quando chegam a 6,5 e 7,5kg, valores médios para fêmeas e machos respectivamente. As fêmeas apresentam cio por todo o ano, assim como a produção de esperma dos machos é contínua durante as estações do ano (RIBEIRO; ZAMORA, 2008; SEMANART, 2011).

O dimorfismo sexual é discreto, os machos apresentam um tamanho cerca de 15% maior que as fêmeas, o tamanho da mandíbula também difere, onde os machos possuem um arco zigomático mais pronunciado que as fêmeas, outra forma é a

exposição do pênis do macho através de uma simples compressão na porção inguinal (SEMANART, 2011).

Em estudo realizado por Guimarães et al. (2008), com fêmeas criadas em cativeiro, cita que a duração média de 20 ciclos estrais foi de 32,5 dias ($\pm 3,69$ DP) com variação de 24 a 42 dias. Bonilla-Morales et al. (2013) citam que o cio é de difícil identificação, pois os machos vigiam as fêmeas durante longos períodos e pelo sincronismo do cio que ocorre em um grupo de fêmeas.

O período de gestação é cerca de 150 dias (RIBEIRO et al., 2017), onde ao final, dão a luz a uma cria por vez, raramente ocorre parto de dois exemplares. A fêmea é capaz de gerar duas crias por ano (GUIMARÃES et al. 2008; BONILLA-MORALES et al., 2013).

2.4 Anatomia reprodutiva do macho

A paca macho apresenta: um pênis com prepúcio, um par de testículos envolvidos pelo escroto; um par de epidídimos; compostos de cabeça, corpo e cauda; um par de ducto deferente e uretra (BORGES, 2004; BORGES et al., 2013).

Borges et al. (2014), em estudo anatômico, descreveram que pacas macho apresentam quatro pares de glândulas genitais acessórias: vesicular, próstata, coaguladora, bulbouretral.

O corpo do pênis possui forma cilíndrica e é formado por dois tipos de tecidos eréteis: o corpo cavernoso e o corpo esponjoso, sendo que, o corpo cavernoso localiza-se dorsalmente e mostra-se revestido pela túnica albugínea desde a raiz do pênis (BORGES et al., 2013). Além disso, observa-se que a glândula apresenta uma dilatação arredondada, a qual denomina-se toro uretral ou flor peniana no momento da ereção (CARVALHO et al., 2008; MOLLINEAU et al., 2012).

As pacas e cutias possuem uma estrutura rígida com bordas serrilhadas e cortantes na lateral do pênis (CARVALHO et al., 2008; BORGES et al., 2013). Ao observar o aspecto dorsal de um corte longitudinal da glândula, Borges et al. (2013) observaram a presença de uma estrutura sacular, no qual estavam alojados dois esporões rígidos com extremidades livres pontiagudas.

Mollineau et al. (2006), em estudo, citam que tais estruturas provocam lesão na vagina durante a cópula, isso impede que a fêmea aceite novas cópulas. Borges et al. (2013), relatam que não existe informação na literatura especializada que indique a

relação entre estas espículas com a indução de ovulação nas fêmeas, como visto em outras espécies, dentre elas: coelhos, lhamas, alguns roedores e gatos.

Capivaras, pacas e cutias não apresentam um escroto propriamente definido. Os testículos localizam-se subcutaneamente na região inguinal, ainda possuem uma túnica cremastérica bem desenvolvida. Este fato, associado a um amplo canal inguinal permite uma ampla movimentação testicular para o interior da cavidade abdominal (CARRETA- JUNIOR, 2008; BORGES et al., 2013; CASTELO, 2015). O testículo pode ser mais evidente na época de reprodução, quando se relaxa e podem ser observados na região inguinal ao lado do pênis (MENEZES, 2003; COSTA, 2009; BARROS et al., 2016).

O epidídimo se estende ao longo de todo o testículo, possui consistência firme, é revestido por uma túnica albugínea, exceto a região da cauda. A cauda do epidídimo apresenta-se globulosa, grande e o ducto epididimário se mostra enrolado (BORGES et al., 2013). Entre o corpo do epidídimo e a margem epididimária do testículo, existe um espaço interposto, o seio do epidídimo, no qual se observa uma membrana serosa derivada do peritônio, o mesórquio distal, que mantêm o epidídimo fixo à margem epididimária do testículo (BORGES et al., 2013).

2.5 Espermatogênese

O processo espermatogênico já é bem conhecido em várias espécies, porém em pacas as informações são escassas (CARRETA-JUNIOR, 2008). A espermatogênese se baseia em complexas mudanças morfológicas e funcionais da chamada espermatogônia-tronco. O processo se divide em três fases: (1) Fase ploriferativa (espermatogonial): nessa fase, as células sofrem divisões mitóticas de forma rápida e sucessiva; (2) Fase meiótica (espermatócitos): ocorre nessa etapa duplicação do material genético, recombinação e duas divisões celulares sequenciais; (3) Fase de diferenciação (espermiogênica): Intensas modificações nas espermátides, levando a formação de espermatozoides (CARRETA-JUNIOR, 2008; COSTA, 2009; MONTEIRO et al., 2009; CARRETA- JUNIOR, 2012).

O ciclo espermático da paca é de 11,5 dias ($\pm 0,16DP$), e a duração da espermatogênese de 51,6 dias ($\pm 0,7DP$) (COSTA, 2009).

Carreta-Junior (2012), afirma que a espermatogênese na paca adulta, possui um ciclo de 8,57 dias, sendo a produção espermática diária por grama de testículo de $33,9 \times 10^6$.

Ao final da fase espermiogênica, os espermatozoides imaturos são liberados nos túbulos seminífero e encaminhados ao epidídimo, a medida que passam pelo epidídimo sofrem modificações para se tornarem aptos a fertilização. Ao final do processo os espermatozoides maduros são armazenados na cauda do epidídimo (SHIVAJI, 1988).

2.6 Biotecnologias para processamento de sêmen

Pacas em cativeiro são capazes de gerar em média duas crias por ano, porém em estudo realizado por Oliveira et al. (2003), determinaram que existem 10% de possibilidade de reabsorção embrionária e 30% de possibilidade de aborto.

As biotecnologias são empregadas em espécies domésticas para aumentar os índices reprodutivos. Mota filho e Silva (2012) citam que nos últimos anos têm surgido técnicas viáveis para a conservação de esperma de animais silvestres, assim garantindo a conservação da biodiversidade. No contexto da conservação e comércio de animais silvestres, a implantação de biotecnologias de reprodução tem ganhado força nos últimos anos.

Costa (2009), em estudo da espermatogênese de pacas e cutias, garante que ambos têm alta eficiência espermatogênica, devido à combinação de alta densidade de volume nos túbulos seminíferos, alto número de células de sertoli e uma espermatogênese curta. Por estas características, o autor concluiu que essas espécies são aptas a programas que visem aumentar os índices reprodutivos em cativeiro.

Espécies silvestres têm sido submetidas a estudos relacionados à coleta e conservação de esperma, dentre elas: Veados (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006), Cutias (MOLLINEAU et al., 2006; COSTA, 2009; CASTELO, 2015), Catetos (COSTA, 2009), Pacas (STRADIOTTI et al., 2015) e Capivaras (CARRETTA-JUNIOR, 2012), destacam-se por seu potencial de mercado.

As principais técnicas aplicadas para a coleta de espermatozoides de animais silvestres são a eletroejaculação e a recuperação de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo.

2.6.1 Eletroejaculação

A técnica da eletroejaculação consiste na introdução de uma sonda ou eletrodo no reto do animal, no local onde os nervos que suprem os órgãos reprodutores são estimulados, assim a voltagem é gradativamente aumentada e os estímulos são rítmicos e repetitivos (KOAWAGEM, 2009). O princípio desta técnica está no controle do reflexo ejaculatório através do controle do grau de estimulação elétrica sobre os nervos e a musculatura envolvida com o processo de ejaculação (CAZE, 2006). Os estímulos desencadeiam uma contração da musculatura lisa da região, em reação à estimulação dos nervos simpáticos lombares que formam o nervo hipogástrico, ocasionando a emissão e posterior liberação do sêmen (BALL, 1986).

Atualmente a eletroejaculação é a técnica mais difundida na coleta de espermatozoides de animais silvestres (TEBET et al., 2006). Severo (2017) cita que a eletroejaculação é adequada para colher sêmen de espécies em cativeiro, tanto em animais silvestres quanto em animais selvagens, uma vez que os animais podem ser sedados ou anestesiados, com boa resposta a estimulação.

Algumas espécies têm sido estudadas quanto aos protocolos adequados para a coleta por eletroejaculação como: Cutias (MOLLINEAU et al., 2008; MOLLINEAU et al., 2010; MARTINEZ et al., 2013; CASTELO, 2015), Paca (STRADIOTTI et al., 2015), Catetos (KAHWAGE et al., 2010), Queixadas (BARROS et al., 2017), Tatupeba (SOUSA et al., 2013), Puma (SOUZA, 2009), Capivara (RODRIGUEZ et al., 2012) entre outras.

O aparelho utilizado para gerar os estímulos é semelhante ao utilizado para animais domésticos, sendo que os eletrodos retais devem ser bipolares e com tiras longitudinais em cobre, o diâmetro do eletrodo vai variar de acordo com a espécie animal (HOWARD, 1993; PAZ, 2013).

Castelo e Silva (2015) relatam que na técnica de eletroejaculação devem ser considerados: as combinações anestésicas utilizadas nas diferentes espécies, os protocolos de estímulos elétricos e a variação individual como, por exemplo, o posicionamento e o tamanho da sonda, além da presença de fezes, para se obter o êxito na coleta. Estes autores ainda citam que os protocolos anestésicos devem promover uma boa analgesia, terem baixo custo e viabilizar a coleta sem a contaminação por urina.

Os protocolos mais utilizados nas espécies mamíferas são: xilazina associada com a cetamina, um anestésico dissociativo, lidocaína administrada por via epidural (SILVA, 2017).

Apesar de muito difundida em animais domésticos, no manejo reprodutivo de silvestres a técnica de eletroejaculação apresenta alta variabilidade nos resultados devido a inúmeros fatores, como a variação individual, estresse, resposta a anestesia, e resposta a estimulação (MARTINEZ et al., 2008).

2.6.2 Uso de espermatozoides epididimários

A obtenção de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo e ducto deferente consiste em uma técnica para os propósitos de reprodução assistida (MOTA FILHO; SILVA, 2012). Castelo (2015) relata que espermatozoides epididimários estão sendo considerados como potencial fonte de recursos genéticos valiosos para os bancos de gamoplasma. A obtenção de espermatozoides epididimários varia conforme a espécie, sendo dependente das dimensões do epidídimo e escolha do manipulador (BERTOL et al., 2012).

A coleta epididimária é vantajosa, pois os espermatozoides podem ser obtidos após o óbito do animal e destinados a protocolos de inseminação artificial a fresco ou criopreservação das amostras para posterior utilização, servindo de alternativa para animais de alto valor zootécnico (THOMASSEN; FARSTAD, 2009). A técnica também pode ser empregada em animais inaptos à reprodução, portadores de afecções que comprometam seu sucesso reprodutivo (AGRIMANI et al., 2013).

Estudos demonstraram que a recuperação de espermatozoides epididimários pode ser superior a quantidade obtida por vagina artificial (CARY et al., 2004).

Diversos autores têm comprovado a eficiência da recuperação de espermatozoides epididimários em protocolos de reprodução assistida em diferentes espécies dentre elas: cães (AGRIMANI et al., 2013; MOTA-FILHO et al., 2014), Gatos (EMERECIANO et al., 2013), Cutias (CASTELO, 2015), Preá (SILVA et al., 2017), Catetos (SILVA et al., 2017), Capivaras (BATALHA; OBA, 2006), entre outras, demonstrando que a técnica se mostra de grande valia para a conservação de gametas.

Muitas técnicas alternativas de recuperação dos espermatozoides epididimários são descritas na literatura. Estas são variáveis de acordo com o autor e a espécie animal (MOTA FILHO; SILVA, 2012).

2.7 Métodos de obtenção de espermatozoides da cauda o epidídimo

Existem cinco métodos básicos para a recuperação de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo (GUERRERO, 2006). Alguns métodos tem a necessidade da realização de orquiectomia dos animais, por morte ou impossibilidade de ejaculação natural, outros métodos não.

2.7.1 Métodos com necessidade de orquiectomia

Estes métodos são aplicados a animais acometidos de morte súbita ou ainda podem ser empregados em animais inaptos à reprodução, portadores de afecções que comprometam seu sucesso reprodutivo (AGRIMANI et al., 2013).

2.7.1.1 Técnica de fluxo retrógrado

Consiste em usar um meio líquido para gerar pressão nos vasos deferentes com o auxílio de uma seringa, fazendo com que os espermatozoides sejam carreados pela diluição até o corte realizado entre o corpo e a cauda epididimal (GUERRERO, 2006; MARTINEZ-PASTOR et al., 2006). Martinez-Pastor et al. (2006) consideram que esse tipo de coleta é a técnica mais indicada, pois apresenta um menor nível de contaminação e são de melhor qualidade em relação aos outros métodos. Por outro lado, essa técnica possui a limitação de ser usada comumente para animais de produção devido ao tamanho de epidídimo, além de ser mais complexa que as outras técnicas (MOTA FILHO; SILVA, 2012).

2.7.1.2 Método de flutuação

O método consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo longitudinalmente em placas de Petri, onde são expostos em meio gelatinoso para que os espermatozoides migrem para o meio, e posteriormente são recuperados por filtração (YU;LEIBO, 2002; GUERRERO, 2006). Em estudo realizado em gatos, Emerenciano et al. (2013) descreveram que a técnica permite que se recupere um bom volume de espermatozoides, podendo ser utilizado em usos posteriores. Esta técnica se mostra

como de eleição para animais pequenos, pois demonstra maior facilidade para a recuperação.

2.7.1.3 Método de perfuração

Consiste em alocar o epidídimo em uma placa de Petri, e com o auxílio de agulhas são realizadas perfurações nos ductos epididimários, posteriormente as amostras são filtradas e centrifugadas para diminuir detritos celulares (GUERRERO, 2006; MONTEIRO et al., 2011)

2.7.2 Métodos sem a necessidade de orquiectomia

Estas técnicas se diferenciam por não requerer a castração no indivíduo submetido ao procedimento. São amplamente difundidas na reprodução humana, visto que se apresentam como opções para pacientes diagnosticados com azoospermia.

2.7.2.1 Técnica de aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo

A técnica de aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo (MESA), como descrita por Bernie et al. (2013), consiste em procedimento cirúrgico para exposição do epidídimo. Em seguida o túbulo epididimal é perfurado para a coleta de espermatozoide. O volume coletado em humanos pode chegar a 20ml, a coleta é armazenada em pipetas, e posteriormente diluída em meios adequados. Após a coleta, o epidídimo é selado com auxílio de bisturi elétrico, garantindo a hemóstase. Devidamente suturadas, todas as camadas do epidídimo e testículo, retornarão a sua posição normal. O paciente recebe cuidados pós-operatórios, evitando dor e edema na região escrotal. Monteiro et al. (2009), afirmam que esta técnica é um grande avanço em combate com a infertilidade.

Silber et al. (2013) citam a técnica como solução para casos de homens azoospérmicos obstrutivos irreparáveis. O autor ainda relata que uma vantagem do método é a possibilidade de conservação do sêmen, evitando assim a necessidade de novos procedimentos cirúrgicos.

2.7.2.2 Aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo

A técnica consiste em uma anestesia local, onde uma agulha de calibre 25G ou 30G (preconizado para humanos) é inserida na cauda do epidídimo e com a realização de pressão negativa os espermatozoides são sugados para a seringa. Este procedimento deve ser repetido até se obter volume satisfatório, com máximo de quatro repetições (YAFI; ZINI, 2013). Os autores ainda relatam que a técnica de PESA se destaca por ser menos invasiva que outras técnicas empregadas para a recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo.

Borges et al. (1998) também classificam a técnica como sendo uma boa alternativa para a recuperação de espermatozoides, destacando que essa técnica é de fácil realização, rápida e de baixo custo.

2.8 Resfriamento do sêmen

A conservação de espermatozoides por longos períodos é uma importante ferramenta na preservação da variabilidade genética de populações ameaçadas (CASTELO, 2015).

A redução da temperatura do sêmen auxilia na sua conservação por diminuição do crescimento bacteriano, redução do metabolismo espermático e consequente controle da acidificação do meio diluidor, além da diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente quando associados a baixas temperaturas com redução de oxigênio, favorecendo o metabolismo espermático anaeróbico e não aeróbico (KATILA et al., 1997; SQUIRES et al., 1999).

O resfriamento do sêmen tem como objetivo diminuir o metabolismo dos espermatozoides durante sua conservação, prolongando a sua vida útil (ENGLAND; PONZIO, 1996). Para que este procedimento alcance êxito deve-se levar em consideração vários fatores como: a escolha dos diluidores, taxa de diluição adequada, curva de resfriamento e manutenção de uma temperatura específica durante o armazenamento (ALMEIDA, 1998).

Os principais diluentes utilizados consistem no Tris (tris-hidroximetil-aminometano) e TES (ácido sulfônico N-tris-hidroximetil-metil-2-aminometano) (LI et al., 2005). Comumente diluentes alternativos têm sido empregados, como diluentes

a base de água de coco em pó (SILVA et al., 2011), a base de gema de ovo, a base de leite e derivados ou *in natura* (CANISSO, 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

A água de coco em pó (ACP) é um diluente natural, estéril e ácido, que tem sido empregada no processamento de diluição do sêmen de diversas espécies com resultados satisfatórios, além de apresentar vantagens como: o fácil preparo, baixo custo e características bioquímicas similares às da água de coco *in natura* (BARROS; TONIOLLI, 2011; MELO, 2015).

Salgueiro e Nunes (2012) relataram que a água de coco tem sido aplicada frequentemente na reprodução animal conforme observado nos estudos de preservação seminal em animais domésticos como suínos, caninos, equinos, coelhos, caprinos, ovinos, bovinos, bufalinos, galos, felídeos, peixes de água doce como tambaqui, carpa, pirapitinga, além de animais silvestres como o macaco-prego. Em sêmen de cutia, o uso da água de coco se mostrou eficaz no processamento e criopreservação (SILVA et al., 2011).

As biotecnologias em animais domésticos de grande importância reprodutiva têm a vantagem de possuírem diluentes comerciais específicos para cada tipo de situação pretendida pelo proprietário, seja, sêmen resfriado, criopreservação ou inseminação *in natura*. Dentre os diluidores comerciais, destacam-se os baseados em proteínas do leite.

O leite é rico em lipoproteínas, e possui a função de estabilizar elementos proteicos da membrana da célula espermática (OLIVEIRA et al., 2013). As principais proteínas do leite são as caseínas (80% do total de proteínas do leite), elas aparecem em grandes agregados coloidais denominados micelas. Outras proteínas do leite são chamadas coletivamente proteínas de soro do leite (20% de proteínas totais do leite) (CASTRO, 2014). As caseínas assim como os lipídios, ligam-se fortemente com íons Cálcio (Ca^{2+}), o que impede acúmulo intracelular de quantidades tóxicas de Cálcio, que causam danos nas membranas (HOCHACHKA, 1986).

Canisso (2008) destaca a inclusão de antibióticos a fim de aumentar a vida útil dos espermatozoides. Silva Filho (1994) destaca que o diluidor de escolha idealmente deve proporcionar: pressão osmótica compatível com o espermatozoide; apropriado equilíbrio mineral e adequada combinação de nutrientes; sistema com capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos; substâncias com capacidade protetora para as variações de temperatura, principalmente para o frio; capacidade de estabilização de membranas e sistemas enzimáticos; livre de microrganismos patogênicos; baixo custo;

não oferecer toxicidade ao espermatozoide; baixa irritabilidade ao aparelho genital e fácil aquisição.

Em estudo com espermatozoides epididimários de garanhões, Monteiro et al. (2009) concluíram que espermatozoides coletados da cauda do epidídimo podem ser utilizados com êxito em biotecnologias de reprodução, e que a criopreservação possibilita a utilização desse material futuramente.

Castelo (2015) em estudo comparativo sobre a criopreservação de espermatozoides obtidos por eletroejaculação e recuperação epididimária em cutias, concluiu que não houve diferença significativa entre os protocolos, mesmo após o descongelamento.

2.9 Avaliação da viabilidade

A integridade e funcionalidade da membrana espermática são cruciais para a avaliação da viabilidade e capacidade de fertilização do espermatozoide (CHAPON, 2012; SNOECK et al., 2014). As membranas, plasmática e acrossomal são essenciais para os processos de capacitação, de reação acrossomal, ligação com a zona pelúcida e de fusão dos gametas (NEILD et al., 2000).

2.9.1 Integridade da membrana

Arruda et al. (2011), destacam que as membranas espermáticas são estruturas que exercem funções importantes na fecundação e a integridade destas pode ser avaliada por diversas técnicas, entre estas , a dupla coloração Eosina (corante vital que não penetra células intactas) e a Nigrosina (contraste mais escuro de fundo que permite a visualização de células vivas), é das mais utilizadas a campo, pois quando realizado um esfregaço de sêmen e submetidos a esta coloração, as células com membranas lesionadas se coram em rosa ou roxo, enquanto as células viáveis não se coram.

2.9.2 Funcionalidade da membrana

Em relação a funcionalidade da membrana, Mello (1999) considera que a avaliação da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide, através do teste hiposmótico, é considerada um indicador de fertilidade por ser um requisito básico para a fertilização.

Snoeck et al. (2014) citam que o teste se baseia no transporte de fluídos através da membrana intacta sob condições hiposmóticas até que seja alcançado o equilíbrio osmótico entre os meios interno e externo. Os autores ainda relatam que esse transporte ocorre quando a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática estão presentes. Com o influxo da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda, este dobramento de cauda é facilmente visualizado pelo avaliador com auxílio de microscópio óptico (JEYENDRAN et al., 1984, CHAPON,2012).

Estes métodos de avaliação tendem demonstrar a eficácia ou não de métodos de coleta e conservação de espermatozoides de diversas espécies, sendo de grande importância para a aplicação de técnicas reprodutivas em animais domésticos e silvestres.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados sete pacas machos em idade reprodutiva, devidamente identificados por chip (subcutâneo) provenientes do criatório de pacas do programa de Criação e Pesquisa de Animais Silvestres – Caboclinho da Mata (registro no IBAMA, número 509309), localizado na BR364, km 30, no município de Senador Guiomard, Acre (10°03'22,2''S, 67°36'03,1''W).

Os sete animais possuíam eficiência reprodutiva comprovada por cópulas anteriores ao início da pesquisa. Os animais selecionados foram vermifugados, avaliados quanto à saúde física e isolados em baias de chão batido, com área medindo 12m². A alimentação diária era composta por frutas, folhas, raízes e grãos, além da oferta de sal mineral.

Todos foram submetidos a dois métodos para recuperação espermática, o primeiro sendo a eletroejaculação, baseada no protocolo de Stradiotti et al. (2015) e posteriormente a recuperação de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo, tendo como método de eleição a flutuação.

3.1 Anestesia

Para o procedimento de eletroejaculação, foi necessário o uso de procedimento anestésico. Este foi baseado no protocolo descrito por Stradiotti et al. (2015), onde os autores também realizaram eletroestimulação para coleta de espermatozoides em pacas.

Inicialmente, os animais eram contidos com auxílio de puçá (rede de captura), após uma breve avaliação física e pesagem era dado início ao protocolo anestésico que consistia em uma pré-anestesia feita com acepromazina 1% na dose de 0,1mg/kg. Após 5min era feita a indução com quetamina na dose de 20mg/kg e xilazina na dose de

1,5mg/kg. Os animais eram avaliados quanto aos parâmetros vitais, miorelaxamento e capacidade de reflexo motor.

3.2 Eletroejaculação

A aplicação deste método foi realizada em dois momentos em cada animal, sendo o intervalo entre os procedimentos de sete dias.

O protocolo de estímulos eletroejaculatórios foi baseado no trabalho de Stradiotti et al. (2015). O aparelho utilizado foi fabricado seguindo as especificações dos autores supracitados - eletroejaculador SA - 200 (Eletrogen AS 200, Champion Co.) com capacidade de voltagem de 0 a 10V, regulagem manual e banana longitudinal de 13cm de comprimento e dois eletrodos longitudinais de 6cm.

Após a completa sedação dos animais, os mesmos eram transportados para o centro cirúrgico do projeto. Na sala previamente preparada, era feita a leitura do chip de identificação dos animais. Em seguida, passavam por limpeza da região inguinal, incluindo a lavagem do pênis, com soro fisiológico quando eram retiradas todas as impurezas da região. Se necessário era realizada de forma manual o esvaziamento da vesícula urinária e a retirada de fezes diretamente do reto, necessária para diminuir os riscos de contaminação de amostras e facilitar o procedimento (Figura 2). O uso de lubrificantes para a inserção da banana de estimulação foi sempre empregado.



Figura 2. A- Remoção de fezes. B- Limpeza da região inguinal de pacas macho.

Ao final do procedimento inicial de preparo do animal os mesmos eram submetidos ao protocolo de estímulo, com três séries: série I, 10 estímulos com 1 e 2V; série II, 10 estímulos com 3 e 4V; série III, 10 estímulos com 5V e intervalo entre as séries de dois segundos de acordo com Stradiotti et al. (2015). Ao passo que era realizado o procedimento, também era feita a avaliação física do animal quanto aos parâmetros fisiológicos (batimentos cardíacos, frequência respiratória, reflexos e estado de sedação) e respostas aos estímulos (arrepiar das papilas córneas, abertura do divertículo, mudança da coloração da glândula e cruzamento de patas posteriores).

O material ejaculado foi recuperado com auxílio de seringa de insulina (sem agulha) esterilizada, e posteriormente armazenado em tubos Eppendorf identificados com o número do chip de cada animal. As características eram imediatamente observadas, fazendo uso de microscópio óptico. Foram realizadas observações macroscópicas (cor e volume) e microscópicas, motilidade (%) e vigor (0–5). Os valores e características foram anotados e devidamente tabulados.

A concentração foi feita utilizando-se câmara de Neubauer onde era disposto, 10µl de sêmen e 1ml de formol salino.

Após os procedimentos os animais eram acompanhados durante o retorno da sedação e devolvidos às baias de origem.

3.3 Flutuação

A técnica de recuperação epididimária foi realizada após 30 dias das coletas por eletroejaculação. Dois tipos de diluentes foram utilizados: Água de coco em pó (ACP 123: pH-8,2; 300mOsm/kg H₂O; PL=2,88g) diluído em 50ml de água destilada e Botusemen special[®] (BOTUPHARMA) a base de leite, diluído em 100ml na solução pré-definida pelo fabricante.

Os animais foram sacrificados e os testículos imediatamente retirados com auxílio de bisturi e tesouras previamente desinfetadas. Por ser um criatório comercial legalizado, as carcaças foram destinadas para o evento de degustação realizado na Semana Acadêmica de Engenharia Agrônoma da Universidade Federal do Acre.

Os testículos retirados eram dispostos em Solução salina 0,9% pré-aquecida à 39°C, sendo mantidos nessa temperatura até a chegada no Laboratório de Apoio a Vida Silvestre da Unidade de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, Mário Alves Ribeiro.

No Laboratório os epidídimos foram dissecados do testículo e identificados quanto ao tipo de diluente com o qual seriam lavados, sempre respeitando a premissa que o testículo esquerdo era lavado com o diluente Botusemen special[®], e o direito com diluente a base de água de coco (ACP 123). Ambas as soluções eram previamente aquecidas até temperatura ambiente. Todos os procedimentos foram realizados ao mesmo tempo em ambos os testículos com seus respectivos diluentes.

Já dissecados, os epidídimos eram novamente seccionados retirando-se a porção da cabeça do epidídimo, visando recuperar o máximo possível de espermatozoides maduros da porção final do corpo e cauda do epidídimo.

Após os preparativos dos epidídimos, 1ml das soluções de eleição era disposto em placa de Petri. Com o auxílio de bisturis e tesouras, foram realizados cortes transversais ao longo de toda a peça, afim de que os espermatozoides migrassem para a solução (Figura 3). Após 5min de descanso eram retirados 10 μ l da solução com uso de uma micropipeta e postos em lâmina de vidro para avaliação de motilidade inicial e vigor da amostra.

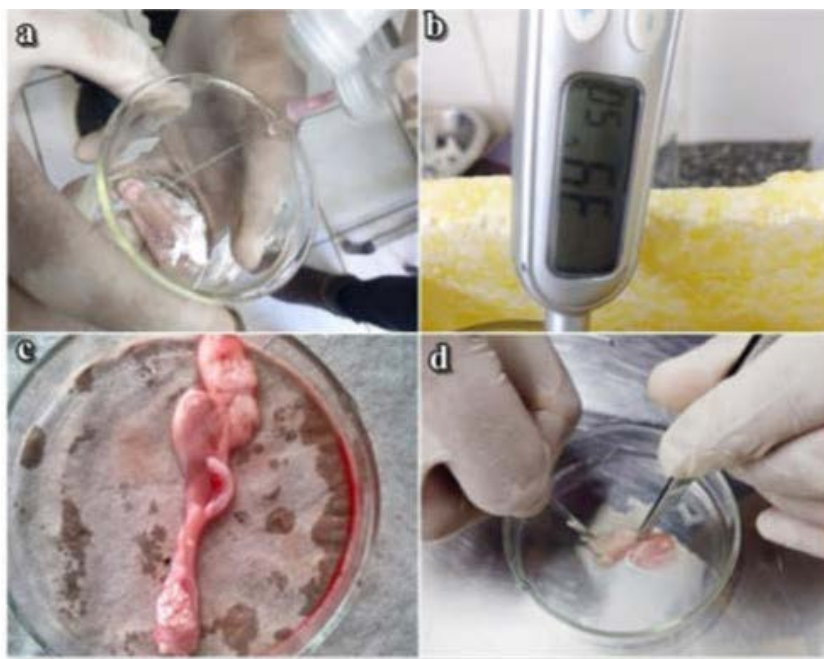


Figura 3. **a-** Testículos retirados imersos em solução salina; **b-** Temperatura de 39°C para transporte do material até o laboratório; **c-** Epidídimo dissecado, disposto em placa de Petri; **d-** Corpo e cauda do epidídimo imersos em 1ml de diluente e recebendo cortes transversais.

Para a obtenção da concentração obtida, 10µl de volume dos lavados eram retirados e fixados em 1ml de formol salino, a contagem era realizada com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico.

3.4 Testes de viabilidade

3.4.1 Teste da resposta osmótica (teste hiposmótico)

Das amostras obtidas, também eram retirados 10µl, este era diluído em 50µl de formol salino em tubos Eppendorf identificados. Desta amostra era feita lâmina lendo-se 100 células espermáticas para o conhecimento da porcentagem de espermatozoides com a cauda enrolada de cada indivíduo antes da realização do teste hiposmótico.

Para a realização do Teste Hiposmótico, era retirada de cada lavado o volume de 10µl, este volume era diluído em 90µl de água destilada (0mOsm/L) em tubos Eppendorf identificados, seguindo a técnica realizada por Castelo (2015) em cutias.

As amostras foram para banho-maria a 39°C e avaliadas até o período total de 45min. A cada 5min, 10µl eram retirados de cada amostra e fixados em 50µl de formol salino para posterior contagem. Este procedimento foi realizado para avaliar o tempo necessário requerido para os testes hiposmóticos em sêmen resfriado de pacas. O restante era imediatamente posto em banho-maria novamente.

Após a fixação, uma lâmina de cada amostra era feita e contava-se 100 células espermáticas, observando a quantidade de células com a cauda enrolada.

MELO (1999) descreve o cálculo para a obtenção do resultado do teste hiposmótico (HO) como:

$$\text{HO\%} = \left(\frac{\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HOST}}{\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HOST}} \right) -$$

3.4.2 Teste de integridade de membrana

O uso da eosina e nigrosina busca avaliar a integridade da membrana do espermatozoide, sendo assim, Com o auxílio de uma micropipeta era retirado 10µl do lavado epididimário, e adicionado a lâmina de vidro juntamente com 10µl de eosina e nigrosina. Realizava-se o esfregaço simples e as laminas foram postas para secar por

10min, após esse período foram contadas 200 células, observando-se quantas delas haviam sido coradas.

3.5 Resfriamento

Após a retirada de volume para as avaliações iniciais, os epidídimos eram novamente lavados com 1ml das soluções pré-definidas adicionando. O volume obtido em média era de 1,5ml, o volume final foi alocado em recipiente plástico de 10ml identificado com o tipo de diluente e data da amostra. Ao final, eram postas em caixas de transporte (Botuflex) na temperatura de 5°C.

As amostras eram retiradas 24h após o resfriamento. Cerca de 50µl era retirado da amostra resfriada e posto em banho-maria por 3min, o restante da amostra era imediatamente acomodado em caixa de transporte para resfriamento. Retirava-se 10µl de cada amostra e avaliava-se a motilidade, vigor, resposta hiposmótica e integridade de membrana. O gelo das caixas era trocado a cada 24h para que a temperatura se mantivesse. Estes procedimentos foram repetidos até que ambas as amostras demonstrassem motilidade <5% e vigor <1.

3.6 Análise estatística

As médias das variáveis, não paramétricas, foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, com significância de 5%. Os dados dos tipos de coleta, eletroejaculação ou flutuação são apresentados como média seguida do desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Eletroejaculação

Os parâmetros espermáticos encontrados na coleta de sêmen de pacas com o uso de eletroejaculação demonstraram um volume médio de 0,43ml ($\pm 0,33$ DP), concentração de $45,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml ($\pm 42,44$ DP), motilidade de 33,33% ($\pm 32,14$ DP) e vigor médio de 2,6 ($\pm 1,15$ DP) (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios (\pm DP) do volume, concentração, motilidade e vigor observados em dois momentos utilizando a técnica de eletroejaculação em pacas.

Parâmetros	Médias
Volume (ml)	0,43 \pm 0,33
Concentração (10^6 espermatozoides/ml)	45,5 \pm 42,44
Motilidade (%)	33,33 \pm 32,14
Vigor (0-5)	2,6 \pm 1,15

Os resultados observados durante a primeira e segunda semana de estímulos podem ser observados nas tabelas 2 e 3.

Neste estudo o protocolo anestésico já utilizado por outros autores não demonstrou boa sedação e miorelaxamento, tendo resultados satisfatórios apenas 30% (N=7) dos animais utilizados, uma vez que estes animais com cerca de 5min de início dos procedimentos passavam a vocalizar e se mostrarem inquietos.

O protocolo anestésico seguido neste estudo diferiu dos resultados obtidos por Stradiotti et al. (2015), na eletroejaculação em pacas, obtendo estes autores 100% de sucesso com os animais trabalhados.

Castelo et al. (2015) apontaram os protocolos anestésicos como um dos principais responsáveis para o sucesso das coletas de sêmen em animais silvestres. No

presente estudo, foi utilizada a combinação de quetamina e xilazina como meio de indução, sendo a acepromazina dada previamente como pré-anestésico.

Tabela 2 - Tabulação de volume, cor, motilidade, vigor e concentração dos ejaculados obtidos na primeira semana de eletroestimulação de pacas macho em cativeiro.

Nº	Animal	Baia	Vol (ml)	Cor	Moti (%)	Vigor (0-5)	Concentração (milhões/ml)	Resultado
1	15258	08	0,5	Clara de ovo	-	-	-	Plasma seminal
2	15259	06	0,1	Clara de ovo	-	-	-	Plasma seminal
3	79906	06	0,1	Amarelada	10	2	48,75x10 ⁶	Sêmen
4	79911	05	0,2	Clara de ovo	0	0	18,75x10 ⁶	Sêmen
5	27093	01	0,1	Clara de ovo	0	0	26,25x10 ⁶	Sêmen
6	152405	07	1,1	Clara de ovo	-	-	-	Plasma seminal
7	88455	04	0,5	Clara de ovo	-	-	-	Plasma seminal

Tabela 3 - Tabulação de volume, cor, motilidade, vigor e concentração dos ejaculados obtidos na segunda semana de eletroestimulação de pacas macho em cativeiro.

Nº	Animal	Baia	Vol (ml)	Cor	Moti (%)	Vigor (0-5)	Concentração (milhões/ml)	Resultado
1	15258	08	0,5	Clara de ovo	-	-	-	Plasma seminal
2	15259	06	0,8	Clara de ovo	-	-	-	Plasma seminal
3	79906	06	0,1	Amarelada	70	4	127x10 ⁶	Sêmen
6	52405	07	0,8	Clara de ovo	-	-	-	Plasma seminal
7	88455	04	0,4	Amarelada	20	2	10 x10 ⁶	Sêmen

A associação de quetamina e xilazina tem sido amplamente utilizada em cães e gatos (MINTER; DELIBERTO, 2005). Espécies silvestres também foram submetidas a protocolos anestésicos com essa associação, alguns exemplos podem ser citados como os leopardos indianos (JAYAPRAKASH et al., 2001), lhamas (GIULIANO et al., 2008), veados vermelhos-ibéricos (MARTÍNEZ et al., 2008), e quatis (BARROS et al., 2009). Mollineau et al. (2008) ainda relataram o uso isolado de xilazina em

cutias, também nessa espécie outros autores têm utilizado esta associação para o procedimento de eletroejaculação, como Mollineau (2011) e Castelo et al (2015).

Mollineau et al. (2017), em estudo sobre protocolos anestésicos na eletroejaculação em cutias, observaram que com a associação de xilazina e quetamina, o sucesso de coletas subiu para 66,6%. Entretanto, a melhor taxa de sucesso em cutias foi relatada por Martinez et al. (2013) onde os autores utilizaram como pré-anestésico o azaperone (4mg/kg) associado à meperidina (4mg) e após transcorridos 10min foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina (0,4mg/kg) e cloridrato de quetamina (20mg/kg) IM, após 5min, foi realizada uma aplicação lombossacra de lidocaína (5mg/kg), onde os autores conseguiram sucesso em 100% dos animais submetidos ao procedimento.

Tecirlioglu et al. (2002) trabalhando com ratos e Busso et al. (2004) com chinchilas, realizaram experimentos visando observar a influência da anestesia sobre os resultados da eletroejaculação e perceberam que animais quando conscientes apresentaram resultados superiores à quando submetidos à anestesia o que não foi observado neste experimento uma vez que, quando os animais começavam a vocalizar diminuía a excitação e não ocorria ejaculado.

No presente estudo todos os animais apresentaram características de excitação durante o procedimento de coleta, como arrepiar das papilas córneas, abertura do divertículo, mudança da coloração da glândula e cruzamento de patas posteriores, tais características foram observadas também no experimento de Stradiotti et al. (2015). Porém, destoando destes autores, onde os animais apresentavam as primeiras características de excitação ainda em 1 ou 2V, os animais aqui estudados só iniciavam a abertura do divertículo e eriçamento das espículas entre 4 e 5V, nessa mesma faixa de estímulo ocorria a ejaculação. Mollineau et al. (2008), relataram que em cutias a resposta ejaculatória ocorria por volta de 9V. Porém, Martinez et al. (2013) conseguiram ejaculados de cutias ao chegar aos 6V, resultado este próximo ao encontrado em pacas neste estudo.

Após o início das respostas era notável que ao fim da última série os animais mantinham-se excitados, continuando com as respostas características agora também podendo ser notadas a partir dos estímulos da nova série com 1V. Em média os animais apresentavam plasma seminal após 10min do início dos estímulos.

Apesar das mesmas condições de anestesia e estímulos os animais apresentaram grande variação na resposta à eletroejaculação, sendo possível observar que dos sete

animais estimulados, somente quatro apresentaram ejaculados com presença de células espermáticas durante o procedimento. Estes resultados se mostram superiores a Mollineau et al. (2008) que realizaram o primeiro protocolo de eletroejaculação em cutias, obtendo sucesso em apenas 30% dos animais, e também Costa et al. (2014), onde os autores realizaram os estímulos em cutias e observaram que apenas 3 dos 10 animais estimulados apresentaram ejaculados com células espermáticas. No entanto, foram inferiores aos encontrados por Stradiotti et al. (2015).

No presente estudo, na primeira semana (primeiro momento), dentre os que apresentaram resultados positivos, um animal apresentou ejaculado com volume de 0,1ml com 10% de motilidade e vigor grau 2, a concentração foi de $48,75 \times 10^6$ (espermatozoides/ml). Dois animais apesar de liberarem ejaculados com a presença de espermatozoides, as amostras não apresentavam nenhuma motilidade ou vigor, sendo que as concentrações foram de $18,75 \times 10^6$ e $26,25 \times 10^6$ (espermatozoides/ml), respectivamente. Os demais animais apenas liberaram uma fração seminal sem a presença de espermatozoides, apesar de apresentarem todas as características de excitação supracitadas.

Na segunda semana os animais passaram novamente pela eletroestimulação, sendo que dois animais, os quais apresentaram espermatozoides imóveis anteriormente, vieram a óbito. O primeiro sofreu uma parada cardiorrespiratória no retorno da anestesia, enquanto o outro morreu de causas inespecíficas. Apesar dos imprevistos todos os outros animais do experimento não apresentaram problemas no retorno anestésico e nem em relação ao procedimento. Assim, os dois casos foram considerados como acidentais.

Apesar da impossibilidade de repetição em dois animais, os cinco restantes foram avaliados novamente, sendo que dentre eles apenas dois apresentaram ejaculados com a presença de espermatozoides. O primeiro animal, já havia apresentado resultados positivos na primeira semana, embora com baixa motilidade e vigor, porém, na segunda semana o ejaculado apresentou excelentes características sendo avaliado em 70% de motilidade e grau 4 de vigor, o volume do ejaculado foi de 0,1ml com concentração de 127×10^6 (espermatozoides/ml). O outro animal não havia apresentado resultados positivos na primeira semana onde liberou boa quantidade de plasma sem a presença de espermatozoides. Já na segunda semana o animal apresentou células espermáticas no ejaculado, ainda que em baixa concentração 10×10^6

(espermatozoides/ml), com motilidade de 20% e vigor grau 2. Os outros animais apresentaram ejaculados sem a presença de espermatozoides.

As coletas efetuadas neste experimento com a presença de espermatozoides se mostravam com média de 0,43ml ($\pm 0,33$ DP). Castelo et al. (2015), relataram que a técnica de eletroejaculação pode resultar em um pequeno volume de ejaculado em roedores silvestres. Os resultados aqui obtidos foram superiores a Stradiotti et al. (2015), onde observaram um volume médio de 0,2ml ($\pm 0,17$ DP) em pacas, e Costa et al. (2014), onde o volume médio foi de 0,37ml ($\pm 0,1$ DP), em cutias.

Todos os animais apresentaram respostas aos estímulos, sendo que mesmo nos casos em que não houve um ejaculado com a presença de espermatozoides os animais liberavam plasma seminal, o qual se mostrava translúcido e viscoso. O plasma seminal era liberado gradativamente após a completa abertura do divertículo uretral e eriçamento das papilas córneas. Era possível ainda observar a mudança da cor da glândula para tons mais escuros sempre que o estímulo era acionado. Castelo et al. (2015), em estudo sobre diferentes estímulos para a eletroejaculação de Cutias, descreveu que 68,8% das coletas resultavam em ejaculados sem a presença de espermatozoides, o autor justifica que na literatura existem grande variação de resultados quanto a utilização de eletroestimulação em roedores silvestres.

Contrapondo os resultados encontrados por Stradiotti et al. (2015), que obteve ejaculados com a presença de espermatozoides em 100% dos animais trabalhados, apenas 57% dos animais apresentaram espermatozoides no ejaculados. Stradiotti et al. (2015), criadores da probe e protocolo de eletroestimulação utilizado neste experimento, não descreveram sobre a motilidade, vigor ou concentração dos achados. No presente estudo apesar das respostas físicas características de excitação após os estímulos, os ejaculados apresentaram baixa motilidade, vigor e concentração na maioria das coletas. A diferença observada entre os dois estudos, apesar do mesmo protocolo de estímulos, pode ser explicada por uma variação individual dos animais, ou mesmo uma melhor adaptação dos animais utilizados no trabalho de Stradiotti et al. (2015) ao protocolo utilizado.

4.2 Espermatozoides epididimários

Os resultados deste estudo são pioneiros na coleta epididimária em pacas, assim, comparação direta com a mesma espécie não é possível, porém, espécies similares podem ser usadas como parâmetro.

A técnica de flutuação foi realizada para a recuperação dos espermatozoides epididimários de cinco pacas adultas em fase reprodutiva. A técnica apresentou bons resultados, sendo que a média de volume obtida foi de 1,5ml e a concentração de $197,1 \times 10^6$ espermatozoides/ml ($\pm 84,9$ DP), médias comuns para os dois tipos de diluentes estudados. Em relação a motilidade e vigor, o diluente comercial Botusemen special apresentou em média 29,8% ($\pm 34,2$ DP) e 2,4 ($\pm 1,9$ DP) respectivamente. Já o diluente ACP 123 apresentou valores espermáticos com motilidade de 63,8% ($\pm 34,2$ DP) e vigor de 4,2 ($\pm 1,7$ DP).

A média da concentração espermática foi de $197,1 \times 10^6$ espermatozoides/ml ($\pm 84,9$ DP), os valores variaram entre 120 à 338×10^6 (espermatozoides/ml). Este estudo tem caráter pioneiro na avaliação de espermatozoides epididimários de pacas, assim as observações feitas aqui não podem ser comparadas com a mesma espécie, porém, quando comparadas com espécies semelhantes observou-se que a média encontrada é menor que a encontrada por Castelo (2015), que em coleta epididimária em cutias encontrou $822,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml ($\pm 85,0$ DP), ainda em cutias, Ferraz (2011) através da recuperação por fluxo retrógrado, relata que a média de recuperação foi de 748×10^6 (espermatozoides/ml). Silva et al. (2017) realizaram flutuação em preás e encontraram a concentração espermática de $207,3 \times 10^6$ espermatozoides/ml ($\pm 44,9$ DP). A diferença de concentração encontrada entre cutias e pacas pode ser explicada pela capacidade individual de cada espécie na produção espermática. Segundo Carreta-Junior (2012), a reserva espermática por grama de testículo em cutias é de 674 milhões, enquanto na paca é em torno de 290 milhões.

Observou-se que sem a presença de diluidores os espermatozoides epididimários da paca são capazes de ter motilidade progressiva com excelente vigor, sendo inclusive avistada a formação de turbilhonamentos, muito comum em bovinos.

Neste estudo foi comparada a eficiência de dois tipos de diluentes, o primeiro a base de água de coco (ACP- 123) e um diluente comercial já consolidado para a espécie equina a base de leite, Botusemen special[®]. O uso de ACP em espécies silvestres tem

sido relatado com boas taxas de sucesso. Sousa (2013) relata o uso em tatus peba, Silva (2011) e Castelo (2015) relataram em trabalhos com espermatozoides epididimários de cutias. Já o diluente comercial a base de leite, Botusemen special[®] é amplamente utilizado na reprodução equina, Castro et al. (2014) citam ainda que a fórmula do Botusemen special[®] é superior a outras composições comerciais a base de leite, no quesito de conservar o sêmen viável resfriado por até 48h.

A comparação entre a motilidade, vigor, integridade de membrana e resposta osmótica após o uso dos dois tipos diferentes de diluentes utilizados pode ser vista na tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios (\pm DP) da motilidade, vigor, integridade de membrana e resposta osmótica dos espermatozoides epididimários da paca diluídos em água de coco (ACP123) e um diluente à base de leite (Botusemen special[®]).

Diluentes	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Intergr. da membrana (%)	Resposta osmótica (%)
ACP 123	63,8 \pm 34,2a	4,2 \pm 1,7a	84 \pm 0,07a	53,9 \pm 3,78a
Botusemen special [®]	29,8 \pm 34,2b	2,4 \pm 1,9a	73 \pm 0,21a	39 \pm 17,9b

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa a 5% comparadas pelo teste Mann-Witney.

Houve diferença significativa, segundo o teste Mann-Witney, entre a motilidade e viabilidade de membrana dos dois tipos de diluentes. Já o vigor e integridade de membrana não apresentaram diferença significativa.

O uso de ACP foi relatado por Silva et al. (2011) como sendo um de diluentes de eleição para a conservação de espermatozoides epididimários em cutias, apresentando médias de motilidade e vigor de 91,5% (\pm 5,0DP) e 4,7 (\pm 0,2DP), respectivamente. Estes valores são superiores ao encontrado neste estudo em pacas, apesar da integridade de membrana deste estudo ter sido de 84% (\pm 0,07DP), valor superior ao trabalho com cutias supracitado que teve em média 71,4% (\pm 4,8DP). Essa diferença pode ser explicada pela variação natural entre as espécies. Castelo (2015), também trabalhando com cutias teve melhor taxa de sucesso, com média de motilidade de 96,2% (\pm 2,4DP) e vigor 5,0 (\pm 0,0DP), ainda, obteve melhor média de integridade de membrana, sendo de 90,5% (\pm 2,1DP).

Em comparação com espécies domésticas que foram submetidas a recuperação de espermatozoides epididimários, os resultados aqui obtidos foram superiores a algumas espécies como no estudo de Emericiano et al. (2013) em gatos, onde a média de motilidade foi de 44,7% (\pm 8,9DP) e vigor de 3 (\pm 0,4DP) e Gomes et al. (2014)

utilizando o diluente a base de água de coco, teve média de motilidade de 58,0% ($\pm 10,95$ DP) e vigor 2,6 ($\pm 0,41$ DP), ambos os autores não relataram a taxa de integridade de membrana.

Diluentes à base de leite já foi utilizado em roedores como coelhos por Andrade et al. (2008), onde observaram uma motilidade e vigor médio de 65,9% ($\pm 5,31$ DP) e 2,72 ($\pm 0,45$ DP) respectivamente, os autores concluem que são médias aceitáveis para protocolos de reprodução.

Castro (2014) avaliando a eficiência do leite desnatado em comparação com duas formulações comerciais (Botusemen[®] e Botusemen special[®]) observou que o diluente comercial Botusemen special[®], utilizado no presente estudo, teve maior média de sucesso em conservar sêmen equino resfriado por até 48h. O autor supracitado relata que observou a média de 67,6% de motilidade nas amostras estudadas. Valor superior ao encontrado neste estudo, Castro (2014) ainda descreve que o vigor médio nos equinos foi de 2,9, média está próxima a encontrada em pacas ($\bar{x} = 2,4 \pm 1,9$ DP) neste estudo. Ainda avaliando a viabilidade das amostras diluídas em Botusemen special[®], os autores encontraram uma média de integridade de membrana de 70,1% e Resposta osmótica de 46,1%, estes resultados são próximos aos encontrados em pacas.

Os dois diluentes (ACP-123 e Botusemen special[®]) não mantiveram os parâmetros de motilidade e vigor satisfatórios por mais que 24h, sendo feito assim somente uma repetição das avaliações de motilidade, vigor, integridade da membrana e resposta osmótica (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores médios (\pm DP) da motilidade, vigor, integridade de membrana e resposta osmótica das amostras de espermatozoides resfriados à 5°C em dois tipos de diluentes após 24h de armazenamento.

Diluentes	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Integr.da membrana (%)	Resposta osmótica (%)
ACP- 123	4,4 \pm 0,8a	0,6 \pm 0,54a	71 \pm 0,04a	34,9 \pm 18,1a
Botusemen special [®]	4,4 \pm 0,54a	1,6 \pm 1,34a	67 \pm 0,12a	41,8 \pm 15,25a

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa a 5% comparadas pelo teste Mann-Witney.

Outros autores descreveram a queda de viabilidade espermática quando em uso do diluente ACP, como Gomes et al. (2014), que avaliando sêmen de cães resfriados observaram que após 24h a motilidade de 58,0% ($\pm 10,95$ DP) e vigor 2,6 ($\pm 0,41$ DP) apresentaram médias de 3% ($\pm 2,73$ DP) e 0,4 ($\pm 0,54$ DP), respectivamente. Mota filho et al. (2014) também em estudo com espermatozoides caninos diluídos com ACP,

concluíram que após 12h de resfriamento a 4°C, as taxas de motilidade e vigor começam a decair, tornando-se inviáveis a partir das 18h de incubação.

Entre os trabalhos com diluentes à base de leite, Melo (2015) observou que dentro de 24h, diferentes tipos de diluentes a base de leite tem eficiência parecida, porém, a partir de 24h, começam a decair os valores aceitáveis para o sêmen de equinos resfriados. Segundo Bispo (2005) em estudos com caprinos, os diluentes a base de leite são um dos principais nos protocolos caprinos, porém com eficiência comprovada de 12 a 24h. O uso destes diluentes no resfriamento de sêmen de pacas foi realizada em caráter pioneiro, assim a comparação com outros protocolos ainda não é possível, diante disto é necessário se observar a diferença entre as espécies pesquisadas.

4.3 Testes de viabilidade

4.3.1 Viabilidade espermática

O procedimento para avaliação do melhor tempo de incubação para avaliação do teste de viabilidade espermática (HOST) de espermatozoides epididimários de paca demonstrou que a partir dos 10min era possível observar a presença de elevado percentual de cabeças isoladas e a partir dos 15min ocorria uma aglutinação dos espermatozoides em grumos que dificultavam a contagem de caudas (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Cabeças isoladas (setas) observadas no HOST a partir de 10min de incubação a 39°C.

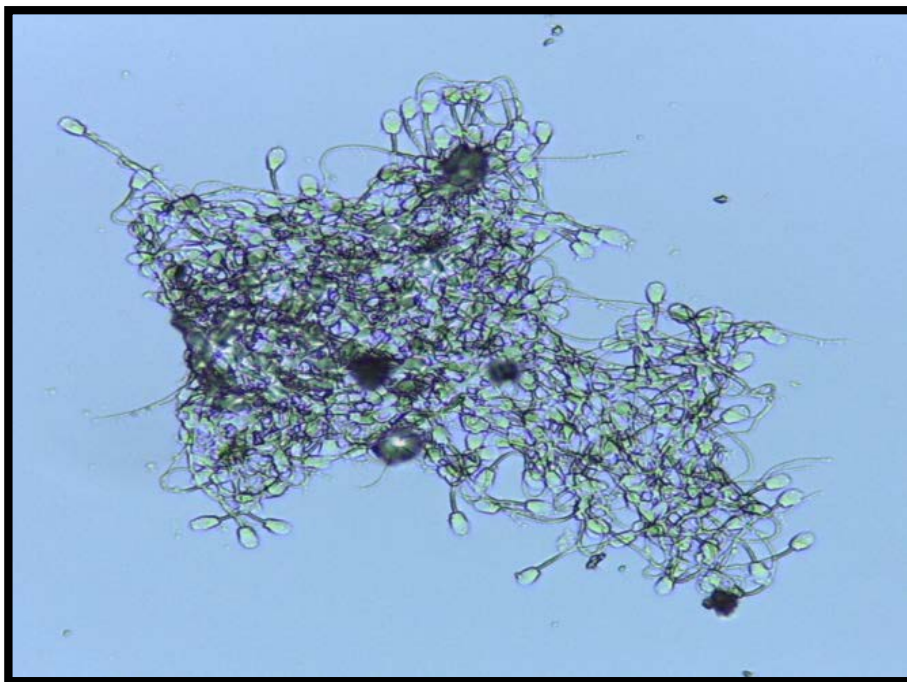


Figura 5. Aglomeração de células espermáticas observadas no HOST após 15min de incubação a 39°C.

Assim, para a avaliação dos resultados expressos neste estudo foi levado em conta o tempo de 5min de incubação das amostras em banho-maria. Chapon (2012) cita que mesmo em bovinos não existe um tempo completamente definido, onde autores tem tido êxito em variadas faixas de tempo: 5min (CORREA et al., 1997),

30min (MOCÉ; GRAHAM, 2008) e 60min (VERA-MUNOZ et al., 2009). Castelo (2015) avaliando a viabilidade espermática em cutias relata bons resultados utilizando o tempo de 45min.

Cortés et al. (1993) afirmam que nos primeiros 20min é que ocorre a maior proporção de reações espermáticas ao teste hiposmótico.

4.3.2 Integridade da membrana

Neste estudo as avaliações da integridade da membrana dos espermatozoides foram realizadas com emprego da eosina e nigrosina. Este método já é consagrado para este fim em espécies domésticas e tem sido utilizado em roedores silvestres como observado em Rodriguez et al. (2012) trabalhando com sêmen de capivaras e Silva et al. (2014) em estudo com espermatozoides epididimários de preás.

A média de integridade de membrana foi de 84% ($\pm 0,07DP$) no diluente ACP 123 e de 73% ($\pm 0,21DP$) quando utilizado o diluente comercial Botusemen Special®. Os resultados dos dois diluentes estudados foram superiores aos encontrados por Silva et al. (2014) em preás utilizando o diluente TES, onde obteve uma integridade de 52,7% ($\pm 7,3DP$).

Lopez (2017), avaliando diferentes tipos de diluentes no processamento de sêmen de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), observou a integridade de membrana de 78% quando utilizando diluente a base de água de coco, resultado abaixo do encontrado nas amostras com ACP 123 neste estudo. Porém, a autora cita que teve integridade conservada em 84% dos espermatozoides quando utilizando diluentes a base de leite, enquanto neste estudo o diluente a base de leite teve sucesso de 73% ($\pm 0,21DP$).

Neste estudo as amostras conservadas em ACP 123 ao tempo de 24h a 5°C demonstraram uma queda de integridade de membrana de 13%, valor maior que o observado nas amostras diluídas com Botusemen Special, que demonstraram queda de 6% na integridade dos espermatozoides. Outros estudos já destacaram a função dos diluentes à base de leite em conservar a membrana dos espermatozoides contra lesões causadas pelo resfriamento.

Tsuneda Junior et al. (2016) concluíram que a técnica de coloração através da eosina e nigrosina que foi desenvolvida para animais domésticos pode ser adaptada a espécies silvestres.

4.4 Comparação entre duas técnicas de coleta de sêmen em pacas

Os parâmetros espermáticos encontrados com a diluição a base de água de coco (ACP-123) foram superiores aos encontrados nas coletas de eletroejaculação, este achado corrobora Castelo (2015) em estudo em cutias que observou através da coleta epididimária, que o diluente ACP conseguiu melhores índices em todos os fatores de avaliação que comparado com as coletas por eletroejaculação na mesma espécie (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação entre volume, concentração, motilidade e vigor das amostras coletadas através da eletroejaculação e recuperação epididimária com água de coco e diluente comercial à base de leite.

Valores	Eletroejaculação	ACP-123	Botusemen Special®
Volume (ml)	0,43± 0,33	1,5*	1,5*
Concentração (10 ⁶ espermatozoides/ml)	45,5 ± 42,44	197,1±84,9 *	197,1±84,9*
Motilidade (%)	33,33 ± 32,14	63,8 ±34,2	29,8±34,2
Vigor (0-5)	2,6 ± 1,15	4,2±1,7	2,4±1,9

*Média das amostras oriundas da cauda do epidídimo.

A diferença da concentração pode ser explicada pela capacidade de armazenamento de espermatozoides na cauda do epidídimo, o que permite a recuperação de um maior número de células espermáticas, em comparação a outros métodos de colheita (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006; MONTEIRO et al., 2011).

A técnica de eletroejaculação apresenta alta variabilidade nos resultados devido a inúmeros fatores, como a variação individual, estresse, resposta a anestesia, e resposta a estimulação (MARTINEZ et al., 2008; CASTELO; SILVA, 2014)

Castelo (2015) em estudo com coletas de espermatozoides em cutias, relata a eletroejaculação como um método de difícil execução e de resultados variáveis devido a diversos fatores como estresse, protocolos inadequados entre outros, o autor ainda cita que os baixos volumes e concentrações espermáticas obtidos no processo dificultam o aperfeiçoamento das técnicas de coleta e conservação.

Alguns autores têm relatado que amostras obtidas por eletroejaculação, quando comparadas com amostras de coletas epididimárias, apresentam menor resistência quando submetidos a estresse criobiológico, como refrigeração e adição e remoção de criopreservadores (VARISLI et al., 2009) Monteiro et al. (2011) citam que devido ao

contato dos espermatozoides com o plasma seminal, os mesmos sofrem mudanças (composição de lipídeos na membrana, aquisição de proteínas e mudanças de conteúdo), estes fatores fazem com que haja uma menor resistência ao choque do frio.

Os efeitos da aplicação de estímulos elétricos ainda precisam ser elucidados em pequenos roedores, pois o fator de estresse nestas espécies é visível. A aplicação da eletroejaculação tem a capacidade de modificar as características seminais, como descrito no estudo de Tercilioglu et al. (2002), onde as amostras colhidas por métodos de eletroejaculação tinham menor motilidade e menor capacidade de fertilização.

A busca por aperfeiçoar as biotecnologias na reprodução tem sido amplamente difundida em animais domésticos de interesse, visto isto, são necessárias novas pesquisas para que técnicas de reprodução sejam desenvolvidas em animais silvestres levando em conta suas características físicas e fisiológicas.

5 CONCLUSÕES

O protocolo anestésico não demonstrou resultados satisfatórios para a utilização na coleta por eletroejaculação em pacas macho neste estudo.

As amostras epididimárias diluídas em ACP 123 obtiveram melhores médias de parâmetros espermáticos, diferindo estatisticamente em relação à motilidade e resposta osmótica a 5% de probabilidade, em comparação com o diluente comercial Botusemen special[®], porém ambos os compostos não conservaram as amostras espermáticas com parâmetros satisfatórios até o tempo de 24h.

A coleta epididimária apresentou maior volume e concentração em comparação ao protocolo de eletroejaculação, sendo a motilidade e vigor das amostras diluídas em ACP 123 superiores aos índices alcançados pelas coletadas com uso da eletroejaculação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. E. F. **Viabilidade espermática do sêmen de cães, nas 24 e 48 horas após a diluição e resfriamento em container para transporte.** 1998. 40f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 1998.
- ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Anim Reprod Sci.**,v.99,n.4,p.223-243, jun.2007.
- ANDRADE, A. F. C. Eficiência *in vitro* de três diluidores para sêmen de coelho. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo,SP, v. 45, p. 33-39,nov. 2008.
- ANGRIMANI, D. S. R. LÚCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L. et al. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte,MG, v.37, n.4, p.323-327, out./dec. 2013
- ARRUDA, R.L.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A. et al - Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte,MG,v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.
- BALL, L. Electroejaculation. In: **Klemm WR, (ed.), Applied Electronics for Veterinary Medicine and Animal Physiology**, 1sted, Chales C.Thomas, Springfield, 470 p. 1986. Disponível em: <<http://sc2.dev.simitu.dk/applied-electronics-for-veterinary-medicine-and-animal-physiology.pdf>>. Acesso em: 12 de Nov.2017.
- BAMBERG, E.; MÖSTL, E.; PATEL, M. et al. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. **J. Zoa. Wild. Med.**, v.22, p.73-77, mar.1991.
- BARROS, F. F. P. C.; TEIXEIRA, P.P.M.; CONCEIÇÃO, M.E.B.A.M. et al. Vasectomy in Spotted Paca (*Cuniculus paca*). **Acta Scientiae Veterinariae.** v.44, n.1,p.175-181,oct.2016.
- BARROS, C.H.S.C. Análise computadorizada do sêmen de queixada (*Tayassu pecari*) com SCA®: dados preliminares. in: REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL (ABRAA),2.,2017, Corumbá..**Anais eletrônicos...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2017. Disponível em:<<http://www.reuniaoabraa.com.br/assets/anais.pdf>>. Acesso em: 18 de jan. 2018.
- BARROS, F. F. P.C.; QUEIROZ, J. P.; FILHO, A. C. et al. Use of two anesthetic combinations for semen collection by electroejaculation from captive coatis (*Nasua nasua*). **Theriogenology**, v.71,n.1, p.1261-1266, mai. 2009.

- BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, MG, v.35, n.4, p.400-407, out./dez. 2011.
- BARROSO, L. V. S. **Análise do impacto na função gonadal e erétil da captação de espermatozoides no testículo de animais submetidos a orquidopexia experimental : comparação da técnica de extração convencional com a aspirativa.** 2015. 82 f. Tese (Doutorado em Medicina cirúrgica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2015.
- BATALHA, L. M., OBA, E. Caracterização morfométrica e morfológica de célula espermática de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Archives of Veterinary Science**, São Paulo, SP, v.11, n. 1, p. 66-72, jun. 2006.
- BERNIE, A. M.; RAMASAMY, R.; STEMBER, D.S. et al. Microsurgical epididymal sperm aspiration: indications, techniques and outcomes. **Asian. J. Androl.**, v. 15, n. 1, p. 40-43, jan.2013.
- BERTOL, M. A. F. **Viabilidade de espermatozoides bovinos colhidos de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18-20°C.** 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia da reprodução animal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2012.
- BISPO, C. A. S. **Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5 °C em função de curvas de resfriamento e diluidores.**2005.61f. Dissertação(Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.
- BONILLA-MORALES, M. M. PULIDO, J. R.; PACHECO, R. M. et al. Biología de la lapa (*Cuniculus paca*): uma perspectiva para la zootecría. **Ver. CES Med. Zootec.**v.8, n.1, p.82-95. jun.2013.
- BORGES Jr, E.; IACONELLI, A.; AOKI, T. et al. Recuperação de espermatozoides do testículo e epidídimo por punção aspirativa percutânea no tratamento de pacientes azoospermicos. **J. brasileiro.Reprod. Assist.**,v. 2, p.06-10, set./dez.1998.
- BORGES, E. M. **Morfologia dos órgãos genitais masculinos de paca (*Agouti paca* Linnaeus, 1766).** 2004. 165f. Tese (Doutorado em Anatomia Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2004.
- BORGES, E. M.; BRANCO, E.; LIMA, A. R. et al. Morfologia e topografia dos órgãos genitais masculinos externos da paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766). **Biotemas**, v. 26, n. 4, p. 209-220, dez. 2013.
- BORGES, E. M.; BRANCO, E.; LIMA, A. R. et al. Morphology of accessory genital glands of spotted paca (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766). **Animal Reproduction Science.**, v.145, p.75-80, fev. 2014.
- BUENO, A. P.; PEREIRA, R. E.P. Biotecnologia aplicada aos animais silvestres e seus aspectos éticos e conservacionistas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, SP, v. 11, jul.2008.
- BUSSO, J. M.; PONZIO, M. F.; CHIARAVIGLIO, M. et al. Electroejaculation in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*): effects of anesthesia on seminal characteristics. **Res Vet Sci**, v.78, p.93-97, 2005.
- CANISSO, I. F.; SOUZA, F.A.; SILVA, E. C. et al. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.** Curitiba, PR, v. 6, n. 3, p. 389-398, jul./set. 2008.
- CARRETA-JÚNIOR, M. **Avaliação morfofuncional do processo espermato gênico de pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766) adultas.**

- 2008.61f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- CARRETA-JÚNIOR, M. **Estudo comparativo do processo espermatogênico e duração do ciclo do epitélio seminífero através da técnica de imunohistoquímica com bromodeoxiuridina de três diferentes espécies de roedores da subordem Hystricomorfa: Cutia (*Dasyprocta leporina*), Paca (*Cuniculus paca*) e Capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 2012. 131f. Tese (Pós-Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.**
- CARVALHO, M. A. M.; MACHADO, A. A.; BEZERRA, E. et al. Arterial supply for the penis in Agoutis (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler, 1831). **Anat Histol Embryol.**, v.37, p.60-62. fev. 2008.
- CARY, J. A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K. et al. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. **Can. Vet. J.**, v.45, n.1, p.35-41, jan. 2004.
- CASTELO, T.S; SILVA, A. R. Eletroejaculação em mamíferos silvestres: principais fatores que afetam sua eficiência. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.38, n.4, p.208-213, out./dez. 2014
- CASTELO, T. S.; SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L. et al. Interactions among different devices and electrical stimulus on the electroejaculation of captive agoutis (*Dasyprocta leporina*). **Reprod. Dom. Anim.** v.5. p. 492 - 496, jun. 2015.
- CASTELO, T. S. **Obtenção e conservação de espermatozoides de cutia (*Dasyprocta leporina* Linneaus, 1753) do semiárido brasileiro.** 2015.134 f. Tese (Doutorado em biotecnologia) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN, 2015.
- CASTRO, F. S. **Comparação entre diferentes tipos de leite como diluentes para sêmen de equinos refrigerados.** 2014.36f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, RS, 2014.
- CAZES, L. B. **Avaliação da eficiência de métodos de recuperação de gameta masculino em cão doméstico (*Canis familiares*).** 2006.60f. Dissertação (Mestrado em produção animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes, RJ, 2006.
- CHACUR, M. G. M.; MARTINS, E. A. F.; SILVA, A. A. et al. Morfometria corpórea, características do sêmen, proteínas seminais e testosterona em cervos (*Cervus unicolor*), em cativo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, p. 1392-1400, 2014.
- CHAPON, F. P. **Teste Hipósmótico.** 2012.28f. Monografia (Graduação em medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2012.
- CLAYTON, O.; KUEHL, T.J. The first successful in vitro fertilization and embryo transfer in a non human primate. San Antonio, TX, **Theriogenology**, v.2, p.228, jan.1984.
- CORREA, J.R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**.v.48.p.721-731.1997.

- CORTÉS, S.; NÚÑES, R.; VAZQUEZ, I. Capacidad de reaccion a endosmosis de los espermatozoides de macho cabrio. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1., 1993, Portugal. **Anais eletrônicos...** Portugal: 1993. Disponível em: <<http://bibliotecas.utl.pt/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=267858>>. Acesso em: 21 de Nov.2017.
- COSTA, G. M. J. **Estudo Comparativo Da Função Testicular E Eficiência Espermatogênica Em Três Diferentes Espécies De Mamíferos Silvestres Com Potencial Interesse Econômico**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2009.
- COSTA, K. L. C. **Avaliação morfofuncional do testículo de veado catingueiro (*Mazama gouazoubira* Fisher, 1814)**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- COSTA, P.M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de técnicas de reprodução. **Univ. Ci. Saúde, Brasília**, v. 6, n. 1, p. 39-55, jan./jun.2008.
- COSTA. C. Y. M.; BEZERRA, L. G. P.; CASTELO, T.S. et al. Características espermáticas de cutia *Dasyprocta azarae* coletadas por eletroejaculação. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.8, Supl. 2, 2014.
- DEUTSCH, L.; PUGLIA, R. R. **Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. Rio de Janeiro: Globo, 1988.191p Disponível em:<<http://biologiaparabiologos.com.br/20-livros-sobre-animais-silvestres-para-download/>>. Acesso em: 12 de jan.2018.
- DOMINGUES, S. F. S. Semen coagulum liquefaction; sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v.123, p.75-80, 2011.
- EMERENCIANO, K. D. M.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X. et al . Recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*) utilizando soluções à base de tris ou água de coco em pó. **Acta Veterinária Brasília**, v.7, n.2, p.148-153, 2013.
- EMMONS, L. 2016. *Cuniculus paca*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T699A22197347. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20162.RLTS.T699A22197347.en>> Acesso em 14 de fev. 2018.
- ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P.; Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v. 46, p.165-171, 1996.
- FERRAZ, M. S.; MENEZES, D. J.; PESSOA, G. T. et al. Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dasyprocta aguti*). **Theriogenology**, v.75, n.3, p. 459-462, fev. 2011.
- GIULIANO, S.; DIRECTOR, A.; GAMBAROTTA, M. et al. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Llama glama*). **Anim Reprod Sci.**, v.104, p.354-358, 2008.
- GOMES, E. T.; SANTOS, J. F. P.; SILVA, K. B. P. et al. Resfriamento de espermatozoides caninos imediatamente após recuperação do epidídimo com Acp-106c® acrescido ou não de gema de ovo. **Acta Veterinaria Brasília**, v.8, Supl. 2, 2014.
- GUERRERO, C. A. **Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovine epididymal spermatozoa**. 2006. 205 f. Tese (Doutorado em ciência animal) - Universidade do estado da Louisiana, Louisiana, 2006.

- GUIMARÃES, M. A. B. V. Reprodução de animais silvestres. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, 161-168 p.
- HIEMSTRA, S. J. et al. **The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. The role of biotechnology**, p.5-7, 2005. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=tPVz5ZDqUtAC&oi=fnd&pg=PA45&dq=The+potential+of+cryopreservation+and+reproductive+technologies+for+animal+genetic+resources+conservation+strategies&ots=ORL9bvd8IG&sig=e-JPyCTUzSilG1Cnp2yw-mExd9E#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 19/01/2017.
- HOCHACHKA, P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. **Science**. v.231. p.234-241. 1986.
- HOSKEN, F. M. **Criação de pacas**. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1999.92 p.
- HOSKEN, F. M.; SILVEIRA, A.C. **Criação de Pacas**. Viçosa: Coleção animais silvestres. Editora Aprenda Fácil, 2001.231 p.
- HOSKEN, F. M. **Criação Comercial de Paca**. Viçosa, MG, CPT, 2013.234 p.
- HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Zoo & Wild Animal Medicine Current Therapy**. 3.ed. Philadelphia: W. B. Saunders. p. 390-399. 1993. Disponível em :< https://www.researchgate.net/publication/297329810_Fowler's_Zoo_and_wild_animal_medicine_Current_therapy>. Acesso em: 27 de Nov.2017.
- JAYAPRAKASH, D.; PATIL, S. B.; KUMAR, M, N. et al. Semen characteristics of the captive Indian Leopard, *Panthera pardus*. **J. Androl**. v.22, p.25-33, jan./fev. 2001.
- JEYENDRAN, R. S. VAN DER VEM, H. H. PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J Reprod Fertil.**, v.70, n.1, p.219-28. 1984.
- KAHWAGE, P. R. **Eletroejaculação em caititus (*Tayassu tajacu*): Características seminais pré e pós-refrigeração**. 2009.75f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2009.
- KAHWAGE, P. R.; GARCIA, A. R.; GUIMARÃES, D. A. A. et al. Biometria testicular, eletroejaculação e características seminais de caititus, *Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758 (*Mammalia, Artiodactyla, Tayassuidae*) mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. **Acta Amazônica**, v.40, n. 4, p.771-778, 2010.
- KATILA, T.; COMBES, G.B.; VARNER, D.D. et al. Comparison of three containers used for transport of cooled stallion semen. **Theriogenology**. v.48. p.1085-1092, nov.1997.
- LAMEIRA, G. A. P. **Determinação de Alguns Parâmetros da Biologia Reprodutiva e Produtiva da Paca Fêmea (*Agouti paca*, Linnaeus 1766) criada em Cativeiro**. 2002.49f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2002.
- LE PENDU, Y; GUIMARAES, D. A.; LINHARES, A. Estado da arte sobre a criação comercial da fauna silvestre brasileira. **Rev. Bras. Zootec.** Ilhéus, BA, v.40, p.52-59, jan. 2011.

- LI, Y. H.; CAI, K.J.; KOVACS, A. et al. Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 26, p. 387-395, mai./jun.2005.
- LÓPEZ, J.L.V. **Evaluación de tres diluyentes naturales para semen fresco de conejo (*oryctolagus cuniculus*) en la inseminación artificial**. 2017. 61f. Monografía (Graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Ecuador, 2017.
- MARTINEZ, A.F.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M. et al. Sperm parameters of Iberian red deer: electroejaculation and post-mortem collections. **Theriogenology**, v.70, p.216-226, 2008.
- MARTINEZ, A. C.; OLIVEIRA, F. S.; ABREU, C. O. et al. Colheita de sêmen por eletroejaculação em cutia-parda (*Dasyprocta azarae*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol.33, n.1, p. 86-88, 2013.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M. et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v.65, n.3, p.471-485, fev.2006.
- MARTINS, C. F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C. et al. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326–331, out.2007.
- MASON, I. L. **The evolution of domesticated animals**. London: Longman, 1984. 452p. Disponível em: <[http://www.appliedanimalbehaviour.com/article/0168-1591\(87\)90021-9/pdf](http://www.appliedanimalbehaviour.com/article/0168-1591(87)90021-9/pdf)> .Acesso em : 20 de dez.2017
- MATHIAS, J. **Como criar: Paca**. 2014. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/>> Acesso em: 16 de jan. 2018.
- MELO, C. C. S. **Avaliação da eficácia dos diluidores Tris ou Água de coco em pó (ACP – 106 ©) associado à Aloe vera (*Aloe barbadensis Miller*), na conservação do sêmen canino**. 2015. 88 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2015.
- MELO, M. I. V. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino**. 1999. 67f. Tese (Doutorado em Ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.
- MENEZES, D. J. A.; CARVALHO, M. A. M.; ASSIS-NETO, A. C. et. al. Morfologia dos órgãos genitais externos do macho de cutia (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766). **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, v.40, n.2, p. 148-153. 2003.
- MINTER, L.; DELIBERTO, T. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on postthaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. **Theriogenology**. v.64, p.1898-1912, 2005.
- MOCÉ, E; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**. v.105, p.104-118, abr. 2008.
- MOLLINEAU, W.; ADOGWA, A.; JASPER, N. et al. The gross anatomy of the male reproductive system of a neotropical rodent: The Agouti (*Dasyprocta leporina*). **Anatomia, histologia, embriologia**, v. 35, n. 1, p. 47-52, fev.2006.

- MOLLINEAU, W.M.; ADOGWA, A.O.; GARCIA, G.W. A preliminary technique for electro-ejaculation of agouti (*Dasyprocta leporina*), **Anim Reprod Sci.**, v.7, p. 92 –108, 2008.
- MOLLINEAU, W.M.; ADOGWA, A. O.; GARCIA, G.W. Liquid and Frozen Storage of Agouti (*Dasyprocta leporina*) Semen Extended with UHT Milk, Unpasteurized Coconut Water, and Pasteurized Coconut Water. **Veterinary Medicine International**, v.2011,2011.
- MOLLINEAU, W.M.et al. Anatomical Stages of Penile Erection in the Agouti (*Dasyprocta leporina*) Induced by Electro-Ejaculation. **Anat Histol Embryol.**, v.41, p.392–394. 2012.
- MOLLINEAU, W; MOLLINEAU B.A.N. Electro Ejaculation of Two Species of Agouti (*Dasyprocta* spp.) in Brazil and Trinidad and Tobago. **Anat & Physiol.** v. 3.2017.
- MONTEIRO G. A.; GUASTI,P. N.; PAPA,F. O. Colheita e Preservação De Células Espermáticas De Garanhões Recuperadas Da Cauda Do Epidídimo. **Vet. e Zootec.** ,v.16,n.3. p.448- 458. set. 2009.
- MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S. et al. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal reproduction science**, v. 127, p. 197-201,set. 2011.
- MONTEMEZZO, E. **Informações sobre a criação comercial de paca (*Cuniculus paca*) no sudoeste do Paraná.** 2014. 34 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2014.
- MOTA FILHO, A. C.; SILVA, H. V.; NUNES,T.G. et al. Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP106c and TRIS. **Cryobiology**,v.69.p.17-21, ago.2014.
- MOTA FILHO, A.C; SILVA, L. D. M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.1, p.1-8, 2012.
- NEILD, D. M.; CHAVES, M. G.; FLORES, M. et al. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**.v.32.p.351-355, nov. 2000.
- NOGUEIRA FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. **Criação de Pacas (*Agouti paca*).** Piracicaba. SP. 1999.60 p.
- NOGUEIRA, T. M. R. **Alguns Parâmetros Fisiológicos e Reprodutivos da Paca (*Agouti paca*, Linnaeus 1766) em Cativeiro.** 1997. 118f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista,São Paulo,SP,1997.
- OLIVEIRA, F. S.; MACHADO, M. R. F.; CANOLA, J. C. Real time B-mode ultrasound in pacas pregnancy (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766), **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.**v.40,p.73-78,2003.
- OLIVEIRA, K. G.; MIRANDA, S.A.; LEÃO, D. L. et al. Semen coagulum liquefaction; sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Anim. Reprod.Sci.** v.123, p.75-80, jan.2011.
- OLIVEIRA, G. C. Cryopreservation of equine semen: a review. **Rev.Brasi.de Reprod. Anim.** v.37.p.23-28.2013.
- PAZ, R. C. R. **Reprodução de felinos domésticos e selvagens.** Edufimt. 2013.125 p.

- PRIETO, M. T. et al. Sperm cryopreservation in wild animals. *European Journal of Wildlife Research*, v. 60, n. 6, p. 851-864, 2014.
- RENGIFO, M. E., et al. Crianza familiar del majaz o paca (*Agouti paca*) em la Amazônia. In: Tratado de Cooperacion Amazônica. Secretaria Pro Tempore. 48 .ed. Lima. 45 f. 1996
- RIBEIRO, V. M. F; ZAMORA, L. M. **Pacas e capivaras criação em cativeiro com ambientação natural**. Rio Branco: Editora Bagaço , 2008.48 p.
- RIBEIRO, V. M. F.; CARVALHO, Y, K.;PERUQUETTI, R. C. et al. Consumo e comercialização de carnes silvestres:Potencial econômico para a Amazônia ocidental. **Journal of Amazon Health Science**.v.2, n.1, 2016.
- RIBEIRO, V. M. F.; SATRAPA, R.; DINIZ, J. V. A. et al. Synchronization of estrus in paca (*Cuniculus paca*): possible impacts on reproductive and productive parameters. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo,SP, v. 54, n. 1, p. 27-35, mai.2017.
- RODRÍGUEZ, J. P.; PEÑA, M. J.; GÓNGORA, A. O. et al. Obtención y evaluación del semen de capibara *Hydrochoerus hydrochaeris*. **Rev.MVZ Córdoba**.,v17,n.2,p.2991-2997, 2012..
- SALGUEIRO, C. C. M; NUNES, J. F. Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. **Ciência Animal**, v.22.n.1.p.20-32, 2012.
- SANTOS, E. **Entre o Gambá e o macaco: vida e costume dos mamíferos do Brasil**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1984.264 p. Disponível em:< <http://biologiaparabiologos.com.br/20-livros-sobre-animais-silvestres-para-download/>>. Acesso em: 23 de Dez.2017
- SANTOS, R. R.; AMORIM, C.; CECCONI, S. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 151–163, dez. 2010.
- SCOTTI, P. **Cardápio alimentar das pacas**. (2010) Disponível em: <<http://www.pacamg.jex.com.br/noticias/cardapio+alimentar+das+pacas>> Acesso em: 13 de fev.2018.
- SEMANART. Plan de manejo tipo para tepezcuintle (*Cuniculus paca*) manejo intensivo. **Relatório de referência**. México D.F. Dirección general de vida silvestre. 2011.92p.
- SEVERO, N. C. Eletroejaculação e massagem dos órgãos sexuais internos: impactos sobre o bem estar animal.in: REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL (ABRAA),2.,2017,Corumbá, MS.**Anais eletrônicos...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2017.Disponível em: <<http://www.reuniaoabraa.com.br/assets/anais.pdf>>.Acesso em: 18 de jan. 2018.
- SHIVAJI, S. Seminal plasmin: a protein with many biological properties. **Biosci. Reprod**, v.8,p.609-618, 1988.
- SILBER, S. J. BARBEY, N.; LENAHAN, K. et al. Applying clinically proven human techniques for contraception and fertility to endangered species and zoo animals: a review. **J. Zool. Wild. Med.**, v. 44, p.111– 122,dec. 2013.
- SILVA FILHO, J. M. **Aspects of the reproductive handling and of the semen in the artificial insemination in mares**. 1994. 402f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade de Viçosa, Viçosa, MG, 1994.
- SILVA, A. R.; SOUZA, A. L.P.; SANTOS, E. A .A. et al. Formação de Bancos de Germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 219-234, jun.2012.

- SILVA, M. A.; PEIXOTO, G. C.; SANTOS, E. A. et al. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology**, v.76, p. 1084–1089, oct.2011.
- SILVA, A. M.; BEZERRA, J. A. B.; CAMPOS, L. B. et al. Comparação de diferentes métodos de coloração na avaliação morfológica de espermatozoides epididimários de preá (*Galea spixii*). **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, 2014.
- SILVA, C. D. O. C. **Biotécnicas da reprodução aplicadas à conservação de mamíferos silvestres**.2017.64f. Monografia (Graduação em medicina veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2017.
- SMYTHE, N. The paca (*Cuniculus paca*) as a domestic source of protein for the neotropical, humid lowlands. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 17, p. 155-170, jun.1987.
- SMYTHE, N.; DE GUANTI, O. B. La domesticación y cria de la paca (*Agouti paca*). **In: Guia FAO conservación**. 26.ed. Roma: FAO, 1995, 91 p. Disponível em : <<http://www.fao.org/docrep/006/V4940S/V4940S00.HTM>> Acesso em: 12 de Jan. 2018.
- SNOECK, P. P. M.; MELO, M. I. V.; ALVES, F. G. G. et al. Qual é o teste hiposmótico mais indicado para avaliar a integridade funcional de espermatozoides equino criopreservados?. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 36, n.4, p.355-361, out./dez.2014.
- SOLER, A. J.; GARCÍA, A. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R. et al. Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of Red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. **Journal of Andrology**, v. 24, p.746-756, set. /oct.2003.
- SOUSA, P. C. **Estudo dos danos morfofuncionais causados pela criopreservação no sêmen de Tatu-Peba (*Euphractus sexcinctus*, Wagler, 1830)**.2013.124f.Dissertação(mestrado em ciência animal)- Universidade Federal Rural do Semi-Arido, Mossoró-RN,2013.
- STRADIOTTI, C. G. P.; SILVA, J. F. S.; CUNHA, I. C. N. et al. Desenvolvimento de metodologia para coleta de sêmen de pacas. **Rev.Bra.de Med.Vet.**, v.37,p.222- 226. 2015.
- TEBET J. M.; MARTINS, M. I; CHIRINEA, V. H. et al. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**., v.66, p.1629-1632, 2006.
- TECIRLIOGLU, R. T.; LACHAM-KAPLAN, O.; TROUNSON, A. O. et al. Effects of electrical stimulation and seminal plasma on the motility of mouse sperm. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 14, p.471–478, 2002.
- TEIXEIRA, P. P. M.; BARROS, A.; VIEIRA, L. L. et al. Aspectos reprodutivos, endocrinológicos e de produção in vitro em pacas(*Cuniculus paca* – Linnaeus, 1766). **Investigação**, v.14, p.1-6, 2015.
- THOMASSEN, R. FARSTAD, W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. **Theriogenology**, v. 71, p. 190-199, 2009.
- TSUNEDA, P. P.; DUARTE, M. F.; SILVA, L. E. F. et al. Análise seminal e padronização da coloração eosina-nigrosina em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). **Rev. bras. Ci. Vet.** v. 22, n. 3-4, p. 198-201, jul./dez. 2015.

- VARISLI, O. C.; UGUZ, C.; AGCA, C. et al. Various physical stress factors on rat sperm motility, integrity of acrosome, and plasma membrane, **J.Androl.**v.30.p. 75–86.jan./fev.2009.
- VERA-MUNOZ, O.; AMIRAT-BRIAND, L.; DIAZ, T. et al. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: comparison to Triladyl and Bioxcell. **Theriogenology**.v.71,p.895-900. 2009.
- WILDT, D. E. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. **Anim.Reprod. Sci.**, v. 28, p.247-257, 1992.
- WILSON, E. O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 1997. Disponível em: <<http://torrent-the-tracker.in/fonts/biodiversidade-edward-wilson-download.html>>. Acesso em: 12 de Nov.2017
- WOLF, D. P.; VANDEVOORT, C. A.; MEYER-HAAS, G. R. et al. In vitro fertilization and embryo transfer in the rhesus monkey. **Biol. Reprod.**, v.41, p.335, ago.1989.
- YAFI, F.A.; ZINI, A. Percutaneous epididymal sperm aspiration for men with obstructive azoospermia: predictors of successful sperm retrieval. **Urology**, v.82, p.341-344. 2013.
- YU, I. ; LEIBO, S. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, v.57, p.1179-1190, 2002.
- ZUCARATTO, R; CARRARA, R; FRANCO, B. Dieta da paca (*Cuniculus paca*) usando métodos indiretos numa área de cultura agrícola na Floresta Atlântica brasileira. **Biotemas**, v. 23, n.1, p.235-239, 2011.