



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS - GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO CICLO
ESTRAL, CARACTERIZAÇÃO DA GESTAÇÃO E
VARIABILIDADE GENÉTICA DE PACA, *Cuniculus
paca* (Linnaeus, 1766), EM CATIVEIRO**

VÂNIA MARIA FRANÇA RIBEIRO

Manaus

2011



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIADE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO CICLO
ESTRAL, CARACTERIZAÇÃO DA GESTAÇÃO E
VARIABILIDADE GENÉTICA DE PACA, *Cuniculus
paca* (Linnaeus, 1766), EM CATIVEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biotecnologia

VÂNIA MARIA FRANÇA RIBEIRO

Orientador: Dr. Rodolfo Rumpf

Manaus

2011

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

R484m	Ribeiro, Vânia Maria França Manipulação farmacológica do ciclo estral, caracterização da gestação e variabilidade genética de paca, <i>Cuniculus paca</i> (Linnaeus, 1766.), em cativeiro/ Vânia Maria França Ribeiro. - Manaus: UFAM, 2011. 136 f.; il. color. ; 30 cm Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2011. Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Rumpf 1. Paca - Fecundidade 2. Paca – Reprodução 3. Genética animal 4. Diversidade biológica I. Rumpf, Rodolfo (Orient.) B. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título CDU (1997): 591.15/.16(043.3)
-------	--

Vânia Maria França Ribeiro

**MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO CICLO
ESTRAL, CARACTERIZAÇÃO DA GESTAÇÃO E
VARIABILIDADE GENÉTICA DE PACA, *Cuniculus
paca* (Linnaeus, 1766), EM CATIVEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós
graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal do Amazonas (UFAM), como parte
dos requisitos para obtenção do título de
doutor em Biotecnologia

Aprovada em de 2011

BANCA EXAMINADORA

1-

2

3

4

5

A Deus expressão máxima de amor e sabedoria minha fortaleza maior.

A Mauro, Raisal e Raiana Ribeiro razão e amores das minhas vidas.

A paca Mafalda, alegria do criatório, meu primeiro e único animal de estimação.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por não me abandonar e não me deixar fraquejar mesmo diante daquilo que parecia impossível, me inspirando coragem e muita determinação para realização deste sonho, mandando-me “anjinhos” para auxiliar sempre que as maiores dificuldades se apresentavam.

A meu esposo e filhas que sempre me apoiam e incentivam, sendo minha base sólida em todas as conquistas.

A meus pais que todos os esforços empregaram na minha formação moral e profissional.

A meus dois ídolos, Dr. Rodolfo Rumpf e Dr. Rodolpho Satrapa, a quem sempre admirei e respeitei, com os quais muito aprendi e tenho o que aprender.

A minhas colegas veterinárias e apaixonadas por silvestres Maria do Carmo Portela e Laiz Macedo Zamora, por acreditarem comigo e juntas montarmos e tocarmos o Programa de Criação e Pesquisa de Animais Silvestres Caboclinho da Mata.

Aos “anjinhos”: Dr. Francisco Glauco Araújo Santos (UFAC), Dra. Virginia Carvalho (Fundação Hospitalar), Dr. Jefferson Viana, Neilton Vasconcelos, Rosano Ramos, João Esteves e Francisco Dantas (Secretaria de Agropecuária). Dra. Renata Beltrão, Andréa Raposo, Tatiana de Campos, Daniela Bittencourt, José Marques Junior e Judson Valentim (Embrapa – Acre), e a Vanessa França minha irmã, pela ajuda certa na hora exata.

Ao amigo, motorista, tratador e ajudante de Veterinário, Luiz Alberto Lima.

Às minhas paquinhos: Menina, Ana terra, Ana Vitória, Bruna, Célia, Clívia, Creuza, Marina, Ana Terra, Cecília, Aline, Raí, Chiquinha, Carmem, Mari, Socorro, Edna, Carminda, Carina e Cristina que participaram deste trabalho, meu carinho e eternos agradecimentos.

Ao Governo do estado do Acre, primeiro na pessoa do hoje senador Jorge Viana que iniciou um novo modelo econômico de desenvolvimento para o nosso estado, baseado no uso e a conservação de nossos recursos naturais, que foi mantido pelo Governador Binho Marques e está sendo implementado por Tião Viana.

À Universidade Federal do Acre, minha casa.

Ao Departamento de Farmacologia da UNESP – Botucatu, nas pessoas do Dr. Ciro Moraes Barros, Rafael Satrapa e Eduardo Razza, pelas análises e quantificação da progesterona.

À Universidade Federal do Amazonas, em especial aos professores Dr. Spartaco, e Dra. Nair Otaviano Aguiar, por acreditarem e incentivarem nosso trabalho.

AGRADEÇO

RESUMO

Conhecida pela excelência do sabor de sua carne a paca (*Cuniculus paca* L.), sofre intensa pressão de caça nas regiões tropicais. Este fator associado a uma baixa taxa reprodutiva e a destruição de seus *habitats* em alguns estados do Brasil a coloca como espécie regionalmente ameaçada. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito de tratamentos hormonais sobre a fertilidade, caracterizar a gestação e determinar a variabilidade genética de uma população de *Cuniculus paca* L. em cativeiro como forma de contribuir com o manejo econômico a conservação desta espécie. No primeiro estudo, verificou-se o efeito de implantes de progestágenos (Norgestomet) associados a duas diferentes dosagens de gonadotrofinas, na sincronização e indução deaios em dois grupos de pacas (G1 e G2), os quais receberam 25 e 50 UI de eCG respectivamente e 0,5 ml de prostaglandina, comparados ao controle (G3), que não recebeu tratamento hormonal. As fêmeas do G1 apresentaram estro nos dias cinco, sete, 10,11 (uma paca /dia) e 14 (duas pacas) após a retirada do implante. As fêmeas do G2 apresentaram estro nos dias três (duas pacas), oito, 11 (três pacas). As taxas de prenhez para G1, G2 e G3 foram 100%, 66% e 50%, respectivamente. No G1 e G3, 100% das fêmeas produziram uma cria/parto, enquanto 50% das fêmeas do G2 produziram duas crias por parto. No segundo estudo, descreveu-se os tipos celulares presentes nos esfregaços vaginais aos 30, 60 e 90 dias de prenhez, determinou-se a concentração plasmática de progesterona e as medidas cefálicas dos fetos. Os resultados evidenciaram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tipos celulares encontrados aos 60 e 90 dias de prenhez. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as células naviculares e superficiais aos 30 dias em relação aos demais grupos. A progesterona quantificada apresentou-se em média de $0,54 \pm 0,65$ e $0,53 \pm 0,77$ ng/mL, aos 60 e 90 dias. As medidas cefálicas (DBP), e o incremento destas medidas em 30 dias foram de $1,25 (\pm 0,16)$ e $2,34 (\pm 0,25)$, $1,09$ cm ($\pm 0,30$). No terceiro estudo, 48 indivíduos foram avaliados com relação à variabilidade e estrutura genética, utilizando-se como marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Estes marcadores mostraram-se eficientes na amplificação de DNA genômico de pacas, gerando 50 locos polimórficos. A maior distância genética entre as populações formadoras do plantel foi entre a população de Rio Branco - AC e Tarauacá / Envira - AC (0,5280) e a menor entre Rio Branco - AC e Belém-PA (0,0421). As análises genéticas geradas pelo software Structure demonstraram a tendência de agrupamento entre indivíduos pertencentes a mesma região geográfica. Os resultados deste trabalho contribuem sobremaneira para um melhor conhecimento da espécie favorecendo seu uso e conservação.

PALAVRAS CHAVES: sincronização de estro, indução de estro, prenhez em paca, diâmetro fetal, diversidade genética, Amazônia.

ABSTRACT

Known for the excellence of the flavor of your meat paca (paca *Cuniculus L.*), suffers from intense hunting pressure in the tropics. This factor combined with a low reproductive rate and habitat destruction in some states of Brazil, poses as regionally threatened species. This study aimed to evaluate the effect of hormonal treatment on fertility, pregnancy characterize and determine the genetic variability of a population of *Cuniculus paca L.* in captivity as a contribution to the economic management to conserve the species. In the first study, the effect of progestin implants (Norgestomet) associated with two different doses of gonadotropins, in synchronization and induction of the heats in two groups of cavies (G1 and G2), which received 25 and 50 IU of eCG respectively, and 0.5 ml of prostaglandin, compared with control (G3), which received no hormone treatment. Females in estrus showed G1 day five, seven, 10.11 (a paca / day) and 14 (two cavies) after implant removal. G2 Females had three days in estrus (two cavies), eight, 11 (three cavies). Pregnancy rates for G1, G2 and G3 were 100%, 66% and 50% respectively. In G1 and G3, 100% of the females produced a litter / delivery, while 50% of the G2 females produced two litters per delivery. In the second study, we described the cell types present in vaginal smears at 30, 60 and 90 days of pregnancy, we determined the plasma concentration of progesterone and the measures of cephalic fetuses. The results showed that there was no significant difference ($p > 0.05$) between the cell types found at 60 and 90 days of pregnancy. There were significant differences ($p < 0.05$) between the navicular and superficial cells at 30 days compared to other groups. Progesterone quantified presented an average of 0.54 ± 0.65 and 0.53 ± 0.77 ng / mL at 60 and 90 days. Cephalic measurements (BPD), and the increase of these measures in 30 days were $1.25 (\pm 0.16)$ and $2.34 (\pm 0.25)$, 1.09 cm (± 0.30). In the third study, 48 individuals were assessed for variability and genetic structure, using as a molecular marker ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). These markers were efficient in the amplification of genomic DNA of cavies, generating 50 polymorphic loci. The greatest genetic distance between populations forming the squad was among the population of Rio Branco - AC and Tarauacá / Envira - AC (0.5280) and lower in Rio Branco - AC and Belém-PA (0.0421). Genetic analysis generated by the software Structure showed a tendency to cluster among individuals belonging to the same geographic region. The results of this work contributes greatly to a better understanding of the species favoring its use and conservation.

KEYWORDS: synchronization of estrus, induction of estrus, pregnancy paca, fetal diameter, genetic diversity, Amazon.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Fêmea adulta de <i>Cuniculus paca</i> e seu filhote.....	8
Figura 2 - Distribuição de <i>C. paca</i> de acordo com Perez, E. (1992).....	9
Figura 3 - Células basais de <i>Cuniculus paca</i>	25
Figura 4 - Células parabasais de <i>Cuniculus paca</i>	26
Figura 5 - Células intermediárias de <i>Cuniculus paca</i>	27
Figura 6 - Células superficiais anucleadas de <i>Cuniculus paca</i>	28

CAPÍTULO 1

INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE CIOS FÉRTEIS EM PACAS (*Cuniculus paca* L.)

Figura 1 - Inserção subcutânea do Crestar® em <i>Cuniculus paca</i>	55
Figura 2 - Espermatozóides de <i>Cuniculus paca</i>	56
Figura 3 - Células intermediárias com pigmentos de nucleoproteínas de <i>Cuniculus paca</i>	63
Figura 4 - Células pré-ovulatórias de <i>Cuniculus paca</i>	64
Figura 5 - Paca com gêmeos, nascidos após sincronização e indução de cio.	66

CAPÍTULO 2

QUADRO CITOLÓGICO VAGINAL, CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROGESTERONA DURANTE A GESTAÇÃO E MEDIDAS FETAIS EM PACA (*Cuniculus paca* L.)

Figura 1 - Imagem ultrassonográfica de feto de <i>Cuniculus paca</i>	85
Figura 2 - Fotomicrografia de esfregaço vaginal de <i>Cuniculus paca</i> . Células naviculares.....	86
Figura 3 - Fotomicrografia de esfregaço vaginal de <i>Cuniculus paca</i> . Células endocervicais.....	87

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM UM PLANTEL DE PACAS (*Cuniculus paca* L.) POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Figura 1 - Perfil de amplificação do marcador Zm2 em 24 amostras de <i>Cuniculus paca</i>	106
Figura 2 - Dendrograma agrupando populações de <i>Cuniculus paca</i> de Rio Branco-AC, Belém-PA e Tarauacá-AC com base na similaridade genética. Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética - UPGMA (Nei, 1978).	108
Figura 3 - Dendrograma obtido a partir da análise de ISSRs com 48 genótipos de <i>Cuniculus paca</i> , utilizando o índice de similaridade de Nei (1978) e o método de agrupamento UPGMA.	110
Figura 4 - Histograma dos 48 indivíduos de <i>Cuniculus paca</i> com a composição dos <i>pools</i> gênicos dos grupos obtida pela análise do Structure, sob a observância do $K = 2$. Cada indivíduo está representada por uma linha vertical dividida em $K = 2$ segmentos, com comprimentos proporcionais a cada inferido <i>pool</i>	112

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro1- Diferentes índices reprodutivos de <i>Cuniculus paca</i> , encontrados por diferentes autores.....	19
Quadro 2 - Descrição de células basais encontradas em citologia vaginal de fêmeas de <i>Cuniculus paca</i> e <i>Homo sapiens</i>	25
Quadro 3 - Descrição de células parabasais encontradas em citologia vaginal de fêmeas de <i>Cuniculus paca</i> , <i>Canis familiares</i> e <i>Homo sapiens</i> ...	26
Quadro 4 - Descrição de células intermediárias encontradas em citologia vaginal de fêmeas de <i>Cuniculus paca</i> , <i>Canis familiares</i> e <i>Homo sapiens</i> ...	27
Quadro 5 - Descrição de células superficiais encontradas em citologia vaginal de fêmeas de <i>Cuniculus paca</i> , <i>Canis familiares</i> e <i>Homo sapiens</i> ...	28

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

QUADRO CITOLÓGICO VAGINAL, CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROGESTERONA DURANTE A GESTAÇÃO E MEDIDAS FETAIS EM PACA (*Cuniculus paca* L.)

Tabela 1 - Tipos celulares em esfregaço vaginal de pacas (<i>Cuniculus paca</i>) aos 30, 60 e 90 dias de prenhez (média \pm desvio padrão dos percentuais).	89
---	----

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM UM PLANTEL DE PACAS (*Cuniculus paca* L.) POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Tabela 1 - Sequência de iniciadores utilizados, número de locos encontrados, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos no estudo populacional de <i>Cuniculus paca</i> usando marcadores ISSR.	107
Tabela 2 – Matriz de similaridade e distância genética entre três populações de <i>Cuniculus paca</i>	108

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivo Geral	4
1.2 Objetivos Específicos.....	4
1.3 Hipóteses.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Taxonomia da Paca	7
2.2 Distribuição Geográfica, <i>Habitat</i> e Hábitos	10
2.3 Morfologia do Sistema Reprodutivo e Biologia Reprodutiva.....	12
2.4 Colpocitologia Hormonal (Citologia Esfoliativa Vaginal).....	21
2.5 Manipulação Farmacológica do Ciclo Estral.....	29
2.5.1 Progesterona e / ou progestágenos.....	30
2.5.1.1 Progestágenos associados a Gonadotrofinas Coriônica Equina (ECG) no controle do ciclo estral.....	32
2.6 Diagnóstico de Gestação ou Prenhez	33
2.7 Marcadores Moleculares.....	36
2.8 Bibliografia Citada	40
CAPÍTULO 1 - INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE CIOS FÉRTEIS EM PACAS (<i>Cuniculus paca</i> L.).....	48
Resumo	49
Abstract	50
Introdução	51
Metodologia	54
Aspectos legais	57
Resultados e discussão	57
Conclusões	67
Bibliografia citada	68

CAPÍTULO 2 QUADRO CITOLÓGICO VAGINAL, CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROGESTERONA DURANTE A GESTAÇÃO E MEDIDAS FETAIS EM PACA (<i>Cuniculus paca</i> L.).....	76
Resumo	77
Abstract	78
Introdução	79
Material e métodos	82
Aspectos legais	86
Resultados e discussão	88
Conclusões	94
Bibliografia citada.....	94
CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM UM PLANTEL DE PACAS (<i>Cuniculus paca</i> L.) POR MEIO DE MARCADORES ISSR.....	100
Resumo	101
Abstract	102
Introdução	103
Material e métodos	104
Análise Estatística.....	105
Aspectos legais	106
Resultados	106
Discussão	110
Bibliografia citada.....	113
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	118

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Na América Latina, a paca está entre as espécies mais intensamente caçadas, principalmente por causa de sua carne, cotada como a mais apreciada entre todas as carnes de caça (DEUTSCH; PUGLIA, 1988; SANTOS, 1984). De acordo com o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MMA, 2008), a paca já é considerada regionalmente ameaçada nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro.

Nos últimos 10 a 15 anos foram constatados que o uso e a preservação dos recursos genéticos animais são inseparáveis (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002). Smythe e Brown De Guanti (1995) observaram que o aumento do número de pessoas colonizando florestas tropicais, promove um rápido aumento da quantidade de proteínas de alta qualidade de que necessitam que vai além de sua capacidade de produzi-las. Portanto, as populações de animais de caça, adequadas a satisfazer a necessidade dos indígenas que ali habitam, por exemplo, são super exploradas e rapidamente exterminadas devido à caça indiscriminada e a destruição do meio ambiente.

Correntes conservacionistas apontam a criação de animais silvestres com finalidade comercial como um dos caminhos certos para a conservação 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 (NOGUEIRA - FILHO; NOGUEIRA, 1999; MASON, 1984).

De acordo com Mason (1984) e Hosken e Silveira (2001), os animais domésticos diferem de seus semelhantes silvestres quando: 1 - reproduzem sob controle humano; 2 - oferecem ao homem um produto ou serviço; 3 - são domados ou amansados e selecionados de organismos silvestres.

Com relação à domesticação da paca, diversos autores, (SMYTHE, 1987; SMYTHE; BROWN de GUANTI, 1995; RENGIFO *et al.*, 1996; NOGUEIRA, 1997; NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 1999; HOSKEN; SILVEIRA, 2001; LAMEIRA, 2002, RIBEIRO; ZAMORA, 1998) relatam experiências exitosas na criação e domesticação desta espécie em cativeiro, principalmente no que se refere aos itens dois e três dos critérios de Manson (1984) e Hosken e Silveira (2001). Porém, com relação ao item 1 - reprodução, todos em suas experiências relatam um potencial reprodutivo baixo, para uma espécie cuja criação em cativeiro é apontada como fonte de proteína, alternativa de renda e diversificação da produção rural, contribuidora para os programas de repovoamento de áreas florestais e formação e conservação de bancos genéticos.

De acordo com Lameira (2002), a implantação de técnicas de manipulação adequada e da biotecnologia permitirá a seleção genética que resultará no aumento da eficiência reprodutiva e produtiva de pacas. Dentro da exploração racional e econômica de qualquer espécie doméstica, a utilização de biotecnologias da reprodução tais como a inseminação artificial (I.A.), transferência de embriões (T.E.), aspiração folicular guiada por ultrasonografia (OPU – *ovum pick up*), com posterior fecundação *in vitro* (FIV), o uso de marcadores genéticos, a formação de bancos de sêmen, óvulos, embriões e folículos, a sexagem do sêmen, a identificação do sexo do embrião, a clonagem e a própria transgenia, são técnicas que juntas ou separadas podem ser de grande valia na reprodução animal e têm sido apontadas como de fundamental importância para obtenção de ganhos genéticos expressivos nas espécies domésticas e como ferramentas imprescindíveis na preservação e conservação de recursos genéticos de animais domésticos e de espécies silvestres em extinção (VALE, 1999; RUMPF *et al.*, 2000).

Sem dúvidas, o estabelecimento de propostas para criação de animais silvestres, utilizando-se a biotecnologia da reprodução, já estabelecida em animais domésticos e de

laboratórios, constitui-se na forma mais apropriada para viabilizar programas de uso e conservação destas espécies desde que se respeite e se conserve a variabilidade genética dos reprodutores, se tenha bem estabelecido o conhecimento sobre a biologia reprodutiva do animal a ser trabalhado, bem como sua resposta fisiológica ao emprego de preparados hormonais, assim como devem ser efetuadas observações criteriosas da ocorrência de possíveis complicações advindas do emprego destas técnicas. Considerando esta realidade, este trabalho possui os seguintes objetivos:

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a fertilidade reprodutiva, em resposta a tratamentos hormonais, caracterizar a gestação e a variabilidade genética de uma população de *Cuniculus paca* em cativeiro como forma de contribuir com o uso e conservação desta espécie.

1.2 Objetivos Específicos

- 1) Verificar o efeito de implantes de progestágenos (Norgestomet) associados a duas diferentes dosagens de gonadotrofinas (eCG) na sincronização e indução deaios férteis;
- 2) Dosar os níveis de progesterona plasmática no ciclo antes e após a aplicação de progestágenos e na prenhez de paca;
- 3) Comparar os índices de fertilidade e prenhez das fêmeas de *Cuniculuspaca* submetidas a diferentes tratamentos hormonais assim como o estado de saúde das crias geradas.
- 4) Proporcionar maiores conhecimentos sobre a fase gestacional nesta espécie;

5) Determinar as diferentes fases do ciclo estral de pacas nas condições de cativeiro por meio de análises citológicas do epitélio vaginal antes e após a utilização de tratamentos hormonais e durante três momentos diferentes de gestação;

6) Determinar a variabilidade genética de um plantel de pacas por meio de marcadores moleculares.

1.3 Hipóteses

1.3.1- Considerando que experiências bem sucedidas em animais domésticos podem ser extrapoladas para os animais silvestres, acredita-se que os protocolos de sincronização e indução de cio propostos neste trabalho, embasados nos utilizados para as espécies caprina (*Capra hircus*), ovina (*Ovis aries*) e bovina (*Bos taurus e indicus*) sejam eficientes em induzir e produziraios férteis em *Cuniculus paca*.

1.3.2- A capacidade da Gonadotrofina Coriônica Equina em estimular o desenvolvimento de folículos ovarianos (efeito superovulatório) proporcionará partos gemelares.

1.3.3- Os protocolos hormonais utilizados não afetarão a higidez física e comportamental dos animais.

1.3.4- Da mesma forma que o epitélio vaginal expressa as modificações hormonais sofridas ao longo do ciclo estral, será possível identificar a prenhez em *Cuniculus paca* por meio de colpocitologia.

1.3.5- O diâmetro biparietal de fetos de paca, obtido por meio de ultrassonografias servirá de parâmetro para diagnóstico de tempo de prenhez em pacas.

1.3.6- Marcadores moleculares ISSR, são eficientes em estudos de variabilidade genética em pacas.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia da Paca

Mondolfi (1972) observou que as pacas apresentam características morfológicas que as separam das cutias, *Dasyprocta*, e das acouchis ou cutiaras *Myoprocta*. Segundo este autor, o termo genérico *Cuniculus* foi usado erroneamente para a paca. Porém Alho (1982), reconheceu *Cuniculus paca*, pertencente à subordem Hystricomorpha e à família Cuniculidae. Eisenberg (1989) ainda inseriu a paca na família Agoutidae sob o gênero *Agouti*, pertencente à superfamília Caviodeia, que juntamente com as famílias Caviidae, Hydrochoeridae e Dasyproctidae constituindo o grupo de roedores histricognatas do Novo Mundo.

A espécie *Aguti paca* - foi descrita por Linnaeus em 1766. A nomenclatura zoológica, sistema de nomes aplicados aos taxons animais, de acordo com Bernardi (1994), é regida pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN,1985), um sistema de regras e recomendações acerca da maneira correta de compor e aplicar os nomes zoológicos. De acordo com o parecer do *Bulletin of Zoological Nomenclature* publicado em setembro de 2006, o gênero deste táxon tem sido debatido, mas esta instabilidade nomenclatural foi resolvida com a decisão da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (1998) para a validade de *Cuniculus* Brisson, 1762. O gênero *Cuniculus* foi criado por Brisson, 1762 com citação: *Cuniculus* Brisson, 1762. O gênero *Agouti* criado por Gray em 1821, passou a ser seu sinônimo junior. Segundo Bernardi (1994), a lei de Prioridade é uma lei da nomenclatura zoológica, que estabelece que o nome mais antigo proposto para um determinado animal é o que prevalece. Portanto, a citação validada para as duas espécies de paca conhecida é *Cuniculus paca* (Linnaeus, 1766) e *Cuniculus taczanowiskii* (Linnaeus, 1766). Desta forma, a classificação taxonômica para paca consiste em: ordem Rodentia, subordem Hystricomorpha,

superfamília Caviioidea e família Cuniculidae possuindo apenas um gênero e duas espécies sendo que apenas uma delas é conhecida no Brasil - *Cuniculus paca* (ALHO, 1982; OLIVEIRA; BONVICINO, 2006) adotada em nossos trabalhos (Figura 1).

Moreira e MacDonald (1997) e Nogueira Filho e Nogueira (1999) definem como sendo a *Cuniculus taczanowskii*, aquela espécie de paca encontrada apenas na região andina no noroeste da Venezuela, Colômbia, Equador e, possivelmente, no Peru, não sendo encontrada no Brasil. Pérez, (1992) descreve as duas espécies como:

- *Cuniculus taczanowskii* – cor marrom avermelhada, pelo macio, corpo curto e região zigomática menos rugosa que a outra espécie.
- *Cuniculus paca* – cor marrom avermelhada, chocolate escuro ou cinza esfumada, pelo áspero, corpo e região zigomática mais rugosa, maior que da outra espécie (Figura 1).



Figura 1- Fêmea adulta de *Cuniculus paca* e seu filhote (foto: Laiz Zamora)

Ainda de acordo com Pérez (1992), cinco subespécies de *Cuniculus paca* são reconhecidas:

- *Cuniculus paca guanta* Lönnberg, 1921 Encontrada em Gualea, 5.000 pés, província de Pichincha, Equador (Figura 2 - 1).

- *Cuniculus paca mexianae* Hagmann, 1908. Encontrada em “Insel Mexiana”, Pará Brasil (Figura 2 – 2).
- *Cuniculus paca nelsoni* Goldman 1913. Encontrada em Catemaco, sul de Vera cruz, México (Figura 2 - 3).
- *Cuniculus paca paca* Linnaeus , 1766. Encontrada em Pernambuco, Brasil (Figura 2 - 4).
- *Cuniculus paca virgatus* Bangs, 1902. Encontrada em Divala, Chiquiri, Panamá (Figura 2 - 5).



Figura 2- Distribuição de *Cuniculus paca* de acordo com Perez (1992). 1. *Cuniculus paca guanta*, 2. *Cuniculus paca mexianae*, 3. *Cuniculus paca nelsoni*, 4. *Cuniculus paca paca*, 5. *Cuniculus paca virgatus*.

2.2 Distribuição Geográfica, *Habitat* e Hábitos

Entre os roedores do Brasil, a capivara, *Hydrochaeris hydrochaeris*, e a paca, constituem o primeiro e segundo maior roedor, respectivamente (MATAMOROS 1982; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Sua distribuição (Figura 2), de acordo com Matamoros (1982) vai desde o sul do México até o norte da Argentina. Para Rengifo *et al.* (1996), a ocorrência vai desde o sul do México até o Brasil. Mondolfi (1972) relata que a espécie é encontrada também no sul da Argentina, já Smythe (1991) relata ter sido esta espécie introduzida na ilha de Cuba. Como se observa, as pacas ocupam uma grande variedade de *habitats*, desde a América Central até a América do Sul em regiões que variam de floresta úmida, capoeiras densas, bosques secos ou úmidos, cerrados e caatingas, às margens de rios ou lagoas ou mesmo pântanos (COLLET, 1981; SANTOS, 1984). Podem ocorrer em nível do mar ou até em regiões de frio, a 1700 m de altitude (BRIEVA, 2001).

Conforme sua área de ocorrência, a espécie *Cuniculus paca* possui diferentes denominações além de paca. Assim sendo, de acordo com Román (2001), no Equador em castelhano se chama *guanta*; nos países de idioma inglês, bem como, na Argentina e no Brasil se chama paca. É conhecida como *gibnut*, em Belize; *borugo*, *tinajo*, *guartinajo*, *guardatinajo*, *guagua e lapa*, na Colômbia e Venezuela. *Pak*, na Guiana Francesa; *tepezcuintle* e *haleb*, na América Central; *tepezcuintle*, *guatusa real* ou *perro de monte*, no México; *majaz* e *picuro*, no Peru; *conejo pintado*, no Panamá; *water haas*, no Suriname e *acutipá*, na língua guarani.

São animais assustados, mas inofensivos, de costumes crepusculares e noturnos (RENGIFO *et al.*, 1996). Matamoros (1982) observou que o período de maior atividade destes animais compreende das 17:00 às 04:00 horas, sendo maior ao redor de meia noite. Por serem animais noturnos, as pacas têm fobia à luz, buscando sempre a sombra das vegetações baixas

dos bosques quando procuram alimento (SMYTHE; BROWN de GUANTI, 1995). Hosken e Silveira (2001) os consideram animais de temperamento agressivo, atacando inclusive outra paca que se encontre perto de sua toca. Em área natural, se refugiam durante o dia no interior de troncos ocos ou escavações no subsolo para proteger-se das correntes de ar, mudanças de temperatura, sol excessivo e da presença de algum predador natural (RENGIFO *et al.*, 1996).

Quanto à dieta, a paca é considerada por muitos autores, como generalista em relação ao consumo de alimentos, consomem os frutos disponíveis em cada estação do ano (PEREZ, 1992); como herbívoros, controla o crescimento das folhas de arbustos e herbáceas e é um dispersor de sementes (MONTES, 2005). Smythe e Brown de Guanti (1995) classificam as pacas como onívoros. Ribeiro e Zamora (2008), criando pacas em cativeiro obtiveram excelentes resultados na reprodução, cria e engorda de pacas, alimentando-as com uma dieta balanceada de frutas, verduras, tubérculos, sementes, castanhas e leguminosas, complementando com sal mineral à vontade. Estas últimas autoras perceberam uma preferência alimentar destes animais por frutas cítricas. Por terem estes hábitos alimentares, em algumas regiões podem ser consideradas pragas agrícolas de milho, cana de açúcar, melancia, mandioca, inhame, verduras e outras culturas (MONDOLFI, 1972).

Na natureza são raramente vistas em pares, são solitárias em seu comportamento de forrageio e dois adultos não ocupam a mesma toca, aparentando serem animais solitários, com pares de adultos vivendo em uma área de aproximadamente 2,5 ha em média, defendida contra invasores (MOREIRA; MACDONALD, 1997).

2.3 Morfologia do Sistema Reprodutivo e Biologia Reprodutiva

Ao nascerem, as pacas não apresentam dimorfismo sexual (ROMÁN, 2001; RIBEIRO; ZAMORA, 2008). As pacas sexualmente maduras são dimórficas, com os machos ligeiramente maiores em seu tamanho corporal e com um arco zigomático da face mais proeminente e rugoso que nas fêmeas (COLLET, 1981). Eles não apresentam um escroto bem definido e os testículos se localizam na região inguinal. A túnica cremastérica bem desenvolvida, associada à presença de um amplo canal inguinal, favorece a movimentação testicular para o interior da cavidade abdominal (CARRETA JÚNIOR, 2008). De acordo com Román (2001), somente quando as fêmeas estão em cio, os testículos migram para o saco escrotal e se pode observá-los durante um tempo. Pérez (1992), Hosken e Silveira (2001), e Ribeiro e Zamora (2008), observaram que o pênis da paca possui uma estrutura rígida e serrilhada na face lateral. Esta estrutura, segundo Carreta Junior (2008) faz com que durante a cópula sempre ocorra uma lesão vaginal o que acarretaria a inibição da cópula por outros machos, reforçando assim, o comportamento monogâmico da espécie. Mondolfi (1972) sugere que esta complexa estrutura estimula a ovulação da fêmea, o que é rechaçado por Matamoros e Pashov (1984) que afirmam ser a paca um ovulador espontâneo.

O conhecimento do processo reprodutivo é essencial para identificar os fatores de riscos que afetam o comportamento e a eficiência reprodutiva e possibilitar o controle dos pontos críticos que permitam alcançar uma ótima produtividade, sempre em relação à atividade cíclica ovariana, fertilidade e prolificidade (GONZÁLEZ - STAGNARO, 2002).

Matamoros (1981) foi a primeira a descrever aspectos da anatomia e histologia do sistema reprodutor da fêmea deste roedor, com a finalidade de compreender melhor sua fisiologia e comportamento, como se vê a seguir:

Ovários: Encontram-se localizados caudalmente em relação aos rins. São corpos amarelos, ovalados, que medem aproximadamente 0,8cm x 0,5cm, de superfície lisa, com pequenas porções transparentes que ao microscópio demonstraram ser corpos lúteos e folículos em desenvolvimento. Ao observar um corte histológico do ovário de uma fêmea de dois meses de idade, não se verifica uma medula bem definida, já que o córtex ocupa quase todo o órgão. Este está constituído de duas porções: a parte externa que apresenta um grande número de folículos e uma parte interna que está constituída por numerosos folículos em crescimento, alguns nos quais desenvolvem até dois óvulos. Os ovários da fêmea adulta prenhe diferem em número de folículos e de corpos lúteos: no ovário que corresponde ao corno prenhe se observa o corpo lúteo principal (maior que as demais estruturas), três corpos lúteos acessórios, folículos de Graaf e dois folículos em crescimento. No ovário correspondente ao corno não prenhe, seis folículos e aproximadamente dezoito corpos lúteos acessórios.

Weir e Rowlands (1974), após estudarem ovários de várias espécies da subordem Hystricomorpha identificaram características comuns a quase todas elas, o que foi posteriormente confirmado para aquelas encontradas em *Cuniculus paca* por Matamoros (1981). Isto confirma que os histicomorfos caracterizam-se por apresentarem padrões semelhantes em seu processo reprodutivo, tais como numerosos corpos lúteos e folículos em diferentes estágios de maturação, no ovário da fêmea gestante, e folículos em desenvolvimento e poliovulares na fêmea pré-púbere com a presença de uma membrana que fecha a entrada da vagina. A grande quantidade de corpos lúteos acessórios em ambos os ovários da fêmea prenhe encontrada por Matamoros (1981), concorda com as observações de Weir e Rowlands (1974), em outros histicomorfos. Isto sugere que estas estruturas têm a função de produzir o hormônio progesterona, necessário à gestação, e que a grande quantidade de folículos em diferentes fases de desenvolvimento, no ovário dessas fêmeas, sugere pensar que existe cio após parto (MATAMOROS, 1981). Este último autor descreve a seguir, as demais estruturas que compõem o aparelho reprodutor de fêmeas de pacas:

Oviduto: É um tubo fino de aproximadamente 5cm de comprimento, que se põe em contato com a superfície média do ovário e com o mesovário.

Útero: É um órgão bi-córneo. Cada corno mede aproximadamente 12 cm de comprimento. Externamente, une-se por meio de uma membrana delgada, formando um falso corpo.

Vagina: Estrutura de aproximadamente 14 cm de comprimento, localizada na pélvis, abrindo-se ao exterior por meio de um orifício vaginal. Em algumas fêmeas, o orifício vaginal está completamente fechado.

O ciclo estral caracteriza-se por modificações cíclicas que ocorrem nas fêmeas domésticas após a puberdade, sendo definido como ritmo funcional do aparelho reprodutor feminino, regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente aqueles referentes à secreção hormonal ovariana (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Diversos autores obtiveram resultados bastante similares a respeito da duração do mesmo em paca, tomando-se por base a dinâmica da população de células epiteliais e presença de leucócitos junto à mucosa vaginal, propiciadas pelas mudanças hormonais. Assim, Matamoros e Pashov (1984), obtiveram uma média de 31,16 dias (amplitude de variação de 12-67 dias); Nogueira (1997) reportou a duração média do ciclo em 33,4 dias \pm 4,4 dias, enquanto que Lameira (2002) obteve duração média de 32,5 \pm 3,69 dias, com amplitude de 24 a 42 dias, Bastos *et al.* (2003) de 32,5 dias \pm 3,7 dias, e Guimarães *et al.* (2008) de 32,5 \pm 3,7 dias. Pérez e Baz (2006), encontraram o valor de 29 \pm 8.4 dias para o período do ciclo estral, baseando-se em achados macroscópicos e microscópicos dos ovários da paca associando com as dosagens hormonais.

A duração do ciclo estral relatada por Matamoros e Pashov (1984), foi baseada no cálculo do período compreendido entre o primeiro dia de abertura vaginal de um ciclo e o dia anterior à abertura do ciclo seguinte. O dia de abertura parece ser o dia do estro, durante o qual o canal vaginal encontra-se aberto.

Nogueira (1997) relata que observou no primeiro dia da coleta de esfregaço vaginal, algumas fêmeas com a membrana vaginal perfurada, coincidindo com o resultado das lâminas após a leitura (fase de estro), e pelo fato de realizarem esfregaços de 48 em 48 horas, a membrana vaginal permaneceu aberta durante todo o tempo das coletas (57 dias). Pereira *et al.* (1995) e Lameira (2002) constataram que a abertura do canal vaginal iniciou-se no final do proestro, apresentando-se completa na fase de estro, tornando-se a fechar no metaestro. A segunda autora também observou que o canal vaginal permaneceu fechado no período

gestacional e pós – parto até o primeiro cio, sendo que nos dois primeiros dias após a parição o canal permaneceu aberto. Smythe (1991) relatou que a abertura da membrana vaginal não parece estar necessariamente relacionada com o estado reprodutivo da fêmea havendo variação de uma para outra.

Com relação às fases do ciclo estral, de acordo com análises colpocitológica, Matamoros e Pashov (1984) encontraram três fases definidas como:

a) Proestro - onde se percebe um maior número de células parabasais e intermediárias em maior número que as superficiais e ainda elevado número de leucócitos, diminuindo ao final deste período.

b) Estro – com 65 a 100% de células cornificadas com núcleo picnótico ou sem núcleo. Geralmente se percebe ausência de leucócitos nesta fase

c) Posestro – com aparecimento de células epiteliais cornificadas e ao final desta fase, poucas células epiteliais maduras e grande quantidade de células imaturas.

Nogueira (1997) definiu como sendo fases do ciclo estral da paca:

a) Proestro - células intermediárias e parabasais em maior número que células superficiais pequenas e ainda a presença de leucócitos. Com a proximidade do estro as células superficiais aumentaram e diminuiu o número de células intermediárias parabasais e leucócitos.

b) Estro - quase a totalidade das células era formada por células superficiais com pequena presença de células intermediárias e ausência de leucócitos.

c) Metaestro - aparecimento repentino de grande número de células intermediárias e parabasais, além de leucócitos, com redução de células superficiais.

d) Anestro - células intermediárias e parabasais e restos celulares.

Outros autores sugeriram nova composição para o ciclo estral da paca, com pequenas variações:

a) **Proestro** - predominância de células superficiais nucleadas e anucleadas com discreta invasão leucocitária (PEREIRA *et al.*, 1995). Células superficiais nucleadas predominaram agrupadas, devido à presença de muco e com intensa população leucocitária (LAMEIRA, 2002).

De acordo com Bastos *et al.* (2003) e Guimarães *et al.* (2008), nesta fase ocorreu aumento progressivo de células superficiais nucleadas concomitante com a diminuição da frequência de outros tipos celulares. Os leucócitos diminuíram gradativamente até o final da fase que dura $10,3 \pm 4,21$ dias.

b) **Estro** - predominância de células superficiais anucleadas, com ausência de leucócitos. Nesta fase que dura cerca de $1,05 \pm 0,22$ dias o muco estava abundante porém não se corou (PEREIRA *et al.*, 1995; LAMEIRA, 2002; BASTOS *et al.*, 2003 GUIMARÃES *et al.*, 2008)

c) **Metaestro** - células intermediárias e parabasais com expressiva invasão leucocitária (PEREIRA *et al.*, 1995; LAMEIRA, 2002; BASTOS *et al.*, 2003) foram observadas nesta fase que dura cerca de $5,6 \pm 3,87$ dias, células de foan e células do metaestro (GUIMARÃES *et al.*, 2008)

d) **Diestro** - células basais com leucócitos (PEREIRA *et al.*, 1995). As células parabasais e basais ocorreram em maior número em relação às outras, a taxa leucocitária estava reduzida, e ainda foi possível observar células intermediárias e superficiais bastante degeneradas. Esta fase dura $14,7 \pm 4,57$ dias (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

Em estudos sobre ciclo estral da paca em cativeiro, foi observado que não é necessária a presença do macho para que ocorra abertura vaginal, constatando ser a paca um ovulador espontâneo (MATAMOROS; PASHOV, 1984; LANDIN JUNIOR, 2000; PÉREZ; BAZ, 2006). Clinicamente o cio das pacas é de difícil detecção (SMYTHE, 1991; NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 1999). O período médio de abertura vaginal calculado por Matamoros

e Pashov (1984) foi de 13,97 dias que se refere provavelmente ao estro. Lameira (2002) e Bastos *et al.* (2003), afirmam ser o estro da paca de apenas um dia ($1,05 \pm 0,22$). Brieva (2001) sugere que o cio parece ter duração de 18 a 21 dias e Pérez (2001) de um a dois dias. Fêmeas no cio apresentam a vulva vermelha, túrgida e flácida (RENGIFO *et al.*, 1996; BRIEVA, 2001).

O melhor sinal de que uma fêmea está no cio é quando o macho dedica muito tempo a segui-la (SMYTHE, 1991). As fêmeas em criatórios apresentam cio sincronizado o que pode resultar em várias fêmeas prenhes ao mesmo tempo (NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 1999; BRIEVA, 2001). A cópula em geral ocorre à noite e um achado pós-cópula é o tampão vaginal de sangue e sêmen que é expulso e pode ser ingerido pela fêmea (BRIEVA, 2001). Nogueira (1997), Hosken (1999) e Lameira (2002), observaram sangramento e limpeza da região genital após a cópula.

O consumo do *plug* copulatório pela fêmea dificulta a visualização e a expectativa de que a fêmea foi acasalada, porém segundo estes últimos autores, às vezes este *plug* copulatório pode ser observado por até quatro dias e pouco a pouco é expulso, sendo algumas vezes encontrado no tanque d'água. Nogueira Filho e Nogueira (1999) e Ribeiro e Zamora (2008), também observaram pequenas gotas de sangue no chão nas baias de piso de cimento após acasalamentos, provavelmente devido às estruturas já descritas dos pênis dos machos de paca que ferem a fêmea no ato da cópula.

De acordo com Nogueira Filho e Nogueira (1999), Landim Junior (2000) e Ribeiro e Zamora (2008), as pacas se reproduzem durante o ano todo, mas segundo estas últimas autoras, no Brasil existem registros de concentração de nascimentos durante os meses de julho a agosto. NOGUEIRA (1997) verificou distribuição de nascimentos durante o ano todo com frequências maiores nos meses de julho, e entre novembro e janeiro (à exceção dos meses de fevereiro, março e agosto). LAMEIRA (2002) observou a distribuição de nascimentos

durante o ano todo com exceção nos meses de janeiro e agosto sendo que a maior frequência foi no mês de maio. BRIEVA (2001) relata que por serem muito susceptíveis às condições ambientais a que estão submetidas em cativeiro, as pacas apresentam certas variações em alguns parâmetros reprodutivos. Oliveira *et al.* (2007) observaram durante quatro anos 25 prenhez, em 13 diferentes pacas, por meio de ultra-sonografia.

Desta forma, constataram que houve nascimento de apenas um animal por parto, ressaltando a característica reprodutiva de uniparidade, o que evidencia a tendência de nascimento de apenas um filhote por parto, nessa espécie. Nogueira *et al.* (2006), observaram de janeiro de 1991 a janeiro de 1997, dentre os 20 nascimentos registrados, apenas um pôde ser considerado parto gemelar, embora não confirmado devido à presença no mesmo recinto de outra fêmea considerada imatura (10 meses).

Todos os outros nascimentos foram de um filhote por parição. Estas observações coincidem com as de Matamoros (1982), de um parto gemelar em 20 nascimentos. No criatório onde se realizou este trabalho, em um período de quatro anos, apenas uma fêmea uma única vez obteve um parto gemelar.

O quadro a seguir apresenta os principais índices reprodutivos encontrados, no qual destacamos os diferentes períodos gestacionais e intervalo entre partos relatados na literatura.

<i>Período de gestação (dias)</i>	<i>Intervalo entre partos (dias)</i>	<i>Crias/fêmeas/ parto (unid.)</i>	<i>Partos/fêmeas/ ano (unid)</i>	<i>Autor (es) / ano</i>
97 a 101	97-268	95,7%=1; 4,3% = 2	50% = 1 31% = 2	Matamoros (1982)
85 a 156	-	-	-	Matamoros e Pashov (1984)
157	-	1,4%= 2 98,6%=1	-	Smythe e Brown de Guanti (1995)
145 a 155	-	1 (média)	2 partos	Rengifo <i>et al.</i> (1996)
150	195 a 251	4,75% = 2 95,3% = 1	40% = 2 60% =1	Nogueira (1997)
116 a 135	-	-	-	Hosken (1999)
96 a 155	137 a 251	100% = 1	2	Brieva (2001)
142 a 154		100% = 1	71,4% = 2 28,6% = 1	Lameira (2002)
135 a 139				Oliveira <i>et al.</i> (2003)
120	208		1,75 média	Mesa (2001)
138 – 173	-	1	2	Scherf (1997)
148 ± 4,8	224,5 ± 52,2	100% = 1	55,6% = 2	Guimarães <i>et al.</i> (2008)

Quadro 1- Diferentes índices reprodutivos de *Cuniculus paca* encontrados por diferentes autores

As diferenças tão marcantes entre os períodos de gestação relatados por diversos pesquisadores podem ser devidas a alguns animais apresentarem implantação retardada, a qual consiste em manter um zigoto em estado de latência, até que as condições do meio sejam propícias e se produza então a implantação para dar início à gestação (BRIEVA, 2001). Ramos (2003) cita o efeito Bruce (reabsorção embrionária em caso de exposição da fêmea a outro macho) em roedores em caso de confirmação de cópula e não ocorrência de gestações.

Com relação à ocorrência do primeiro cio pós-parto, Matamoros (1981) descreveu a presença de folículos III em uma fêmea prestes a parir, o que a fez supor que existe cio pós-

parto. Em seus estudos, Matamoros e Pashov (1984), Nogueira Filho e Nogueira (1999) e Landin Junior (2000) confirmam a existência de um cio pós-parto e um anestro por lactação. Estes últimos autores citam que o cio pós-parto ocorre na paca à semelhança da égua com cerca de cinco a sete dias após o parto e um novo cio só ocorrerá novamente após o desmame. Hosken (1999) relata ocorrências de cio pós-parto, 28 dias após o nascimento da cria. Lameira (2002) observou cio pós-parto em aproximadamente um mês, mesmo desmamando os filhotes após 30 dias, confirmando que a lactação realmente não interfere na ação hormonal do ciclo estral. Ribeiro e Zamora (2008) e Guimarães *et al.* (2008) verificaram cio 15 e $25,6 \pm 8,8$ dias respectivamente.

Pesquisas de dosagens de progesterona revelam que sua concentração sérica pode variar ao longo do ciclo estral de acordo com as espécies estudadas. Guimarães (2000), em seu estudo com cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) encontrou médias das concentrações hormonais de progesterona durante as fases do ciclo estral, correspondentes a: proestro $0,78 \pm 0,39$ ng/mL; estro $2,83 \pm 2,34$ ng/mL; metaestro $1,49 \pm 1,24$ ng/mL; diestro $3,71 \pm 1,48$ ng/mL. Pérez (2001) observou níveis de progesterona e estrógenos durante o ciclo estral de pacas, encontrando para fase folicular: $1,6 \pm 0,65$ ng/mL e 39 ± 24 pg/mL, respectivamente. Na fase luteal os níveis de progesterona foram de $6,2 \pm 3,7$ ng/mL de progesterona e de 29 ± 16 pg/mL de estradiol. Pérez e Baz (2006) em pacas, observaram valores de $1,61 \pm 0,65$ ng/mL para progesterona e 39 ± 24 pg / mL para estrógenos na fase folicular e $6,18 \pm 3,70$ ng/mL e 29 ± 16 pg/mL para progesterona e estrógeno respectivamente na fase luteal.

Pérez e Baz (2006), em estudo da atividade ovárica da paca em cativeiro, encontraram níveis de progesterona em fêmeas no início da gestação, que consideraram alto (20 a 35 ng/mL), comparando com outras espécies da mesma subordem. Os mesmos autores afirmam que o crescimento folicular na paca está destinado a prover tecido intersticial com capacidade progestágena, seja por atresia folicular ou pela formação de corpos lúteos acessórios com o

propósito de criar um ambiente endócrino propício para iniciar e manter um longo período de gestação, e que esta é uma estratégia adaptativa da reprodução que contribui para a formação de crias maduras ao nascimento, com maior possibilidade de sobrevivência em relação a outros roedores.

No mesmo estudo, Pérez e Baz (2006) observaram que mesmo em um ambiente estrogênico (com estruturas foliculares), duas fêmeas de pacas apresentaram níveis de progesterona de 1,33 e 1,13 ng/mL respectivamente e disseram ser estes valores relativamente altos, comparados com outras espécies domésticas (búfalas, vacas, ovelhas e cabras), nas quais assume-se que valores maiores ou iguais a 1ng/mL, indicam atividade luteal. Os achados destes últimos autores, corroboram os de Weyr e Rowlands (1974), os quais mencionam que o ovário de *Agouti paca*, *Dasyprocta agouti*, *Chinchila laninger* e *Hystrix africaeaustralis*, apresentam-se diferentes das espécies domésticas, caracterizados por abundante tecido intersticial, corpos lúteos acessórios e folículos atrésicos todos com capacidade esteroidogênica, cujas capacidades de produção de hormônios esteróides são mais altas que nas outras espécies. Com relação aos níveis de estrogênio, estes autores verificaram uma ampla variação que pode estar correlacionada com a idiosincrasia de cada fêmea e a um crescimento folicular constante que aporta por diferentes vias, quantidades variáveis de estrogênio.

2.4 Colpocitologia Hormonal (Citologia Esfoliativa Vaginal)

A parede vaginal consiste de uma superfície epitelial, de uma camada muscular e de uma serosa, sendo que a camada muscular não é tão bem desenvolvida como as partes externas do útero, consistindo de uma camada circular interna e de uma fina camada longitudinal externa que se estende até o útero. A túnica muscular é suprida por vasos

sanguíneos, feixes nervosos, grupo de células nervosas e tecido conjuntivo denso e frouxo. Existem diferenças interespecíficas nas alterações vaginais durante o ciclo estral que se refletem provavelmente em diferentes níveis de secreção de estrógenos e progesterona e mesmo gonadotrofinas. A superfície das células vaginais é constituída por numerosos microvilos que correm longitudinalmente ou em círculos. Nesse epitélio estratificado e multiviloso, as células são dispostas com microvilosidades opostas, entrosadas umas as outras, para manter a superfície firme. O padrão e a morfologia destes microvilos afetam a firmeza do epitélio, que é totalmente variável com o ciclo reprodutivo (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Este mesmo autor afirma que os esfregaços vaginais não servem para o diagnóstico das fases do ciclo estral ou de disfunções hormonais.

Os diferentes estados hormonais da vida genital se refletem na estrutura histológica da mucosa malpighiana e, portanto, nos esfregaços vaginais. A primeira tentativa de avaliação hormonal por meio de estudos de esfregaços vaginais foi feito por Pouchet em 1847 (POUCHET, 1847 apud GOMPEL; KOSS, 1997) em mulheres. Desde então, uma abundante literatura foi dedicada a este assunto que apesar de seus limites, permite uma avaliação rápida, barata e eficaz da função ovariana na prática médica diária (GOMPEL; KOSS, 1997). O diagnóstico da atividade hormonal por meio de estendidos citológicos e a respectiva identificação das diversas fases do ciclo vaginal normal é hoje assunto que suscita pouquíssimas objeções (CARVALHO, 2002). Desta forma, experiências exitosas em determinar as diversas fases do ciclo estral por colpocitologia foram aplicadas em pacas (MATAMOROS; PASHOV, 1984; PEREIRA *et al.*, 1995; NOGUEIRA, 1997; LAMEIRA, 2002; BASTOS *et al.*, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2008) cutias (GUIMARÃES, 2000) ovelhas (PORTO, 2007) cabras (BORGES, 2008) capivaras (BARBOSA *et al.*, 2007), cadelas (RIBEIRO *et al.*, 2007) lobas guará (BITTENCOURT, 2002), gatas (TONIOLLO *et al.*, 1995) entre outras fêmeas mamíferas.

A citologia esfoliativa da vagina, para determinar estágios do ciclo estral, é uma das técnicas citológicas mais utilizadas na prática veterinária. É fácil e, com alguma experiência, pode ser utilizada com sucesso pelo clínico para otimizar o acasalamento de animais (HENSON, 2003). De acordo com este autor, várias técnicas têm sido descritas para obtenção de células de vagina para exame citológico. A mais comum é a que utiliza um *swab* de algodão, umedecido com solução salina, ou um fino bastão de vidro com extremidade arredondada, o qual é direcionado craniodorsalmente na região caudal da vagina evitando-se o vestíbulo e a fossa do clitóris e tocando-se suavemente o *swab* ou o bastão de vidro no revestimento epitelial. Uma vez colhidas, as células esfoliadas devem ser cuidadosamente colocadas em uma lâmina microscópica para fixação e coloração. O objetivo da fixação é preservar o estado morfológico das células e esta deve ser imediata para evitar a dessecação que deforma as células e altera suas afinidades tintoriais (GOMPEL; KOSS, 1997).

Dependendo do corante utilizado, o método de fixação varia e para corantes do tipo Romanowsky (Wright's, Giemsa e Panótico) que são os mais utilizados na veterinária, as lâminas devem ser secas ao ar e armazenadas em lugar seco até a coloração (GRAÇA, 2007).

De acordo com Henson (2003), corantes do tipo Romanowsky ou Romanowsky modificado, são os mais comumente utilizados, pois fornecem bons detalhes morfológicos para se determinar o grau de maturação das células epiteliais. Também é utilizada a técnica de coloração de Papanicolau (PAPANICOLAU; TRANT, 1941) e tricromo para verificação das fases do ciclo estral. De acordo com Henson (2003), estes corantes propiciam coloração alaranjada distinta aos abundantes precursores de ceratina, presentes nas células superficiais, e a proporção de células alaranjadas ou eosinofílicas em relação as não eosinofílicas, pode ser utilizada para avaliar o grau de maturação das células epiteliais e, conseqüentemente, o estágio do ciclo do estro. De acordo com Gompel e Koss (1997), a coloração de Shorr complementada pela hematoxilina de Harris, para corar os núcleos, dá contrastes mais

marcantes das tonalidades citoplasmáticas das células malpighianas e por isso é a coloração preconizada para a avaliação hormonal.

Os quadros a seguir, (Quadros 2, 3, 4 e 5) ilustrados pelas Figuras 3, 4, 5 e 6 demonstram a descrição morfológica realizada por diversos autores, das principais células encontradas em colpocitologia hormonal de fêmeas de *Cuniculus paca*, *Canis familiaris* e *Homo sapiens*, com avaliação das células da camada mais profunda para a mais superficial do epitélio.

De acordo com Carvalho (2002), na camada mais profunda encontram-se as chamadas células basais profundas cuja habilidade de reprodução é constante e intensa, porém demonstrando pouca ou nenhuma capacidade de esfoliação; em seguida, a camada de células parabasais, que além de exibir variação em tamanho possuem menor atividade de reprodução com maior capacidade de esfoliação. Acima desta, observa-se a camada intermediária, também chamada impropriamente de camada pré cornificada e que se acha localizada entre as camadas parabasais, de alta função reprodutiva e a camada superficial, de atividade exclusivamente esfoliativa. A camada superficial é a camada mais externa, que possui maior habilidade de esfoliação e nenhuma capacidade reprodutiva.

CÉLULAS BASAIS	
Lameira (2002) Estudo em pacas	Coloração basófila, bastante redonda, núcleo central e citoplasma quase inexistente.
Carvalho (2002) Estudo em mulheres	Pequenas, 10 a 16 μ , na maioria das vezes redondas com citoplasma corado em cianofilia. Núcleos quase constantemente no centro da célula e muito grandes em relação ao tamanho celular \pm dois terços da área celular, com conteúdo da cromatina abundante, finamente granular e uniformemente distribuída. Possuem virtualmente a mesma forma do citoplasma, porém ocasionalmente existe certa tendência para a forma ovalada.

Quadro 2- Descrição de células basais encontradas em citologia vaginal de fêmeas de *Cuniculus paca* e *Homo sapiens*.

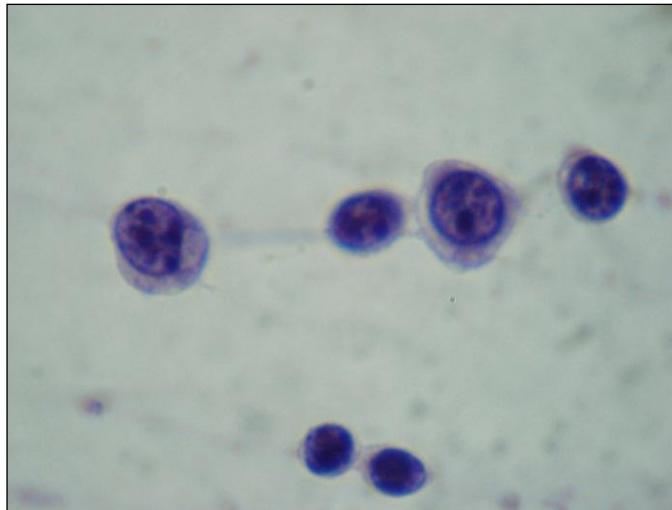


Figura 3- Células basais de *Cuniculus paca*, coloração Papanicolau - aumento de 1000x. (Foto: Vânia Ribeiro, 2009).

CÉLULAS PARABASAIS	
Lameira (2002) Estudo em pacas	Coloração variando entre o azul lilás e roxo (basófila), forma ovalada com núcleo central tendendo à polarização e citoplasma reduzido.
Carvalho (2002) Estudo em mulheres	Nitidamente ovais e medem de 20 a 28 μ em seus maiores diâmetros. O citoplasma ainda é cianófilo, porém mais claro que os das células anteriores. Seus núcleos ainda se conservam centrais, mais algumas vezes são levemente excêntricos e assumem formas ovais. Usualmente ocupam menos da metade da área celular. A cromatina é menos ativa, mais ainda granular e uniformemente distribuída.
Colorado State University Estudo em cadelas (1998)	São as menores células encontradas em um típico esfregaço vaginal. Elas são redondas ou próximas a isso, com um núcleo grande em proporção ao citoplasma.
Nogueira (1997) Estudo em pacas	Formas bem redondas com núcleo ocupando quase todo o citoplasma e basofílicas.

Quadro 3 - Descrição de células parabasais encontradas em citologia vaginal de fêmeas de *Cuniculus paca*, *Canis familiares* e *Homo sapiens*.

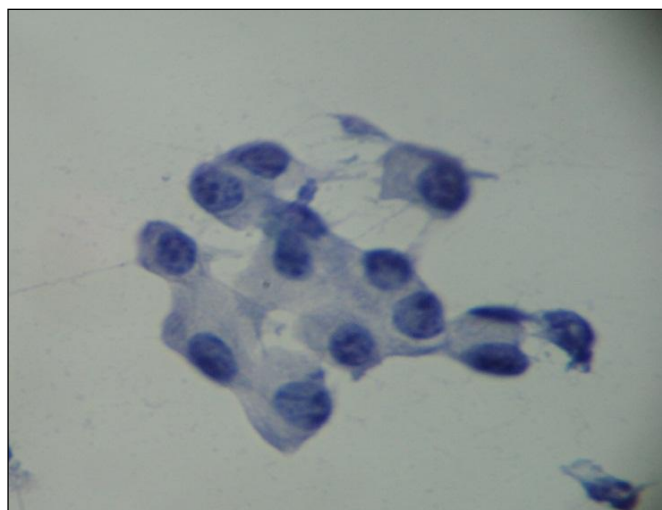


Figura 4- Células parabasais de *Cuniculus paca*, coloração Shorr - aumento de 400x. (Foto: Vânia Ribeiro, 2009).

CÉLULAS INTERMEDIÁRIAS	
Lameira (2002) Estudo em pacas	Forma arredondada, núcleo grande centralizado, citoplasma abundante coloração variando entre o azul lilás e roxo.
Carvalho (2002) Estudo em mulheres	São células grandes, tendência à forma poligonal e o citoplasma se dobra com facilidade o que pode ser verificado devido a sua transparência. Tamanho de aproximadamente 30 a 32 μ em diâmetro, podendo ser maiores, e os núcleos ocupam 1/4 a 1/5 da área celular. Ainda como células intermediárias encontramos as NAVICULARES que podem ser encontradas em esfregaços de gravidez e naqueles que não existe gravidez. Por serem muito vulneráveis a ataque de vários agentes patológicos, é comum observar-se citólise. Na fase pré-ovulatória apresentam as seguintes características: citoplasma bastante aumentado corado muito palidamente em cianofilia embora, leves tonalidades eosinófilas possam aparecer na porção média da célula como uma pálida metacromazia. Outras vezes é acentuadamente eosinófilo variando do amarelo claro ao rosa ou vermelho.
Colorado State University Estudo em cadelas (1998)	Variam em tamanho e forma e possuem o diâmetro 2 ou 3x maior que as parabasais. Muitos citologistas subclassificam estas células em: a) pequenas intermediárias formas arredondadas ou ovaladas com núcleo grande. b) grandes intermediárias forma de poligonal com núcleo pequeno em relação ao citoplasma.
Nogueira (1997) Estudo em pacas	Forma arredondada ou ovalada, com bastante citoplasma, núcleo central e coloração basófila.

Quadro 4- Descrição de células intermediárias encontradas em citologia vaginal de fêmeas de *Cuniculus paca*, *Canis familiares* e *Homo sapiens*.

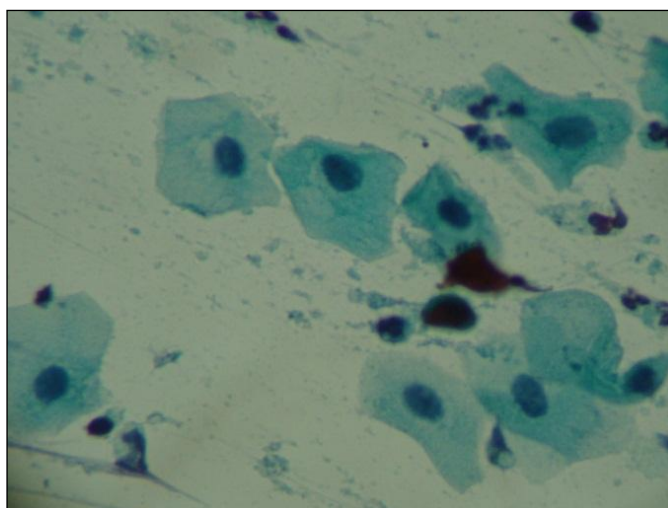


Figura 5- Células intermediárias de *Cuniculus paca*, coloração Shorr - aumento de 400x (Foto: Vânia Ribeiro, 2009).

SUPERFICIAIS	
Lameira (2002) Estudo em pacas	Coloração oscilando entre o vermelho e o alaranjado (acidófila), com forma poligonal podendo ser nucleada, anucleada ou com núcleo em cariólise conforme o grau de queratinização em que se encontra.
Carvalho (2002) Estudo em mulheres	Inteiramente diferentes de todas as precedentes porque são grandes, com acentuada tendência à forma poligonal. O citoplasma de pequena transparência se cora eusinofílicamente, raras as vezes cianófilo mostrando uma variação de tonalidade que vai do vermelho claro ao amarelo púrpura. São achatadas com bordas citoplasmáticas bem delineadas. Tamanho de 32 a 34 μ de diâmetro. O núcleo é inteiramente picnótico sem nenhuma estrutura identificável de cromatina surgindo como um pingo roxo-escuro ou negro.
Colorado State University Estudo em cadelas (1998)	São as maiores células encontradas em um típico esfregaço vaginal. Possuem forma poligonal e são achatadas algumas apresentando-se como enroladas, dobradas. Seus núcleos são ausentes ou picnóticos (pequenos e escuros). Células superficiais sem núcleo são frequentemente referidas com sendo completamente cornificadas. Frequentemente são vistas formando largos cordões.
Nogueira (1997) Estudo em pacas	Foram consideradas células superficiais aquelas poligonais ou achatadas, com núcleo picnótico ou anucleadas e coloração acidófila.

Quadro 5 - Descrição de células superficiais encontradas em citologia vaginal de fêmeas de *Cuniculus paca*, *Canis familiares* e *Homo sapiens*.

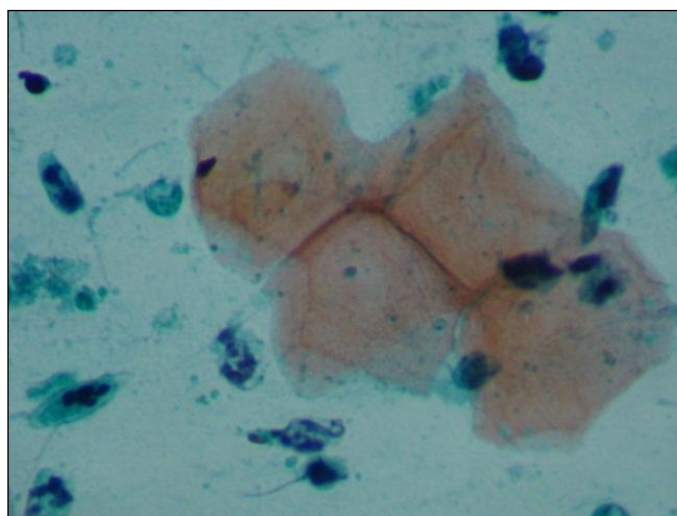


Figura 6- Células superficiais anucleadas de *Cuniculus paca*, coloração Shorr - aumento de 400 x (Foto: Vânia Ribeiro, 2009).

2.5 Manipulação Farmacológica do Ciclo Estral

Com objetivo de viabilizar a IA (Inseminação Artificial), indução de ovulação e a produção de oócitos para realização de fecundações *in vitro* (indução da superovulação), pesquisadores vem propondo protocolos de indução hormonal para espécies silvestres como: diferentes espécies de primatas a exemplo do gorila (*Gorilla gorilla*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*), cervo dama (*Dama dama*) e o cervo nobre (*Cervus elaphus*). Naturalmente embora esses protocolos sejam adaptações de procedimentos realizados em espécies domesticas com características semelhantes, as respostas aos diversos tratamentos podem variar entre as espécies (GUIMARÃES, 2008), conforme observou Aramburo *et al.* (2006) com a paca-dos-andes ou guaca negra.

A indução e/ou sincronização do estro, é a biotécnica reprodutiva que permite manipular o ciclo estral com a utilização de substâncias hormonais (BRAGANÇA, 2007). Segundo Moraes *et al.* (2008), a sincronização deve ser diferenciada da indução de estros, pois por sincronização, entende-se o encurtamento ou prolongamento do ciclo estral por meio da utilização de hormônios ou associações hormonais que induzam a luteólise ou prolonguem a vida útil do corpo lúteo, enquanto que indução de estro, consiste em se induzir o estro pelos mesmos meios utilizados na sincronização, em fêmeas que estejam em anestro e assim, de acordo com estes autores, são processos distintos e aplicáveis em diferentes categorias animais.

A época do cio e da ovulação nos animais domésticos cíclicos é controlada principalmente pela secreção de progesterona do corpo lúteo, presumivelmente através de um efeito retrógrado negativo sobre as secreções de gonadotrofinas. Assim, a regulação do ciclo nos animais domésticos significa realmente o controle da vida útil do corpo lúteo. Portanto, a administração de progesterona ou progestágenos durante a duração de um ciclo, controla a

época da ovulação em cabras, vacas, ovelhas e éguas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em bovinos, de acordo com Bragança (2007), após a supressão do progestágeno a ocorrência de estro e ovulação acontece em cerca de dois a oito dias.

Uma segunda forma de se controlar o corpo lúteo é por meio da administração de agentes luteolíticos (prostaglandinas e seus análogos) que encurtam a vida do mesmo, e o surgimento do estro e da ovulação ocorrem em um período de 48 a 120 horas após aplicação destes agentes. Porém, buscando melhorar a eficiência dos programas de sincronização baseados nos empregos de progesterona e ou prostaglandinas (PGF 2α), o crescimento folicular e a regressão do corpo lúteo são sincronizados pela utilização de estrógenos, GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) e seus agonistas (esteróides e hormônios polipeptídeos), além de gonadotrofinas placentárias como a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e Gonadotrofina Corônica Humana (hCG) (BRAGANÇA, 2007).

2.5.1 Progesterona e / ou progestágenos

Desde os trabalhos iniciais de Cristian e Casida na década de 40 (apud ALBERIO; BUTLER, 2001) demonstrando que injeções diárias de progesterona em vacas durante um período apropriado eram capazes de sincronizar o estro eficazmente, desenvolveram-se alternativas para permitir seu uso na prática (ALBERIO; BUTLER, 2001). O tratamento com progestágenos ou progesterona, permite controlar o momento do aparecimento do estro e da ovulação por meio de um mecanismo de “bloqueio” ou “feedback” negativo sobre as gonadotrofinas, seguido por “desbloqueio” como resposta hipofisária após o fim do tratamento (MORAES *et al.*, 2008). De acordo com Porras e Galina (1992), estes atuam simulando a presença de um corpo lúteo funcional, provocando uma retro alimentação negativa sobre a secreção de gonadotrofinas levando cinco a seis dias para a manifestação do

estro após sua suspensão e que a manifestação de estro em bovinos após o uso de progestágenos, pode ser modificada pela duração do tratamento, o estado nutricional e de ciclicidade da fêmea tratada, sua composição corporal, sua idade, raça e época do ano.

O nome progestágeno é utilizado para substâncias farmacológicas de efeitos similares à progesterona (P4). Quimicamente o Norgestomet (17α acetox- 11β - metil – norpreg-ene-20, dione) resulta da modificação do 19- norprogesterone e tem demonstrado ser um progestágeno altamente ativo biologicamente (KESLER; FAVERO, 1995). Vários métodos de administração de progestágenos estão disponíveis comercialmente e podem ser progestágenos oralmente ativos, pessários, implantes de orelha e dispositivos vaginais (JAINUDEEN, *et al.*, 2004). Os principais progestágenos encontrados comercialmente são: acetato de melengestrol (MGA) administrado oralmente, CIDR-B® e PRID® que são implantes vaginais de P4, e ainda o Crestar® e o Syncro-Mate-B® que são implantes subcutâneos de Norgestomet (MOREIRA, 2002).

O Crestar® consiste em um implante auricular de silicone com 3 mg de Norgestomet e mais uma porção injetável de 3 mg de Norgestomet com 5 mg de valerato de estradiol. Este produto, segundo Kesler e Fávero (1995), com seu implante de silicone promove uma liberação mais homogênea do Norgestomet em comparação ao implante hidrônico do Syncro-Mate -B®, mostrando ainda melhores taxas de prenhez.

Progesterona, natural ou sintética (progestágenos), associada ou não a gonadotrofinas hipofisárias, extra hipofisárias ou prostaglandina, vem sendo utilizada com sucesso na sincronização e indução deaios férteis em cabras (NOGUEIRA *et al.*, 2007; AMORIM *et al.*, 2008), vacas (MELLO; PINTO NETO, 2009) e ovelhas (STELLFLUG *et al.*, 2001; BOSCOS *et al.*, 2002; MONREAL, *et al.*, 2009), em veados (ALLER; FERNANDEZ; SANCHEZ, 2009; ZANETTI *et al.*, 2009), guaca negra (ARAMBURO, 2006).

2.5.1.1 Progestágenos associados a Gonadotrofinas Coriônica Equina (eCG) no controle do ciclo estral

O hormônio eCG (originalmente chamado PMSG – Pregnant Mare Serum Gonadotropin) foi descoberto quando se verificou que o sangue de éguas prenhes produzia maturidade sexual quando injetado em ratos imaturos. A eCG é uma glicoproteína com subunidades α e β similares ao LH e ao FSH, porém com um conteúdo de carboidrato mais elevado, especialmente o ácido siálico. Este parece contribuir para a longa meia vida de diversos dias da eCG. Portanto, uma única injeção de eCG possui efeitos biológicos na glândula alvo por mais de uma semana (HAFEZ; JAINUDEEN; ROSNINA, 2004). Uma vantagem a mais de se utilizar PMSG ou eCG nos protocolos de sincronização, é que este hormônio é administrado no momento da remoção do implante de progestágenos, evitando assim um trabalho a mais de manipulação do animal quando comparado a outros protocolos (MOREIRA, 2002).

Cavalieri, Rubio e Kinder (1997), usaram a aplicação de 400 UI de eCG na retirada dos implantes em vacas e encontraram um incremento no grau de sincronização da ovulação, redução significativa no tempo da ovulação e o aparecimento do pico de LH. Monreal *et al.* (2009), aplicaram 350 UI de eCG, em cabras em anestro estacional no momento da retirada do implante e observaram que todos os animais apresentaram indução com sincronização de cio e obtiveram índices de fertilidade de 67% e prolificidade de 2,3. O PMSG ou eCG estimula o desenvolvimento de folículos ovarianos (HAFEZ; HAFEZ 2004). Armstrong *et al.* (1983) observaram em cabras, uma maior taxa de partos gêmeares com o uso de eCG, a qual foi atribuída ao efeito superovulatório desta gonadotrofina.

De acordo com Santos (2002), é imprescindível para o êxito da hormonioterapia, que vários aspectos e condições devam ser observados antes de optar-se pelo tipo de terapia a ser

utilizada, pois diferentes reações orgânicas ocorrem, dependendo da espécie animal, dentro de uma mesma espécie ou mesmo de acordo com o estágio do ciclo estral ou de gestação. Segundo o mesmo autor, deve-se considerar ainda a dose a ser aplicada, as vias de aplicação, os efeitos colaterais e em última análise os efeitos aparentes.

2.6 Diagnóstico de Gestação ou Prenhez

Neves *et al.* (2008), consideram que o diagnóstico de prenhez, é fundamentalmente uma técnica que permite determinar sua existência e duração e que estes fatores possibilitam a tomada de decisões que podem afetar diretamente os índices de produtividade, constituindo-se em um importante instrumento para avaliação do futuro das fêmeas em reprodução, possibilitando a tomada de providências para a redução do intervalo entre partos, facilitando o manejo ou mesmo descarte de animais, minimizando perdas econômicas como gasto com alimentação, permitindo ainda, uma avaliação imediata da eficiência de programas de indução ou sincronização do estro e de transferência de embriões.

De acordo com Jainudeen *et al.* (2004), os métodos para diagnóstico de gestação em animais domésticos, podem ser divididos em quatro tipos:

a) Não retorno ao cio. Isto ocorre porque, durante a gestação, o concepto inibe a regressão do corpo lúteo (CL) e com isto impede o retorno ao cio. Entretanto, Jainudeen *et al.* (2004,) afirmam que apesar deste ser um método muito utilizado por produtores e Centros de Inseminação Artificial com bovinos e bubalinos, a confiabilidade desse método depende da eficiência na detecção de cio do rebanho. O não retorno ao cio quando se trata de caprinos e ovinos, conforme relata Neves *et al.* (2008), não deve ser considerado como método de diagnóstico de gestação, pois determinadas condições patológicas do útero e do ovário também são causadoras de anestro.

b) Testes imunológicos e hormonais. Baseiam-se na detecção ou mensuração dos níveis de substâncias originadas pelo conceito, no útero ou nos ovários, que penetram no sangue, na urina ou no leite materno. Estas podem ser específicas da gestação, como eCG e EPF (Fator precoce da gestação) e não específica da gestação, mas sofrem alterações durante a gestação, como a progesterona e o sulfato de estrona. Neves *et al.* (2008), afirmam que as concentrações de progesterona quantificadas no leite e no plasma de vacas nos primeiros dias de prenhez, são semelhantes àsquelas encontradas nestas fêmeas em fase de diestro, sendo, portanto, sua utilização para diagnóstico de gestação em vacas limitada a períodos bem específicos. Porém, em cabras e ovelhas, o corpo lúteo formado após a luteinização do folículo secreta elevada quantidade de progesterona, responsável pela manutenção da prenhez caso ocorra a fecundação. Na cabra, a destruição química do corpo lúteo em qualquer fase gestacional provoca o abortamento. Em ovelhas, a placenta uma vez estabelecida, produz progesterona em quantidade suficiente para manter a gestação, tornando-se a principal fonte deste hormônio a partir do 50º dia da gestação. Com relação aos antígenos associados à gestação, estes têm sido reportados em tecidos maternos de várias espécies incluindo ovinos, equinos, bovinos e suínos, sendo detectados em sua maioria durante a metade final da gestação, sendo, portanto de valor limitado para testes de prenhez.

c) Métodos clínicos. Dependem da detecção do conceito-feto, membranas e líquidos fetais observados por palpação retal ou técnicas ultrassônicas. A palpação retal, que consiste em palpar o útero diretamente através da parede retal para detectar possíveis alterações ou mesmo o feto ou membranas fetais, só pode ser realizada em égua, búfala e vaca. A palpação retal em caprinos e ovinos é impossível de ser realizada por razões anatômicas (NEVES *et al.*, 2008). Entretanto em porcas múltíparas, as artérias uterinas médias são rapidamente acessíveis através da parede retal e a detecção do frêmito das mesmas é um teste rápido e simples para detectar prenhez em porcas com mais de 28 dias de gestação (JAINUDEEN *et*

al., 2004). A ultrassonografia em tempo real, entretanto, é o método que reúne o maior número de vantagens, pois é precoce, seguro e eficaz na detecção de prenhez e a aplicação desta técnica a partir da década de 1980, constituiu-se em um dos passos mais importantes para o estudo dos eventos fisiológicos que ocorrem durante o ciclo estral e a gestação em diversas espécies (NEVES, *et al.*, 2008)

O ultrassom ou ecografia fornece uma imagem de um corte corporal, dirigindo ao corpo um feixe estreito de ondas sonoras de alta frequência e registrando a forma pelo qual o som é refletido pelos órgãos e pelas estruturas (NOVELLINE, 2007). De acordo com este mesmo autor, o ecografista utiliza um transdutor manual contendo cristais piezoelétricos, que transformam energia elétrica em ondas sonoras de alta frequência, dirigidas à região de interesse e então refletidas de volta ao transdutor. Nas interfaces entre tecidos de diferente impedância acústica e quando os sons refletidos retornam ao transdutor convertidos em sinais elétricos, são analisados por computador para produzir as imagens ecográficas, vistas em tempo real, onde os tecidos sólidos aparecem como estruturas ecogênicas enquanto as coleções de líquido parecem livres de eco (ecotransparentes ou anecóicos), pois não possuem refletores acústicos internos.

A estimativa da idade gestacional por ultrassonografia é baseada na conhecida relação idade fetal e tamanho, e a mensuração de alguns parâmetros pode ser correlacionada com o crescimento embrionário/fetal (VAROL *et al.*, 2001). A mensuração ultrassônica do diâmetro biparietal é rotineiramente utilizada durante o exame pré-natal em humanos (TORRES, 2008). De acordo com De Bulnes *et al.* (1998) e Abreu (2007), o diâmetro biparietal é um dos melhores e mais fiáveis parâmetros que permite estimar com elevada precisão a idade fetal ($r = 0.95$) em ovelhas e cabras. A circunferência abdominal, a órbita ocular, o coração, comprimento crânio-caudal, diâmetro torácico, comprimento do fêmur, diâmetro dos placentomas e diâmetro do tronco fetal, também foram parâmetros estimados por

ultrassonografia para correlacionar com precisão o crescimento fetal em cabras e ovelhas (DILMEN *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; ABREU *et al.*, 2007; HAIBEL; PERKINS, 1989).

Oliveira *et al.*, (2003) diagnosticaram gestação em pacas a partir do nono dia após a cobertura pela visualização da vesícula embrionária por meio de ultrassom e utilizaram medidas da área da placenta e a área cardíaca do feto durante 129 e 89 dias respectivamente antes do parto, para estimar a idade gestacional nestas fêmeas.

2.7 Marcadores Moleculares

O conhecimento da variabilidade genética tem papel fundamental na compreensão sobre a evolução das espécies e dos processos envolvidos no desenvolvimento normal e patológico. As frequências dos alelos para marcadores genéticos nucleares “clássicos” (grupos sanguíneos e proteínas) são conhecidas em milhares de populações e espécies. Qualquer característica determinada por um gene simples que exhibe variabilidade discreta constitui um polimorfismo, o qual marca um segmento cromossômico. A rigor, considera-se polimórfico o loco no qual o alelo mais freqüente possui freqüência igual ou inferior a 99%. Se genes afetando uma característica quantitativa (QTL) ou qualitativa estiverem em um segmento cromossômico próximo aquele marcador, o monitoramento da segregação do polimorfismo pode permitir uma inferência indireta da presença do QTL e do valor fenotípico a ser esperado para a característica quantitativa em razão da ligação. A certeza dessa inferência dependerá da proximidade do marcador à QTL, que é medida pela freqüência de recombinação. O valor do marcador dependerá da magnitude e da natureza dos efeitos quantitativos (OLIVEIRA; HENKES; BENAVIDES, 2008).

De acordo com Ferreira e Gratapaglia (1995), com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos para a detecção de polimorfismo genético

diretamente ao nível de DNA e inicialmente utilizaram-se as enzimas de restrição o que permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP). Porém, o advento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase - PCR levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares.

Oliveira *et al.*, (2008) descrevem a técnica de PCR como sendo uma reação em cadeia porque o DNA sintetizado em um ciclo inicial passa a ser molde para a síntese posterior de DNA nos ciclos subsequentes. Após cerca de 30 ciclos de síntese os produtos de PCR deverão incluir, além do DNA original, aproximadamente 10^5 cópias da sequência-alvo. Essa quantidade pode ser facilmente visualizada como uma banda discreta de tamanho específico quando submetida à eletroforese em gel de agarose. A reação envolve ciclos sequenciais completos compreendendo três etapas básicas:

- *Desnaturação*: compreende a dissociação das ligações que mantém unida a dupla fita de DNA. Isso é obtido tipicamente pela utilização de temperaturas entre 93 e 95° C.
- *Reanelamento*: ligação das sequências iniciadoras com sequência-alvo. Em geral, esse passo utiliza temperaturas entre 50 e 70°C. Temperaturas de anelamento mais elevadas aumentam a especificidade da reação.
- *Síntese do DNA*: a partir dos iniciadores já ligados a sequência alvo começa a síntese de uma nova sequência complementar. As temperaturas que conferem maior eficiência a essa etapa estão entre 70 e 75°C.

Os marcadores de DNA além de apresentarem maiores níveis de polimorfismos que os protéicos, permitem a obtenção de dados de regiões não transcritas e identificação de mutações silenciosas. Contam ainda com a facilidade de manipulação e a maior estabilidade

do DNA, permitindo comparações biológicas e também marcadores para caracteres de produção (OLIVEIRA; HENKES; BENAVIDES, 2008).

Faleiro (2007) descreve os principais marcadores genético-moleculares e suas principais características:

1- **Isoenzimas** – Grupos de múltiplas formas moleculares de uma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado de mais de um gene codificando cada uma das enzimas. As diferentes isoenzimas são resultantes de variações alélicas de genes codificadores. Como expressão gênica estas são co-dominantes, não é necessário um conhecimento prévio da sequência genética e tem como principais aplicações a diversidade gênica e o “fingerprint”.

2 – **RAPD** – Random Amplified Polymorphic DNA, que são fragmentos de DNA amplificados ao acaso pela PCR, utilizando primers curtos (geralmente 10 nucleotídeos) de sequência aleatória e por isso a sequência alvo é desconhecida. Como expressão gênica são dominantes, não é necessário o conhecimento prévio da sequência genética e tem como principais aplicações: “fingerprint”, diversidade genética e mapeamento genético.

3 – **Microssatélites (SSR / SSLP / STMS)** – São sequências muito curtas (2 a 5 pares de base) repetidas em tandem (lado a lado) cuja detecção é feita pela PCR, utilizando primers específicos. Como expressão gênica, são co-dominantes, necessitam do conhecimento prévio da sequência genética e tem como principais aplicações: mapeamento genético, “fingerprint”, diversidade genética e análise filogenética.

4 – **AFLP / SFLA / SRLA** (Amplified Fragment Length Polymorphism / Selective Fragment Length Amplification / Selective Restriction Fragment Amplification)- São fragmentos de DNA (80 a 500 pares de base) obtidos da digestão do DNA com enzimas de restrição, seguida da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos, via PCR. São dominantes, não precisam do conhecimento prévio da sequência genética e tem como principais aplicações: mapeamento genético, diversidade genética e “fingerprint”.

5 – **Minissatélites / VNTRs** (Variable Number of Tandem Repeats) – são sequências do DNA de 10 a 100 pares de bases repetidas lado a lado. O número de repetições de tais sequências em cada região hipervariável pode chegar a 50. Estas regiões estão distribuídas por todo o genoma, constituindo vários locos diferentes cromossomos. É co-dominante mas pode ser dominante no caso de sonda para vários locos. É necessário o conhecimento prévio da sequência genética e tem como principais aplicações: “fingerprint”, diversidade genética, análise filogenética

6 – **REMAP** (Retrotransposon-Microssatellite Amplifieds – Baseado na detecção de variação em sítios de inserção de retrotransposon, onde fragmentos entre retrotransposon e microssatélites são amplificados via PCR, utilizando um primer baseado nas regiões de terminação conservadas (LTRs – Long Terminal Repeats) e outro baseado em regiões de microssatélites. É Co-dominante e necessita de conhecimento prévio da sequência de DNA e tem como principais aplicações: análise filogenética e mapeamento genético.

7 – **Genômica Funcional** - Marcador molecular de DNA utilizado para identificar mutações e polimorfismos, baseados em informações do sequenciamento do DNA para o desenho de primers e sondas específicas.

8 – **SNP** (Single Nucleotide Polymorphism) – Muito utilizado para análises filogenéticas, identificar mutações e polimorfismos, baseados na posição de um único nucleotídeo, necessitando de informações de sequenciamento de DNA para o desenho de primers ou sondas específicas.

9 – **DAF** (Amplification Fingerprinting) DAMD (Directed Amplification of Minisatellite Region DNA) SPAR (Single Primer Amplification Reaction) - São estratégias para detecção de diferenças genéticas entre organismos por meio da amplificação do DNA Genômico, utilizando-se um único primer de sequência arbitrária. Os marcadores devem ser de expressão gênica dominante.

10 – **ISSR** (Inter Simple Sequence Repeats). São fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificados via PCR usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de sequência de microssatélites.

A tecnologia molecular providencia elevado número de marcadores de DNA que podem ser utilizados para analisar a variabilidade genética das populações bem como a sua estrutura evolutiva. A imigração e o mestiçamento são processos importantes que podem ser identificados por métodos estatísticos baseados em genótipos multilocus, permitindo assinalar/alocar um indivíduo em uma determinada população ou raça. Os diferentes métodos de alocação de um indivíduo em determinada população, baseiam-se no conhecimento dos genótipos multilocus de uma amostra representativa das populações candidatas. A partir destes dados, um indivíduo será alocado, em função do seu próprio genótipo, à população mais semelhante ou mais próxima (BRITO *et al.*, 2006).

2.8 BIBLIOGRAFIA CITADA

- ABREU, D.; ALMEIDA, J.C.; SILVA, S.; AZEVEDO, J.; FONTES, P.; SIMÕES, J. 2007. Estimativa da idade fetal por ultra-sonografia em cabras da raça Serrana. **REDVET- Revista electrónica de Veterinaria**, 8:1-6. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/636/63614239004.pdf>>. Acesso em: 14 de mai. 2010.
- ALBERIO, R. H.; BUTLER, H. Sincronización de los celos de hembras receptoras. In: PALMA, G. A. **Biología de la Reproducción**. Reprobiootec. Mar del Plata, Argentina, p. 61-77, 2001.
- ALHO, C. J. R. Brazilian rodents: their habitats and habits. In: MARES, M., GENOWAYS, H. Pittsburgh: **Mammalian biology in South America** (Special Publication Series), p. 66-143, 1982.
- ALLER, J. F.; FERNANDEZ, O.; SANCHEZ, E. Fixed-timed Artificial Insemination in Red Deer (*Cervus elaphus*) in Argentina. **Animal Reproduction Science**, Argentina, v. 115, Issues 1-4, p. 312-316, out., 2009.
- AMORIM, et al. Sincronização de estro com CIDR reutilizado em cabras lactantes da raça Toggenburg tratadas com somatotropina bovina recombinante (r-bST). Belo Horizonte. In: **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, fev, 2008.
- ARAMBURO, L. E. T. RESTREPO, G.H.; PÉREZ, C.G.; GÓMEZ, J.R. Inducción sincrónica del ciclo estral en la guaca negra (*Agouti taczanowiskii*) em cativeiro. In: **Revista da Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 59, n. 1, jan-jun, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472006000100013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 08 de ago. 2008.
- ARMSTRONG, D.T.; PFITZNER, A.P.; WARNES, G.M.; RALPH, M.M.; SEAMARK, R.F. Endocrines responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. **Journal Reproduction Fertility**, Grã Bretanha v. 64, p. 345 – 347, 1983.
- BARBOSA, L.P.; RODRIGUES, M.V.; NEVES, M.M.; MORAIS, D.B.; MELO, B.E.S.; BALARINI, M.K.; COELHO, C.D.P.; MENDONÇA, C. Caracterização da colpocitologia em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). In: **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p.258-266, 2007.
- BASTOS, L. V.; GUIMARÃES, D.A.; LUZ-RAMO,R.S.; FERREIRA,A.C.; OHASHI, O.M.. Aspectos da citologia vaginal durante o ciclo estral de *Agouti paca* criada em cativeiro. In: **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte v. 27, n. 2, p. 294-295, 2003.
- BERNARDI, N. Nomenclatura zoológica. In: **Fundamentos Práticos da Nomenclatura Zoológica**. 2. ed., São Paulo: UNESP, 1994, 288 p.
- BITTENCOURT, V.L. PAULA, T.A.R.; COSTA, M.E.L.; MALTA, M.C.; BASTOS, J.A.B. Acompanhamento do ciclo reprodutivo de lobo guará adulta através de citologia vaginal. In: VI Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de animais Selvagens. **Anais do VI congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens**, v. 1. p. 82, 2002.

BORGES, G.T.; DIAS, M.J.; SILVA, L.A.F.; OLIVEIRA, C.R.; MOURA, M.I.; GAMBARINI, M.L. Colpocitologia e concentrações séricas de progesterona em cabras nulíparas submetidas ao fotoperíodo artificial. In: **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.759-766, 2008.

BOSCOS, C.M.; SAMARTZI, F.C.; DELLIS, S.; ROGGE, A.; STEFANACKS, A.; KRAMBOVITS, E. Use of Progestagen – gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. *Theriogenology*, v. 58, p. 1.261- 1.272, out., 2002.

BRAGANÇA, J. F. M. **Estratégias hormonais de indução/sincronização de estro em novilhas de corte entre 12 e 14 meses de idade**. 2007. 123 p. Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

BRIEVA, C. B. **Borugos (*Agouti paca* e *Agouti taczanowskii*)**. Boletín del grupo de estudio de animales silvestres. Boletín GEAS, v. 1, n. 2, Jan - Jun 2001.

BRITO, N. V.; ARRANZ, J.J.; BAYÓN, Y.; COLAÇO, J.; SAN PRIMITIVO, F. O método de inclusão, baseado em genótipos multilocus, na alocação de indivíduos de algumas raças bovinas autóctones do norte de Portugal. Lisboa: **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. 2006. Disponível em: <http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf3_2003/545_47_49.pdf>. Acesso em: 12 de nov. 2010.

BULLETIN OF ZOOLOGICAL NOMENCLATURE, v. 63, parte 3, set. 2006.

CARRETA JUNIOR, M. **Avaliação morfofuncional do processo espermatogênico de pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766) Adultas**. 2008. 60 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, MG.

CARVALHO, G. Achados Citológicos nas Diferentes Circunstâncias Obstétricas. In: **Citologia do Trato Genital Feminino**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002, Cap.9., 117-120 p.

CAVALIERI, J.; RUBIO, I.; KINDER, J. E. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrines change in *Bos Taurus indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 801-814, mar., 1997.

CHIARELLO, A. G.; AGUIAR, L.M.S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F.R.; RODRIGUES, F.H.G.; SILVA, V.M.F. Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. In: Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente, Fundação Biodiversitas, vol. II. 2008, 680 – 882 p.

COLLET, S. F. Population characteristics of *Agouti paca* (rodentia) in Colombia. **Publications of the Museum of Michigan State University. Michigan: Biology Series**, v. 5, n. 7, 601 p. 1981.

COLORADO STATE UNIVERSITY. **Classification of vaginal epithelial cells**. 1998. Disponível em: <<http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cels.html>>. Acesso em: 29 de set. 2005.

DE BULNES, A.G., MORENO, J.S.; SEBASTIAN, A.L.. Estimation of fetal development in Manchega dairy ewes by transrectal ultrasonographic measurements. **Small Ruminantes Research**, 27: 243 – 250, 1998.

DEUTSCH, L.; PUGLIA, L. R. **Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 187 p.

DILMEN, G.; KOKTENES, A.; TURHAN, T.O.; TEZ, S. Growth of the fetal lens and orbit. **International Journal Gynecology Obstetrics**, 76: 267-271, 2002.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Archivos. Zootecnia**, Brasília, v. 51, p. 39-52, 2002.

EISENBERG, J. F. Order Rodentia. In: **Mammals of the Neotropics – The Northern Neotropics**. Chicago. The University of Chicago Press, v. 1, p. 395-97, 1989.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1. ed. Planaltina, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Cerrados, 2007, 28-34 p.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 2. ed. Brasília: Cenargen, 1995, 15 -33 p.

FILICORI, M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. **Fertility and Sterility**, v. 71, n. 3, p. 405-414, 1999.

GOMPEL, C.; KOSS, L. G. Citologia do aparelho genital feminino. In: **Citologia Ginecologia e suas Base anatomoclínicas**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1997, cap. 6, 39-48 p.

GONZÁLEZ-STAGNARO, C. Identificación y control de los riesgos reproductivos em ovinos deslanados. In: **Congreso venezolano de producción e industria animal**, 11, 2002, ULA- Trujillo.

GRAÇA, R. F. Citologia para Clínicos: com utilizar esta ferramenta diagnóstica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, supl. 2, 2007, p. 267-269.

GUIMARÃES, D.A. **Aspectos reprodutivos e endócrinos da puberdade, ciclo estral, gestação e cio pós-parto de cutias (Rodentia, Dasyproctidae) criadas em cativeiro**. 2000. 94 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pará, Belém.

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

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.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**, 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, cap. 81, 925-939 p.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. p. 13-29. In: **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo: Manole, 2004, 513 p.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. P. 33-53. In: **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo: Manole, 2004, 513 p.

HENSON, K. L. Sistema reprodutor. In: RASKIN, R. E; MEYER, D. J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003, 353 p.

HAIBEL, G.K.; PERKINS, N.R.; LIDL, G.M. Breed differences in biparietal diameters of second trimester Toggenburg, Nubian, Angora goats fetuses. **Theriogenology**. 32: 827 – 835, 1989.

HOSKEN, M. F. **Criação de pacas**. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1999, 178 p.

HOSKEN, M. F.; SILVEIRA, A. C. **Criação de pacas**. Coleção Animais Silvestres, v. 3, Viçosa-MG: Aprenda Fácil, 2001, 261 p.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução da ovulação, Produção e transferência de Embriões. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed., São Paulo: Manole, 2004, 409-434 p.

KESLER, D. J.; FAVERO, R. J. Estrus synchronization in beef female with Norgestomet and estradiol valerate: Part 1: Mechanism of action. **Agri-Practice**, v. 16, p. 6-11, 1995.

LAMEIRA, G. A. P. **Determinação de alguns parâmetros da biologia reprodutiva e produtiva da paca fêmea (*agouti paca linnaeus*, 1766) criada em cativeiro**. 2002. 49 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Universidade Federal do Pará, Belém.

LANDIN JUNIOR, P. L. **Reprodução em pacas (*Agouti paca*)**. G.E.R.A BRASIL. Grupo de Estudo em Reprodução Animal do Brasil-UNESP - Jaboticabal 19 de abr. 2000. Disponível em: <br.groups.yahoo.com/group/gera>. Acesso em: 22 de mai. 2005.

LEE, Y.; LEE, O.; CHO, J.; SHIN, H.; CHOI, Y.; SHIM, Y.; CHOI, W.; SHIN, H.; LEE, D.; LEE, G.; SHIN, S. Ultrasonic measurement of fetal parameters for estimation of gestational age Korean black goats. **Journal of Veterinary Medical Science**, 67: 497-502, 2005.

MASON, I. L. **The evolution of domesticated animals**. London: Longman, 1984, 452p.

MATAMOROS, Y. Anatomia e Histologia del Sistema Reprodutor del Tepezcuinte (*Cuniculus paca*). **Revista Biología Tropical**, v. 29, n. 1, p. 155-156, 1981.

_____. Notas sobre la biología del tepezcuinte, *Cuniculus paca*, Brisson (Rodentia: Dasyproctidae) em cativeiro. **Brenesia**, v. 19/20, p. 71-82, 1982.

MATAMOROS, Y.; PASCHOV, B. Ciclo estral del tepezcuite (*Cuniculus paca*, Brisson), em cativeiro. **Brenesia**, v. 22, p. 249–260, 1984.

MELLO, N. M.; PINTO NETO, A. A. Sincronização de Estros em Vacas Nelore Utilizando-se Dispositivos de Progesterona de Preparação Artesanal e Comercial. **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia**, UNIPAR, Pará, v. 2, p. 191 -192, 2009.

MESA, J.E.G. **Cria e manejo de boruga (*Agouti paca*) em cativeiro em áreas de colonização consolidada de Caquetá como contribuição al aprovechamiento sostenible de la biodiversidad amazônica. Informe final de proyecto resumen ejecutivo.** C.I. Macagual. CORPOICA (Corporação Colombiana de Investigaçã Agropecuaria. 13p., 2001.

MONDOLFI, E. La Laca o Paca. **Defensa de la Naturaleza**. Caracas, v. 2, n. 5. p. 4-16, 1972.

MORAES, J. C. F., SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D.; FREITAS, V.J.F.; LOPES JÚNIOR, E.S.. Controle do estro e da ovulação em ruminates. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, 33-54 p.

MONREAL, A. C. D.; CARNEIRO, L. O. H. B.; REDONDO, M. V. D. S. Efeito macho associado ao emprego de progesterona intravaginal em ovelhas sob latitude 20°52 ' South. **Agrarian**, v. 2, n. 4, p. 143-152, 2009.

MONTES, R. El tepezcuintle un recurso biológico importante. **Biodiversitas**, México, 63, p. 6-10, 2005.

MOREIRA, J. R.; MACDONALD, D. W. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores na Amazônia. In: VALLADES-PÁDUA, C.; BODMER, R. E; WLLLEN JR., L. **Manejo e Conservação de Vida Silvestre no Brasil**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 1997. 296 p. e 186–213 p.

MOREIRA, R. J. C. **Uso do protocolo Crestar® em diferentes tratamentos utilizando Benzoato de Estradiol, PGF2 ∞ PMSG E GnRH para controle do ciclo etral e ovulação em vacas de corte.** 2002. 48 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

MOREIRA, R. J. C.; PIRES, A.V.; MALUF, D.Z.; MADUREIRA, E.H.; BINELLI, M.; GONÇALVES, J.R.; LIMA, L.G.; SUZIN, I. Uso do protocolo Crestar® em tratamentos utilizando benzoato de estradiol, PGF2 α, PMSG e GnRH, para controle do ciclo estral e ovulação em vacas de corte. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. São Paulo, v. 44. n. 1, p. 56-62, 2007.

NEVES, J. P.; OLIVEIRA, J.F.C.; FREITAS, V.J F.; SIMPLÍCIO, A.A. TEIXEIRA, D.I.A.; ALMEIDA, J.L. Diagnóstico de prenhez em ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J.R. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008, 17-30 p.

NOGUEIRA, D. M.; CARVALHO JÚNIOR, G.M.; LOPES JÚNIOR, E.S.; SOUZA, P.H.F. Efeito da Sincronização do estro com D-Cloprostenol e eCG sobre o desempenho reprodutivo de cabras ½ Boer/Srd exploradas na região semi-árida do nordeste do Brasil. In: **simpósio**

internacional sobre caprinos e ovinos de corte. 3, João Pessoa-PB, de 05 a 10 de novembro de 2007.

NOGUEIRA, D. M.; MONTE, A.P. CARVALHO JÚNIOR, G.M.; SOUZA, P.H.F; LOPES JÚNIOR, E.S. Efeito da dose de eCG sobre a atividade estral de cabras da raça Bôer, exploradas na região semi-árida do nordeste do Brasil. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.** O avanço científico e Tecnológico na Produção Animal. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Zootecnia: UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, 2007. CD-ROM.

NOGUEIRA, T. M. R. **Alguns parâmetros fisiológicos e reprodutivos da paca (*agouti paca*, linnaeus 1766) em cativeiro.** 1997. 118 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista & Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo.

NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. **Criação de Pacas (*Agouti paca*).** Piracicaba: FEALQ, 1999, 60 p.

NOVELLINE, R. A. As técnicas de imagem. In: **Fundamentos da radiologia de Squire.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, 34-36 p.

OLIVEIRA, F. S.; MARTINS, L.L.; PAULONI, A.P.; MACHADO, M.R.F.; TONIOLLO, G.H.; CANOLA, J.C. Descrição Anátomo-Radiográfica do esqueleto axial da cutia (*Dasiproctae azarae*, Lichtenstein,1823). **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 25, n.1, p. 024-027, 2009.

OLIVEIRA, F. S.; MACHADO, M. R. F.; CANOLA, J. C. Real time B-mode ultrasound in pacas pregnancy (*Agouti paca Linnaeus*, 1776). **Brazilian Journal of Veterinary Research and animal Science.** v. 40, p. 73-78, 2003.

OLIVEIRA, F. S.; MACHADO, F.S.; CANOLA, M. R. F.; CAMARGO, M.H. B.. Uniparidade em pacas criadas em cativeiro (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766) *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59:387 – 389, 2007.

OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Ordem Rodentia. In: REIS, et al. **Mamíferos do Brasil.** Virtual Books. Londrina, 2006, 437 p. Disponível em: <<http://biodiverso.blogspot.com/2006/12/publicaes-mamferos-do-brasil.html>>. Acesso em 24 out. 2008.

OLIVEIRA, J. F. C.; HENKES, L. E.; BENAVIDES, M. V. Marcadores moleculares em reprodução animal. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** São Paulo: Roca, 2008, 395 p.

PAPANICOLAU, G. M.; TRANT, H. F. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterius. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 42, p. 193 – 206, 1941.

PEREIRA, M. P.; REIS, A.N.; GUIMARÃES, D.A.A.; VALE, W.G.; OHASHI, O.M. Algumas características do ciclo estral de *Agouti paca* criadas em cativeiro na região

amazônica. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. 11, 1995, Belo Horizonte, 8p.

PÉREZ, E. M. Mammalian species - *Agouti paca*. **The American society of Mammalogists**. n. 404, p. 1-7, 1992.

PÉREZ, R. C. M.; BAZ, E. A. C. Actividad ovárica del tepezcuintle *Agouti paca* (Rodentia: Agoutidae) en cautiverio. **Revista de Biología Tropical**, v. 54, n. 3, p. 903-912, 2006.

PÉREZ, R. M. 2005. Tepezcuintle, un recurso biológico importante. **Biodiversitas**. Misión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, n. 63, p. 6-11. Disponível em: <<http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv63art2.pdf>>. Acesso em: 30 de out. 2009.

_____. **Caracterización de la atividade reproductiva de tepezcuite (*Agouti paca*) bajo crianza controlada**. Informe final do proyecto. Universidade Autónoma de Yucatan Facultad de Medicina Veterinária y Zootecnia, México, 2001, 9 p.

PORRAS, A. A. I.; GALINA, H. C. Utilización de progestagenos para la manipulación del ciclo estral bovino. **Veterinaria Mexico**, v.23, n.1, p.31-36,1992.

PORTO, R. R M.; CAVALCANTE, T.V.; DIAS, F. E. F.; ROCHA, J.M.N.; SOUZA, J.A.T.. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. **Ciência Animal Brasileira**, 8: 521-527. 2007

RAMOS, R. S. L. **Avaliação da resposta ovulatória em cutias (*dasyprocta prymnolopha e dasyprocta leporina*), criadas em cativeiro, após estímulo com gonadotrofinas hipofisárias e extra-hipofisária**. 2003. 93 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pará, Belém.

RENGIFO, M. E.; NAVARRO, D.T.; URRUNAGA, A.B.; VÁSQUEZ, W.F.; ASPAJO, F.V. **Crianza familiar del majaz o paca (*Agouti paca*) em la Amazônia**. Tratado de Cooperacion Amazônica. Secretaria Pro Tempore # 48. Mirigraf S. R. L., Lima, 1996, 45 p.

RIBEIRO, V. M. F.; ZAMORA, L. M. **Pacas e capivaras criação em cativeiro com ambientação natural**. Rio Branco: Bagaço, 2008, 48 p.

ROMÁN, M. T. Crianza a nível familiar de guanta (*Agouti paca Linnaeus*, 1766. Centro Tecnológico de Recursos Amazônicos de la OPIP). Centro de Fátima. Fátima, Puyo – Ecuador, 2001, 19 p.

RUMPF, R., et al. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. In: **Simpósio Nacional de Melhoramento Animal**. 3. Belo Horizonte. Anais FEPMVZ, 2000, 248-253 p.

SANTOS, B. R. C. Hormonioterapia na reprodução. In: **Seminário apresentado na disciplina Endocrinologia da reprodução do Programa de Pós – graduação em Ciências veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, mar, 2002. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/hormonioterapia.pdf>>. Acesso em: 2 de out., 2009.

SANTOS, E. **Entre o gambá e o macaco: vida e costume dos mamíferos do Brasil**. v. 6. Belo Horizonte: Itatiaia, 1984, 287 p.

SCHERF, B. D. **Lista mundial de vigilancia para la diversidad de los animales domésticos**. 2. ed. Roma: FAO, 1997. Disponível em: <www.fao.org/docrep/V8300S/v8300s00.htm>. Acesso em: 19 de jun. 2010.

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.

_____. In: ROBSON, J. G. & REDFORD, K. H. **Microlivestock: little know small animals with a promising economic future**. National academy, Washington, DC, p. 449, 1991.

SMYTHE, N.; DE GUANTI, O. B. **La domesticación y cria de la paca (Agouti paca)**. Guia FAO conservación # 26. Roma: FAO, 1995, 91 p.

STELLFLUG, J. N.; HATFIELD, P.G.; WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; WALKER, J.W. Reproductive performance of ewe lambs from ewes from different selection practices with or without induced estrus. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p. 185–193, maio 2001.

TONIOLLO, G.H.; CURY, S.R.; VICENTE, W.R.R.; CAMACHO, A.A.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. **Brasilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v 32, n.2, p. 125-129, 1995.

TORRES, C.A.. **Estimativa da idade gestacional por ultra-sonografia no primeiro terço da gestação em cabras Saanen**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – Ceará. 54 pp, 2008.

VALE, W. Presente e Futuro das tecnologias da reprodução assistida (art) aplicada aos animais domésticos e silvestres da amazônia. SUDAM. DRN. C&T. GENAMAZ. In: **WORKSHOP: Biodiversidade/conservação e uso de recursos genéticos animais da Amazônia**. Belém. 1999.

VAROL, F.; SALTIK, A.; KAPLAN, P.B.. Evaluation of gestational age based of ultrasound fetal growth measurements. **Yonsei Medical Journal**, 42: 299-303, 2001

WEIR, B.; ROWLANDS, I. W. Reproductive strategies of mammals. **Acta Review Ecology Systemic**, v. 4, p. 139-163, 1974.

ZANETTI, E. S.; POLEGATO, B. F.; DUARTE, J. M. B. Primeiro relato de inseminação artificial em tempo fixo em veado mateiro (*Mazama americana*). In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. 18., Belo Horizonte, 2009. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/eventos/cbra18/Posters.pdf>>. Acesso em: 30 de ago. 2010.

CAPITULO 1

INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE CIOS FÉRTEIS EM PACAS

(Cuniculus paca L.)

Indução e Sincronização deaios férteis em pacas (*Cuniculus paca* L.)

(Artigo submetido à revista Acta Amazônica)

RESUMO

Objetivando verificar o efeito de implantes de progestágenos associados a duas diferentes doses de gonadotrofinas na sincronização e indução deaios férteis em pacas, 18 fêmeas compuseram os grupos G1 e G2 e G3, com seis animais em cada. Nas fêmeas do G1 e G2 foram inseridos 1,5 mg de Norgestomet, que foram retirados após oito dias (D8), e 0,25 UI e 0,50 UI de eCG (Novormon 5000[®]), ministrados em G1 e G2 respectivamente. Vinte e quatro horas antes do D8, as fêmeas receberam 0,5 ml de prostaglandina (Ciosin[®]). O G3 não recebeu tratamento e foi pareado com machos no mesmo dia que G1 e G2, funcionando como controle. As fêmeas do G1 apresentaram estro no 5º, 7º, 10º, 11º (uma paca /dia) e no 14º (duas pacas) dia e as do G2 no 3º (duas pacas), 8º e 11º (três pacas) dia, respectivamente, após retirada do implante. As do G3 entraram em cio um, cinco, sete, oito, nove e 13 dias após o pareamento com os machos. As taxas de prenhez de G1, G2 e G3 foram 100% (6 fêmeas), 66% (4 fêmeas) e 50% (3 fêmeas), respectivamente. As taxas de parição foram de 83,3% para G1 e 100% para G2 e G3. Com relação a filhotes por parto, 100% do G1 e G3 produziram uma cria, enquanto 50% do G2 produziram duas crias. Os protocolos hormonais utilizados foram eficazes na indução e sincronização deaios férteis e melhoraram a eficiência reprodutiva das pacas.

PALAVRAS CHAVE: Roedor silvestre, sincronização de estro, protocolos hormonais, taxa de prenhez, Amazônia.

Synchronization and induction of fertile estrus in paca (*Cuniculus paca*, L).

ABSTRACT

The goal of this work was to verify the efficacy of hormonal treatment for induction and synchronization of fertile estrus in pacas. Eighteen adult females were separated in three Groups (G1, G2 and G3) with six females each. In day zero of estrus cycle G1 and G2 received 1,5 mg Progestagen implants (Norgestomet) inserted by surgery in the animal's dorsal region (subcutaneous skin) and then, one male was put together with two females in isolated cages. G3 (Control Group without hormonal treatment) also received males, in the same way of the precedent groups. On day eighth (D8) after beginning of hormonal treatment implants were removed and the animals received 0,25 UI (G1) and 0,50UI (G2) of eCG (Novormon[®] 5000). Twenty four hours before implants were removed G1 and G2 were given 0,13 mg Prostaglandin (Ciosin[®]). Results show that G1 presented estrus 5th, 7th, 10th, 11th (1 paca/day) and 14th (two pacas) and G2, 3rd (two pacas), 8th (1 paca) and 11th (three pacas) days after D8, respectively. Pregnancy rates for G1, G2 and G3 were 100% (6 animals), 66% (4 animals), 50% (3 animals), respectively. Among the treated animals the pregnancy rates were 83,3%. In G1 and G3 100% of the females produced 1 newborn/pregnancy, while 50% of females of G2 produced 2 newborns/pregnancy. The hormonal protocols used were effective in inducing and synchronizing fertile estrus and on improvement of reproductive efficiency in pacas in captivity.

KEYWORDS: Wild rodent, synchronization of estrus, hormonal protocols, pregnancy rate.

INTRODUÇÃO

A paca (*Cuniculus paca* L.) na América Latina está entre as espécies mais intensamente caçadas, por causa de sua carne e por ser um animal pequeno, de fácil adaptação em cativeiro e pela facilidade de ajustar-se a presença e atenção de seres humanos, muitas vezes é caçado para ser animal de estimação (Montes, 2005). Contudo, estes fatores, associados ao uso irregular do solo e manejo das florestas têm resultado, em algumas regiões, no quase extermínio ou na drástica redução no número de indivíduos dessa espécie. Com sua produção em cativeiro, que já vem sendo realizada em algumas propriedades, cria-se a expectativa de que seja atendida a demanda pela carne de paca e, em consequência, diminua a sua caça ilegal e predatória (Smythe e Brown de Guanti, 1995; Nogueira Filho e Nogueira, 1999). Entretanto, a baixa taxa reprodutiva desta espécie, caracterizada por raramente produzir duas crias por parto e estes nem sempre ocorrerem duas vezes ao ano, pode ser fator desencorajador aos potenciais criadores.

Diversos autores obtiveram resultados bastante similares com relação à duração do ciclo estral da paca, e suas fases, tomando-se por base a dinâmica da população de células epiteliais e presença de leucócitos junto à mucosa vaginal, propiciadas pelas mudanças hormonais (Nogueira, 1997; Lameira, 2002; Bastos *et al.*, 2003, Guimarães *et al.*, 2008). De acordo com Nogueira Filho e Nogueira (1999) e Landim Junior (2000) as pacas se reproduzem durante o ano todo, embora existam registros de concentração durante os meses de julho a agosto no Brasil, segundo esses últimos autores.

Quanto ao período de gestação com certeza este é um parâmetro dos mais controversos entre os autores chegando a uma diferença entre os períodos relatados de até 76 dias Matamoros (1982), por exemplo, cita uma variação de 76 a 101 dias, enquanto Scherf (1997) encontrou variação de 138 a 173 dias.

Para Lameira (2002) a implantação de técnicas de manejo adequadas e a utilização da biotecnologia permitirão a seleção genética que resultará no aumento da eficiência reprodutiva e produtiva deste animal.

Brieva (2001) relata que existe uma grande quantidade de dados sobre a reprodução de pacas, principalmente em cativeiro, que variam de acordo com as condições sobre as quais foram realizadas as investigações e por causa disso, essas informações não podem ser tomadas como um padrão fixo, pois, por serem muito susceptíveis às condições ambientais a que estão submetidas em cativeiro, as pacas apresentam certas variações em alguns parâmetros reprodutivos.

A sincronização do cio é uma biotécnica reprodutiva que permite a concentração da inseminação ou coberturas bem como da parição, em épocas desejáveis (Hafez, 2004). De posse desta técnica, o criador poderá concentrar partições em época mais propícias como, por exemplo, épocas de poucas chuvas quando são menores as ocorrências de pneumonias e de infestações endoparasitárias em animais silvestres em cativeiro e ainda, obter plantéis mais homogêneos, o que lhe facilitará o manejo e a venda de animais.

A regulação farmacológica do ciclo estral nos animais domésticos implica no controle da vida útil do corpo lúteo. Portanto, a administração de progesterona (P4) ou progestágenos controla a época da ovulação em cabras, vacas, ovelhas e éguas (Hafez, 2004). Progesterona, natural ou sintética, associada ou não a gonadotrofinas hipofisárias, extra-hipofisárias ou prostaglandina (PGF_{2α}), vem sendo utilizadas com sucesso na sincronização e indução de cios férteis em cabras (Nogueira *et al.* 2008; Maia Junior *et al.* 2009), vacas (Rocha *et al.* 2007; Mello e Neto, 2009) e ovelhas (Dias *et al.*, 2001; Monreal *et al.* 2009).

O termo progestágeno é utilizado para substâncias farmacológicas de efeitos similares à progesterona (P4). Dentre tantos, o Crestar® consiste em um implante auricular de silicone com 3 mg de Norgestomet e uma porção injetável de 3 mg de Norgestomet com 5 mg de

valerato de estradiol. Quimicamente o Norgestomet (17 α acetoxo-11 β - metil – norpreg-ene-20, dione), resultado da modificação do 19- norprogesterone, tem demonstrado ser um progestágeno ativo biologicamente sendo que o implante de silicone promove uma liberação homogênea de seu princípio ativo aumentando as taxas de prenhez (KESLER *et al.* 1995).

O cio e a ovulação podem ser sincronizados em animais cíclicos pela combinação de progestágenos e um agente luteolítico. Os dois agentes luteolíticos principais são o estrógeno e a PGF_{2 α} , ou seu análogo o cloprostenol (Jainudeen *et al.*, 2004).

Associadas ao uso dos progestágenos e PGF_{2 α} , as gonadotrofinas têm melhorado ainda mais os resultados em termos de prenhez. A gonadotrofina coriônica equina (eCG) estimula o desenvolvimento de folículos ovarianos (Hafez, 2004). Duenhas *et al.* (2002), aplicaram 350UI de eCG, em cabras em anestro estacional no momento da retirada do implante e observaram que todos os animais apresentaram indução com sincronização de cio, índices de fertilidade de 67% e 2,3 crias por parto. Armstrong *et al.* (1983) observaram em cabras, uma maior taxa de partos gemelares com o uso de eCG, a qual foi atribuída ao efeito superovulatório desta gonadotrofina. Este efeito também foi observado por Hafez (2004).

Uma vantagem a mais de se utilizar PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) ou eCG nos protocolos de sincronização, é que o hormônio é administrado no momento da remoção do implante de progestágenos, evitando assim um trabalho a mais de manipulação do animal quando comparado a outros protocolos (Moreira, 2002).

Em *Cuniculus paca* não há relatos na literatura demonstrando serem esses animais responsivos a hormonioterapias utilizadas em protocolos de indução de ovulação e sincronização de cio, nem tão pouco, quais doses poderiam ser eficazes em produzir cios férteis e, até mesmo, se esta prática teria influência em outros parâmetros reprodutivos ou gestacionais. Assim sendo, este trabalho teve como objetivos, testar protocolos hormonais para induzir e sincronizar cios férteis em pacas. Além de quantificar a progesterona endógena

antes da aplicação do progestágeno e no momento da retirada do mesmo, verificar se a fase do ciclo estral por ocasião do implante interfere na manifestação do estro, bem como investigar eventuais influências desses procedimentos na fertilidade, no período de gestação e no peso das crias ao nascer.

METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido no criatório de animais silvestres da Fazenda Experimental Catuaba, da Universidade Federal do Acre, localizada no município de Senador Guiomard, km 30 da rodovia BR - 364 (10°04' S e 67°37' W). O clima é tipo amazônico equatorial quente e úmido com temperaturas variando de 24,5 °C a 32 °C (Köppen 1948; Acre, 2006).

A alimentação dos animais foi constituída de frutas, grãos, tubérculos, hortaliças e complementada com frutos colhidos na mata adjacente ao criatório. Além disso, foi fornecido suplemento mineral (sal mineral base 40P da marca Real H) para bovinos e água “*ad libitum*”.

Foram utilizadas 27 pacas adultas (18 fêmeas não prenhas e nove machos), de comprovada eficiência reprodutiva, dispostas em nove baias, cada uma das quais com duas fêmeas e um macho que formaram os grupos experimentais G1 e G2 (tratamento) e G3 (controle). Cada grupo foi composto por animais de três baias, perfazendo um total de nove animais, sendo seis fêmeas e três machos em cada um.

Nas fêmeas do G1e G2, em dia aleatório do ciclo estral, foram inseridos implantes subcutâneos na região dorsal (Figura 1), com 1,5 mg de Norgestomet (Crestar, Intervet), metade da apresentação comercial, e que foram retirados após oito dias (D8). Vinte quatro horas antes da retirada dos mesmos, foi administrado 0,13 mg de prostaglandina (Ciosin, Coopers), por via intramuscular (i.m.) em todas as fêmeas.

Para colocação dos implantes, cada fêmea foi sedada com 1 ml de acepromazina 1% (Acepran, Univet) i.m., após o que foi feita uma tricotomia de 6 cm x 4 cm na região dorsal,

aproximadamente 4cm em situação paravertebral, assepsia com iodopovidona para, a seguir, fazer-se um bloqueio anestésico subcutâneo com cloridrato de lidocaína 2% (Lidocaína, Bravet) na área depilada seguida de incisão de 3 cm na pele para introdução do implante. A sutura foi feita com fio de algodão 2-0 (Ethicon), tomando-se o cuidado de fixar o implante no tecido subcutâneo e de deixar uma ponta de 3 cm do mesmo fio para fora da ferida, de forma que após cicatrização, esta ponta de fio ficasse exposta para que se pudesse controlar a permanência do implante pelo tempo determinado (Figura 1). Sobre a região da ferida cirúrgica aplicou-se um produto fitoterápico repelente cicatrizante (óleo de copaíba).

No D8, imediatamente após a retirada dos implantes, G1e G2 receberam 25 UI e 50 UI de eCG (Novormon 5000), i.m., respectivamente. O G3 não recebeu nenhum tratamento. O pareamento de fêmeas com machos nos três grupos foi feito no dia do implante do progestágeno (D0).



Figura 1. Inserção subcutânea do Crestar® em *Cuniculus paca* – Foto: Vânia Ribeiro, 2009.

Objetivando determinar a fase do ciclo estral desses animais, bem como a ocorrência de cio e de coberturas, estas evidenciadas pela presença de espermatozóides nos esfregaços (Figura 2), colheram-se amostras de epitélio vaginal por meio de “swabs” para realização de citologia esfoliativa. No G3 esse procedimento foi iniciado no D0 e a partir daí, a cada 48 horas até a confirmação da cobertura, enquanto que no G1 e G2, assim como no G3 estas

observações foram feitas a cada 48 horas até D8 e a partir daí, uma vez por dia até a confirmação da cobertura.

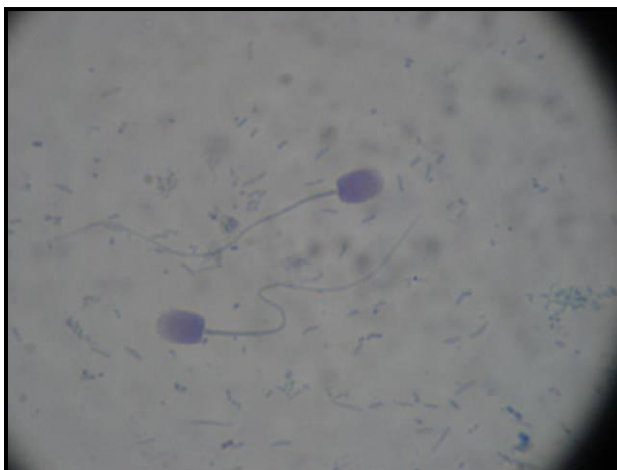


Figura 2. Espermatozoides de *Cuniculus paca*. Foto: Vânia Ribeiro, 2009

Este processo era efetuado após prévia higienização da vulva com uma solução de álcool iodado e pela introdução de “swabs” estéreis umedecidos com soro fisiológico acerca de 6 cm no canal vaginal e levemente rotacionados. O material obtido era analisado quanto à coloração e textura e, em seguida, feito esfregaço em lâmina histológica devidamente identificada com o número do animal e data de coleta e imediatamente imersas em um fixador (álcool 95%), para serem coradas pela técnica de Shorr e examinadas em microscópio óptico (Olympus CH30), com objetivas de 10x e 40x. As fases do ciclo estral foram determinadas, segundo os critérios de Gompel e Koss (1997) e Lameira (2002), pela identificação de tipos celulares como células basais, parabasais, intermediárias e superficiais nucleadas e anucleadas. Em cada lâmina de esfregaço vaginal foram contadas 100 células e estimada suas quantidades em termos percentuais.

Para a dosagem plasmática de progesterona, antes da aplicação do implante e na retirada do mesmo, foram colhidas amostras de cerca de 3 mL de sangue de todas as fêmeas por venopunção da veia cefálica, safena lateral ou safena medial, com scalp descartáveis 21G e seringas de 5 mL contendo EDTA, devidamente identificadas e mantidos refrigerados em caixas térmicas com gelo (por no máximo 3 horas), até que fossem submetidas à

centrifugação feita a 1000 rotações por minuto durante 10 minutos. As amostras de plasma assim obtidas foram acondicionadas em frascos de polipropileno e armazenadas à temperatura de -20°C até a realização das dosagens. As concentrações plasmáticas de progesterona foram determinadas de acordo com a técnica de radioimunoensaio descrita por Knickerbocker *et al.* (1986), modificadas por Carriere e Lee (1994).

Os dados foram analisados através de procedimentos de estatística descritiva e apresentados como Médias e seus respectivos Desvios Padrão e em percentual e foram submetidos ao teste T de student, adotando-se valor de $p > 0,05$. Para isto, utilizou-se os *softwares* Excel 2000 e SAS – Statistic Analysis System (SAS, 2003).

ASPECTOS LEGAIS

Este trabalho foi realizado com autorização do Ministério do Meio Ambiente - MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, sob número 24669-1 (Autorização para atividades com finalidade científica).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as fêmeas entraram em estro tendo ou não recebido tratamento hormonal. As fêmeas do G3 (controle) apresentaram cio 01, 05, 07, 08, 09 e 13 dias após o D0, enquanto que as do G1 entraram em cio 12, 14, 17, 18 e 21 dias (duas pacas) após o D0, ou 5, 7, 10, 11 e 14 dias (duas pacas) após o D8 e as do G2 entraram em cio 10 (duas pacas), 15 e 18 dias (três pacas) após o D0, ou 3 (duas pacas), 8 e 11 dias (três pacas) após o D8.

Verificou-se que o implante com 1,5 mg de Norgestomet foi eficaz em suprimir o estro, suas manifestações e possivelmente a ovulação até que se efetuasse sua retirada. Estes dados condizem com Hafez (2004), quando este afirma que, dentre outras ações na fisiologia da reprodução, a progesterona provoca inibição do cio e do pico pré-ovulatório do LH quando em níveis elevados, desempenha papel fundamental na regulação hormonal do ciclo estral e que progestágenos sintéticos atuam inibindo a secreção hipofisária de LH. Entretanto, diferem

do mesmo autor que diz que após encerrar o tratamento com progestágenos sintéticos em bovinos, os animais mostrarão cio e ovularão 48 a 72 horas após a retirada do implante de progestágeno.

Mendonça *et al.* (2007) concluíram que o acetato de medroxiprogesterona em dose única de 0,75 ou 1,5 mg predispõe a interrupção do ciclo estral em camundongas. Aramburo *et al.* (2006) induzindo o ciclo estral em seis guaguas negras (1/4 de Norgestomet) e considerando o início do ciclo, o dia do início da abertura vaginal, observaram que em três destas a abertura iniciou entre 3 a 5 dias antes mesmo de serem retirados os implantes de Norgestomet. Evans e Robinson (1980), em trabalho com ovelhas, observaram uma correlação negativa entre a dose de eCG utilizada e o tempo para manifestação de estro após o tratamento, com um decréscimo de 14 horas ao utilizar dose maiores. Neste trabalho também se observou que as primeiras fêmeas a entrarem em estro, foram as que receberam 50 UI de eCG.

Ocorreu diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao surgimento do estro após o D0, nos grupos G3 e G1 e G3 e G2, entretanto, esta diferença não foi observada quando se comparou os grupos G2 e G1 ($P < 0,05$). Com relação ao fator ocorrência de estro em dias após a retirada do implante de Norgestomet, G1 e G2, não foram diferentes estatisticamente ($P < 0,05$).

Das seis fêmeas do G3 que entraram em estro, diagnosticou-se cobertura em apenas três. Por outro lado, esta espécie parece ser susceptível ao efeito macho quando se observa um encurtamento das fases do ciclo estral normal e que os estros se concentraram entre o primeiro e décimo terceiro dia de pareamento com o macho. De acordo com Moraes *et al.* (2008), em ovinos ocorre o efeito macho, que consiste na introdução de um carneiro em um lote de ovelhas, e este pode antecipar o início da estação de monta, como também pode fazer uma

sincronização do estro, pelo rápido estímulo para liberação do GNRH-LH. No entanto, é necessário um período prévio de isolamento sexual para obter-se este efeito.

Nogueira Filho e Nogueira (1999) e Brieva (2001), afirmam que pacas em criatórios apresentam cio sincronizado o que pode resultar em várias fêmeas prenhes ao mesmo tempo. No presente trabalho, demonstrou-se sincronismo de estro quando fêmeas comprovadamente férteis foram separadas dos machos e, depois de algum tempo (± 50 dias), voltaram ao convívio dos mesmos, entretanto, em 50% das fêmeas, apesar dos estros observados citologicamente, não ocorreu cobertura pelos machos resultando numa baixa taxa de fecundação e prenhez.

Em relação aos tratamentos hormonais utilizados para induzir o estro e suas manifestações físicas e comportamentais nesta espécie, os resultados obtidos mostraram-se eficientes, pois, das 12 fêmeas que receberam tratamento, todas entraram em estro e 11 (91,66%) delas foram cobertas pelo macho, sendo que no G1 ocorreram 100% de estro com cobertura, e no G2, 83%. Estes dados estão próximos aos de Bicudo e Sousa (2003) em ovelhas que utilizaram um protocolo de indução/sincronização do estro e obtiveram percentuais de ocorrência de estro de 100% e 88,5%.

Neste estudo, no G2 duas pacas merecem observação especial: em uma se observou padrão citológico de estro e não foram encontrados espermatozóides; em outra, apenas um espermatozóide foi encontrado em toda a lâmina. Estas fêmeas entraram em estro concomitantemente às suas companheiras de baia.

Observações feitas ao comportamento destes animais, após a retirada do Crestar, evidenciaram que em duas baias do G2, das 18:00 as 4:0 horas da madrugada, os machos se apresentaram muito inquietos, procuravam cobrir uma e outra fêmea. Pela manhã, ao exame colpocitológico, verificou-se que em uma baia apenas uma fêmea foi coberta não se observando espermatozóide na lâmina da outra fêmea. Em outra baia, foram encontrados

muitos espermatozoides na lâmina de uma fêmea e apenas um em toda lâmina da sua companheira de baia. Assim sendo, é provável que por estarem as duas fêmeas tratadas no período de aceitação do macho e na mesma baia, o macho em um espaço de cerca de 10 horas não seja capaz de cobrir e fecundar duas fêmeas. As pacas são animais de costumes crepusculares e noturnos com período de maior atividade entre as 17 e quatro horas da manhã (Matamoros, 1982; Rengifo *et al.* 1996). Nogueira, (1997) e Aramburo (2006), constataram uma só monta, cópula rápida e sangramento em uma fêmea coberta pelo macho. Nogueira *et al.* (2006), verificaram que um macho chegou a copular três vezes com a mesma fêmea. Em outra observação, verificaram apenas uma cópula. O pênis do macho é espiculado e isto provoca hemorragias por ocasião do coito (Hosken e Silveira, 2001), o que provavelmente faz com que uma fêmea uma vez coberta, não permita outra cópula.

Na natureza, as pacas possuem hábitos diferentes dos que lhe são impostos em um criatório. Emmons e Feer (1990), afirmam que as pacas são monogâmicas, dividem pequenos territórios, mas forrageiam sozinhas. De acordo com Smythe (1991), os pares residem em uma área (um a três hectares) que defendem juntos, algumas vezes morando na mesma toca ou não. Neste criatório, rotineiramente, um macho e três fêmeas permanecem em baias de 12 m x 4 m, mas nunca se observou mais de uma cobertura durante o dia ou em uma mesma noite dentro da mesma baia.

As concentrações médias de progesterona nas diversas fases do ciclo observadas por ocasião do implante de progestágeno foram de 1,69 ng/mL \pm 1,26 no proestro, 0,31 ng/mL no estro, 1,62 \pm 1,39 ng/mL no metaestro e 0,88 ng/mL \pm 0,70 no diestro. Cabrera e Montes (1999) mencionam que os níveis basais de P4 na paca variam entre 0,18 e 1,11 ng/mL de plasma sanguíneo e os máximos entre 1,79 e 77,27 ng/mL. Guimarães *et al.* (1999), encontraram valores de progesterona para esta espécie que variaram na fase de estro entre 1,73 e 1,8 ng/mL, de 0,53 a 4,03 ng/mL na fase de metaestro, 1,5 e 16,8 ng/mL na fase de

diestro e 0,45 a 3,23 ng/mL na fase de proestro. Pérez e Baz (2006) observaram valores de $1,61 \pm 0,65$ ng/mL para progesterona na fase folicular e $6,18 \pm 3,70$ ng/mL para progesterona na fase luteal. Os valores encontrados neste experimento, estão próximos aos observados por Guimarães *et al.* (1999) e Pérez e Baz (2006) no que diz respeito as fases foliculares encontradas, entretanto, diferem nos valores de metaestro e diestro. Estas diferenças provavelmente ocorreram devido a diferenças dos calibradores dos diferentes “kits” comerciais utilizados pelos diferentes autores ou ainda pelo fato de que, diferentemente da metodologia utilizada pelos demais, no presente estudo não foi feita a quantificação seriada da P4 ao longo do ciclo estral e, portanto, estes resultados refletiram um momento estanque do ciclo. Pesquisas de dosagens de progesterona revelam que sua concentração sérica podeter ampla variação ao longo das fases do ciclo estral nesta espécie e correlatas (Guimarães, 1999; Guimarães, 2000; Pérez; Baz, 2006).

O valor médio da progesterona encontrada à retirada do implante de progestágeno foi de $1,35 \pm 0,78$ ng/mL, com o máximo de 2,87 ng/mL e o mínimo de 0,31 ng/mL. Em bovinos, Mauer *et al.*(1975) mostraram que dispositivos intravaginais impregnados com progesterona, aumentam os níveis sanguíneos de P4 de <1 ng/mL para 6 ng/mL, dentro de 90 minutos após sua inserção e declina para 1 a 3 ng/mL após 14 dias de inserção. Os resultados do presente trabalho estão próximos aos encontrados por Custer *et al.* (1994), que utilizaram dispositivo interno de liberação de progesterona (PRID), impregnado com 1,55 g de progesterona por oito dias em vacas e observaram que as concentrações séricas de P4 aumentaram cerca de 25% em 24 horas após a aplicação do dispositivo e que declinaram progressivamente para concentrações de fase subluteal (< 2 ng/mL) até a remoção do mesmo; enquanto que Sirois e Fortune (1990) obtiveram valores de 1 a 2 ng/ mL de P4 após cerca de nove dias de inserção de dispositivo vaginal contendo progesterona (CIDR,Controlled InternalDrug Release Devices) em novilhas.

De acordo com Mauer *et al.* (1975) o tempo para os animais demonstrarem estro, está correlacionado com o nível de progesterona plasmática por ocasião da remoção do implante do progestágeno. O autor ainda afirma que em vacas, quando o nível de progesterona circulante foi relativamente alto (acima de 3 ng/mL no plasma) ao fim do tratamento, o intervalo entre a remoção do PRID (dispositivo interno de liberação de progesterona) e o início do estro foi maior e mais variável (70 ± 30 horas). Se a dosagem de progesterona foi baixa ou próxima ao limiar (aproximadamente 1 ng/mL), alguns animais podem entrar em estro durante o tratamento ou outros podem entrar em estro nas primeiras 24 horas após a remoção do PRID (média de 30 ± 7 horas). Os resultados encontrados neste trabalho diferem dos observados por Mauer *et al.* (1975) em vacas, uma vez que nem sempre os maiores valores encontrados à retirada do implante de Norgestomet, foram os que proporcionaram maior intervalo entre a remoção do mesmo e manifestação de estro e vice-versa.

A fase do ciclo estral em que a fêmea se encontrava no momento da aplicação do implante parece não ter influenciado na manifestação do estro. No G1, três fêmeas se encontravam em metaestro e três em proestro. As que se encontravam em metaestro apresentaram estro no quinto dia (uma fêmea) e no 14º dia (duas fêmeas) depois da retirada do Crestar. Nas outras três fêmeas que se encontravam em proestro, o estro se manifestou sete, 10 e 11 dias após a retirada do implante. No G2, uma fêmea estava em metaestro, três em diestro, uma em estro e uma em proestro. A que se encontrava em metaestro entrou em estro 11 dias após a retirada do Crestar, as que estavam em diestro entraram em estro três dias (duas fêmeas) e oito dias (uma fêmea) pós retirada e as que estavam em estro e proestro, 11 dias após.

Asher *et al.* (1995) sincronizando cio em *Cervus elaphus* (veado), observou ser o corpo lúteo desta espécie refratário a análogos de $\text{PGF}_{2\alpha}$, se esta for administrada no 4º dia do ciclo estral desta espécie. Acritopoulou e Haresign (1980) e Rubianes *et al.* (2003) demonstraram

em experimentos que algumas ovelhas tratadas com PGF2 durante os primeiros dias do ciclo estral não responderam ao tratamento. Neste experimento não foi possível avaliar se em *Cuniculus paca* o corpo lúteo possui refratariedade em alguma fase de seu desenvolvimento, entretanto há que se considerar que as duas fêmeas que responderam mais rapidamente à indução do estro estavam em diestro, fase em que o corpo lúteo encontra-se completamente formado.

Ribeiro *et al.*(2007) avaliando as características da citologia vaginal em cadelas, influenciadas pela indução hormonal exógena, concluíram que houve indução de proestro em todos os animais, porém, com intensidades diferentes de progressão para cada fêmea estudada. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente estudo, onde estruturas como células intermediárias com pigmentos de nucleoproteínas, bem como células intermediárias do tipo pré ovulatórias, eram frequentemente encontradas próximo à manifestação do estro (Figuras 3 e 4).

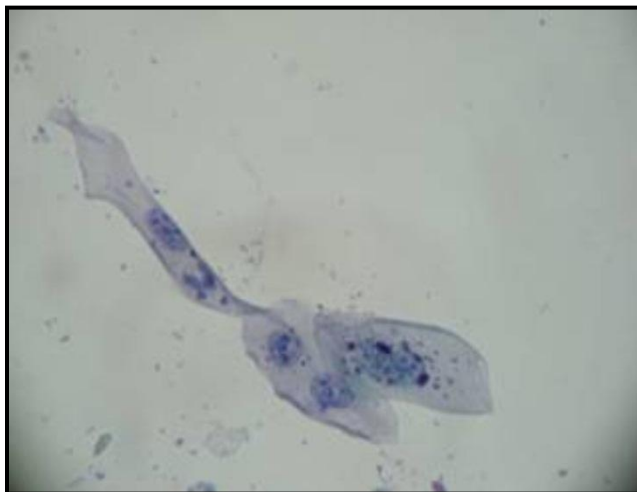


Figura 3. Células intermediárias com pigmentos de nucleoproteínas de *Cuniculus paca*. Col. Harris – Shorr. 400x. Foto: Vânia Ribeiro, 2009.

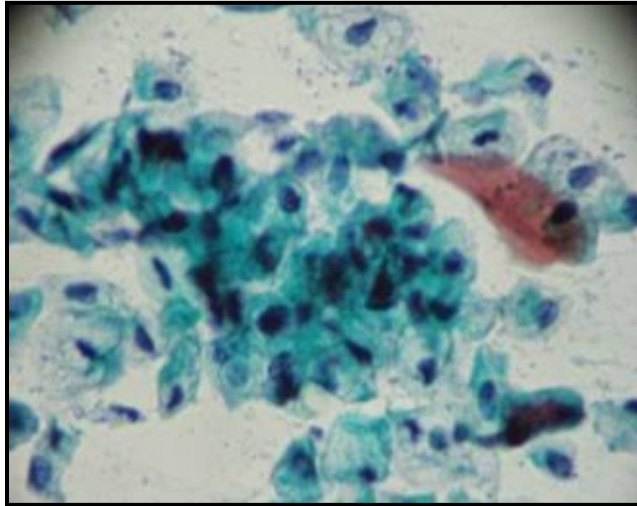


Figura 4. Células pré-ovulatórias de *Cuniculus paca*. Col. Harris - Shorr. 400x. Foto: Vânia Ribeiro, 2009.

De acordo com Carvalho (2002), grânulos de nucleoproteínas com a mesma ou de composição semelhante à de núcleos normais, poderão ser observados no citoplasma de células superficiais normais e em poucas células intermediárias durante o tempo da ovulação. Em casos de hiperestrogenismo eles também poderão estar presentes, o que parece favorecer a hipótese de uma influência estrogênica na sua formação. Para o mesmo autor, antes do evento da ovulação em mulheres, é possível identificar as chamadas células pré-ovulatórias que são originalmente intermediárias, com citoplasma bastante aumentado e corado muito palidamente em cianofilia e algumas vezes, leves tonalidades eosinofílicas que podem aparecer na porção média da célula como uma pálida metacromasia, sendo seu núcleo nestes casos picnóticos e são vistas em grandes ou pequenos grupos.

Pérez-Martnezba *et al.* (1999) estudando a influência da progesterona e estrógenos sobre a dinâmica de células esfoliativas vaginais (EVC) em cabras adultas, observaram que antes do tratamento com acetato de melengestrol (MGA), os animais apresentaram diferentes tipos de células vaginais e com a administração de progesterona houve um predomínio de células parabasais. Estes autores concluíram, portanto, que EVC são altamente indicativas dos efeitos da progesterona e podem ser usadas como uma ferramenta para detectar a resposta aos

tratamentos hormonais em caprinos. Estes resultados concordam plenamente com os encontrados neste trabalho.

Os exames ultrassonográficos e colpocitológicos realizados sessenta e noventa dias após a manifestação de estro com cobertura revelaram seis (100%), quatro (66%) e três (50%) de fêmeas prenhes e de taxa de prenhez para o grupo G1, G2 e G3 respectivamente. Ao se considerar todos os animais tratados a taxa de prenhez foi de 83,3%. Há que se observar que no G2, apesar de todas as fêmeas apresentarem estro, uma fêmea não foi coberta e outra apresentou poucos espermatozoides na lâmina por ocasião do exame colpocitológico que detectava o cio com cobertura. Entretanto, estes dados mostram-se superiores aos de Dias *et al.* (2001), Fonseca *et al.* (2008), Carrijo Junior e Langer (2006) sincronizando e induzindo estro em ovelhas, cabras e vacas respectivamente.

Com relação à capacidade das fêmeas em levarem a gestação a termo, das seis fêmeas do G1, cinco pariram, pois uma delas abortou após completar 90 dias de prenhez. Este aborto provavelmente foi ocasionado pelo manejo da fêmea que sempre se mostrou agressiva e irritadiça com seus pares de baía e com os tratadores. No G2, todas as quatro fêmeas que foram cobertas pariram, sendo que, em duas delas ocorreu parto gemelar (Figura 5), resultando em seis crias, o que evidencia um acréscimo de 50% no número de produtos por parto, contrariando Matamoros (1982); Nogueira, *et al.* (2006) e Oliveira *et al.* (2007) que ressaltam a característica reprodutiva de uniparidade, com a tendência de nascimento de apenas um filhote por parto, nessa espécie. Todas as três fêmeas do grupo controle (G3) que foram cobertas, levaram a gestação a termo.



Figura 5. Paca com gêmeos, nascidos após sincronização e indução de cio (progestágeno + $\text{PGF}_2\alpha$ + eCG).
Foto. Vânia ribeiro, 2010.

A média, bem como o desvio padrão para o período de gestação das têmeas que compuseram os grupos G1, G2 e G3 foram de $154 (\pm 3,4)$, $156,75 (\pm 2,0)$ e $152,33 (\pm 0,47)$ dias, respectivamente. Estes achados são superiores aos de Matamoros (1982) 97 a 101 dias, Hosken (1999) 116 a 135 dias; Mesa (2001), 120 dias; Oliveira *et al.* (2003), 135 a 139 dias, e são similares aos de Smythe & Brown de Guanti (1995), 157 dias; Rengifo *et al.* (1996), 145 a 155 dias; Nogueira, (1997), 150 dias; Lameira (2002), 142 a 154 dias; Guimarães *et al.* (2008), $148,6 + 4,8$, e concordam parcialmente com Scherf (1997) 138 a 173 dias. Nenhum destes autores acima citados fez uso de tratamento hormonal para indução e sincronização de cio.

Com relação ao peso das crias ao nascer, estes foram de $860 (\pm 134)$, $716,67 (\pm 55)$ e $883,3 (\pm 23,5)$ gramas para G1, G2 e G3 respectivamente. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) para o peso das crias nascidas após o tratamento hormonal (25 e 50 UI eCG), mas esta diferença foi significativa entre estas e aquelas que nasceram sem que suas mães recebessem este tratamento (G3 e G1, G3 e G2). Este fato pode ser explicado pela ocorrência de partos gemelares de fêmeas que receberam tratamento hormonal o que resultou em crias com pesos menores. Estes resultados, entretanto, foram similares aos observados por Guimarães *et al.* (2008), que obtiveram médias de peso ao nascer para fêmeas e machos de $605,9 \pm 87,5$ g e $736,7 \pm 108,4$ e aos obtidos por Ribeiro e Zamora (2008) e Oliveira *et*

al.(2007) com 787 g e $741,14 \pm 51,23$ g, respectivamente, e superiores aos de Hosken (2001), 500 a 650 g e Santos *et al.*(2005), 615 e 617 g para machos e fêmeas, respectivamente.

Por ser esta a primeira vez em que se utilizou hormônios para a indução e sincronização deaios férteis em *Cuniculus paca*, observações acuradas foram feitas nas duas fêmeas tratadas (G2) em que o estro ocorreu, mas não se deu cobertura apropriada e prenhez. Assim sendo, foram realizados acompanhamentos ecográficos e após 70 dias da observação do cio induzido constataram-se duas prenhez de aproximadamente 40 dias, o que demonstrou a não interferência dos hormônios no ciclo estral natural desta espécie.

CONCLUSÕES

1- O progestágeno utilizado na forma de implantes subcutâneos foi eficiente na mimetização da fase luteal do ciclo estral, suprimindo a manifestação de estro durante o período de tempo em que permaneceram no animal.

2- O protocolo de tratamento hormonal para indução e sincronização de cio favoreceu a ocorrência deaios férteis e de suas manifestações físicas e comportamentais.

3- A dose de 50 UI de eCG, supostamente, favoreceu a ocorrência de partos gemelares.

4- A sincronização de cio provocada pelo efeito macho resultou em taxas de fecundação e fertilidade menores do que aquelas induzidas pelos protocolos hormonais.

5- Os ciclos estrais subseqüentes ao período experimental de tratamentos hormonais foram normais, como também o estado de hígidez dos animais não foi afetado.

6- A fase do ciclo estral ao início do protocolo hormonal, não interferiu nos resultados de sincronização do cio.

7- Mais estudos fazem-se necessários para estabelecimento de protocolos hormonais mais efetivos.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Acre. Governo do Estado do Acre, 2006. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico-Econômico do Estado do Acre. *Zoneamento Ecológico-Econômico do Acre Fase II: documento síntese –Escala 1:250.000*. SEMA. Rio Branco, Acre. 356pp.

Acritopoulou, S.; Haresign, W. 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF₂ given at different stages of the oestrous cycle. *Journal Reproduction and Fertility*, 58: 219–223.

Aramburo, L. E. T. Restrepo, G.H.; Pérez, C.G.; Gómez, J.R. 2006. Inducción sincronica del ciclo estral en la guaca negra (*Agouti taczanowiskii*) em cativoiro. *Revista da Facultad Nacional de Agronomia*, 3: 3281 - 3293.

Armstrong, D.T.; Pfitzner, A.P.; Warnes, G.M.; Ralph, M.M.; Seamark, R.F. 1983. Endocrines responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *Journal Reproduction Fertility*, 64: 345 – 347.

Asher, G.W; Fisher, M.W.; Berg, D.K.; Veldhuizen, F.A.; Morrow, C.J. 1995. Luteolytic potency of a prostaglandin analogue at different stages of the oestrous cycle in red deer (*Cervus elaphus*) hinds. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103: 307 – 314.

Bastos, L. V.; Guimarães, D.A.; Luz-Ramos, R.S.; Ferreira, A.C.S; Ohashi, O.M. 2003. Aspectos da citologia vaginal durante o ciclo estral de *Agouti paca* criada em cativoiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27: 294 - 295.

Bicudo, S.D.; Souza, D.B. 2003. Associações de progestágenos, prostaglandinas e eCG, em protocolos de curta duração para indução/ sincronização do estro em ovelhas suffolk In: *Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Porto Seguro –Bahia

Brieva, C. 2001. Borugos. Boletín del grupo de estudio de animais silvestres. *Boletín GEAS*, v. 1, n. 2.

Cabrera, B. A.; Montes, R. P. 1999. Estudio de la actividad ovárica de tepezcuintles (*Agouti paca*) mediante los niveles de progesterona sanguínea y estradiol plasmáticos. *XVI Congreso de la Asociación de Zoológicos, Criaderos y Acuarios de la República Mexicana*. Guadalajara, Jalisco, México.

Carriere, P.D.; Lee B. 1994. Direct radioimmunoassay of progesterone in bovine plasma using danazol (17-alpha-2,4-pregnadien-20-yne(2,3-d)isoxazol-17-ol) as a displacing agent. *Journal Veterinary Researche*. v 58: 230 - 233.

Carijo Junior, O. A; Langer, J. 2006. Avaliação de protocolo de inseminação artificial em tempo fixo utilizando eCG em vacas nelore puras e paridas. *Revista Eletrônica de Veterinaria*. (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020206/020616.pdf>). Acesso em: 26 / 10 / 2009.

Carvalho, G. 2002. Achados Citológicos nas Diferentes Circunstâncias Obstétricas, p.117-120. In: Carvalho, G.(Ed.). *Citologia do Trato Genital Feminino*. 4ª Edição. Atheneu, São Paulo.

Custer, E. E.; Beal, W.E.; Wilson, S.J.; Meadows, A.W.; Berardinelli, J.G.; Adair, R. . 1994. Effect of Melengestrol Acetate (MGA) or Progesterone-Releasing Intravaginal Device (PRID) on Follicular Development, Concentrations of Estradiol- 17P and Progesterone, and Luteinizing Hormone Release During an Artificially Lengthened Bovine Estrous Cycle. *Journal of Animal Science*. 72: 1282 - 1289. (<http://jas.fass.org>.) Acesso em 12 /11 /2008.

Dias, F. E.F. Lopes Junior, E.S.; Villaroel, A.B.S.; Rondina, D.; Lima-verde, J.B. Paula, N.R.O.; Freitas V.J. F. 2001. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53: 618 – 623.

Duenhas, M.A.C. Toniollo, H.G; Zorzatto, J.R.; Bicudo, S.D. 2002. Cabras sincronizadas com CIDR em la latitud de 20° 28'S. *Archivos de Zootecnia*. 51: 453-456.

- Emmons, L.H.; Feer, F. 1990. *Neotropical rainforest mammals: A field guide*. Chicago: University of Chicago Press, 281 pp.
- Evans, G. E.; Robinson, T. J. 1980. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *Journal of Agricultural Science*, 94: 69 – 88.
- Fonseca, J. F.; Torres, C.A.; Santos, A.D.; Maffili, V.V. Amorim, L.S. Moraes, E.A. 2008. Progesterone and behavioral features when estrous is induced in Alpine goats. *Animal Reproduction Science*, 103: 366 - 373.
- Gompel, C.; Koss, L. 1997. Citologia do Aparelho Genital Feminino p.39-48. In: Gompel, C.; Koss, L. (Eds.). *Citologia Ginecologia e suas Base Anatomoclínicas*. Manole, São Paulo.
- Guimarães, D.A.; Lameira, A. P.; Ohashi, O. M. 1999. Perfil hormonal de progesterona no ciclo estral da *Agoutipaca* -estudo preliminar. *Anais IV Congresso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre en Amazonia y Latinoamérica*. Asunción, Paraguay: 117-118.
- Guimarães, D. A. 2000. *Aspectos reprodutivos e endócrinos da puberdade, ciclo estral, gestação e cio pós-parto de cutias (Rodentia, Dasyproctidae) criadas em Cativeiro*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Pará: Universidade Federal do Pará. 94 pp.
- Guimarães, D. A.; Bastos, L.V.; Ferreira, A.C.S.; Luz-Ramos, R.S. Ohashi, M.O.; Ribeiro, H.L. 2008. Características reprodutivas da paca fêmea (*Agouti paca*) criada em cativeiro. *Acta Amazônica*, 38: 531 -537.
- Hafez, E.S.E. 2004. Anatomia funcional da reprodução feminina. p.13-29: In: Hafez, E. S. E. (Ed). *Reprodução Animal*. Manole, São Paulo.
- Hosken, F. M.; Silveira, A. C. 2001. *Criação de pacas*. Coleção Animais Silvestres. v.3. Aprenda Fácil, Viçosa, 206 pp.
- Hosken, F. M. 1999. *Criação de pacas*. Cuiabá: SEBRAE/MT. 178 pp.

- Jainudeen, M.R.; Wahid, H.; Hafez, E. S.E. 2004. Indução da ovulação, Produção e transferência de Embriões, p.409-434. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. (Eds.) *Reprodução Animal*. Manole, São Paulo.
- Kesler, D.J.; Favero, R.J.; Troxel, T.R.A. 1995. Comparasion of hidron and silicone implants in the bovine Norgestomet and estradiol valerate estrus synchronization procedures. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21: 475-485.
- Knickerbocker, J.J, Thatcher, W.W, Bazer, F.W.; Drost M, Barron, D.H., Ficher K.B, Roberts R.M. 1986. Protein secreted by Day 16 to 18 bovine conceptuses extends corpus luteum function in cows. *Journal Animal Science*, 77:381-391.
- Lameira, G. A. P. 2002. *Determinação de alguns parâmetros da biologia reprodutiva e produtiva da paca fêmea (Agouti paca Linnaeus, 1766) criada em cativeiro*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. Belém. 49 pp.
- Landim Junior, P. L. *Reprodução em pacas (Agouti paca)*. G.E.R.A BRASIL.(Grupo de Estudo em Reprodução Animal do Brasil- UNESP - Jaboticabal 19 /04 /00). (br.groups.yahoo.com/group/gera) Acesso em: 22 / 05 / 2005.
- Maia Junior, A.; Araujo, A. A.; Salles, M, G. F. 2009. Indução e sincronização do estro e da ovulação em cabras leiteiras saanen com uso de dispositivos vaginais associados ou não à eCG ou efeito macho. *Acta Veterinária Basílica*, 3: 157-162.
- Matamoros, Y. 1982. Notas sobre la biologia del tepezcuinte, *Cuniculus paca*, Brisson (Rodentia: Dasyproctidae) em cativerio. *Brenesia*, 19: 71-82.
- Mauer, R.E.; Webel, S.K.; Brown, M.D. 1975. Ovulation control in cattle with progesterone intravaginal device (PRID) and gonadotrophin releasing hormone (GnRH). *Annales Biology Animal Biophys*, 15: 291-296.

- Mello, N. M.; Pinto Neto, A. A. 2009. Sincronização de estros em vacas nelore utilizando-se dispositivos de progesterona de preparação artesanal e comercial. *Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia*, 2: 191 - 192.
- Mendonça, F. S.; Evêncio-Neto, J.; Simões, M.J.; Camargo, L.M.; Baratella-Evêncio, L. 2007. Aspectos citopatológicos da mucosa vaginal de camundongas tratadas com progesterona. *Ciência Animal Brasileira*, 8: 313-318.
- Mesa, J.E.G. 2001. Cria e manejo de boruga (*Agouti paca*) em cativeiro em áreas de colonização consolidada de Caquetá como contribuição al aprovechamiento sostenible de la biodiversidad amazônica. *Informe final de proyecto resumen ejecutivo*. C.I. Macagual. CORPOICA (Corporação Colombiana de Investigación Agropecuária). 13 pp.
- Montes, R. C. 2005. El tepezcuintle, un recurso biológico importante. *CONABIO Biodiversitas*. 63: 6 – 10.
- Moraes, J. C.; Souza, C.J.H.; Gonçalves, P.B.D.; Freitas, V.J.F.; Lopes Junior, E.S. 2008. Controle do estro e da ovulação em ruminantes, p. 33-55. In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo Jr., Freitas V.J.F. *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal*. Roca, São Paulo.
- Monreal, A. C. D.; Carneiro, L. O. H. B.; Redondo, M. V. S. 2009. Efeito macho associado ao emprego de progesterona intravaginal em ovelhas sob altitude 20°52' South. *Agrarian*, 2:143-152.
- Moreira, R. J. C. 2002. *Uso do protocolo Crestar® em diferentes tratamentos utilizando Benzoato de Estradiol, PGF2 ∞ PMSG E GnRH para controle do ciclo estral e ovulação em vacas de corte*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba – São Paulo, 48 pp.
- Nogueira, D.M.; Lopes Junior, E.S.; Borges, G.S.; Monte, A.P.O.; Martins, S.R. 2008. atividade estral de cabras leiteiras exploradas na região semi-árida no nordeste do Brasil

utilizando diferentes protocolos de sincronização de estro. *V Congresso Nordestino de Produção Animal*. Aracaju.

Nogueira, T. M. R.. 1997. *Alguns Parâmetros Fisiológicos e Reprodutivos da Paca (Agouti paca, Linnaeus 1766) em Cativeiro*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista & Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal. 118 pp.

Nogueira, T. M. R. Giannoni, M.L.; Toniollo, G.H. 2006. Observações Preliminares Sobre a Reprodução de uma Colônia de Pacas *Agouti paca* Linnaeus, 1766 em Cativeiro. In: *Estudos Econômicos e Agropecuários*. Universidade de Brasília *Centro de Estudos Avançados Multidisciplinares, Núcleo de Estudos Agrários*, 6: 83-95.

Nogueira Filho, S. L. G.; Nogueira, S. S. 1999. *Criação de pacas (Agouti paca)*. Piracicaba, SP. 60 pp.

Oliveira, F. S.; Machado, F.S.; Canola, M. R. F.; Camargo, M.H. B. 2007. Uniparidade em pacas criadas em cativeiro (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766) *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59:387 – 389.

Oliveira, F.S.; Machado, R.F.; Canola J.C. 2003. Real time B- mode ultrasound in pacas pregnancy (*Agouti paca*, Linnaeus, 1776). *Brazilian Journal Of Veterinary Research and animal Science*, 40: 73-78.

Pérez, R. C. M. 2001. Caracterização de la atividade reprodutiva de tepezcuitle (*Agouti paca*) bajo crianza controlada. *Informe final do proyecto*. Universidade Autónoma de Yucatan Facultad de Medicina Veterinária y Zootecnia. México, 9 pp.

Pérez, R. C. M.; Baz, E. C. 2006. Atividade ovárica del tepezcuintle *Agouti paca* (Rodentia :Agoutidae) em cautiverio. *Revista Biología Tropical*, 54: 903-912.

Pérez-Martínez M.; Mendoza, M.E.; Romanoa, M.C. 1999. Exfoliative vaginal cytology and plasma levels of estrone and estradiol-17 β in young and adult goats. *Small Ruminante Research*, 33: 153-158.

- Porto, R. R. M.; Cavalcante, T.V.;Dias, F. E. F.; Rocha, J.M.N.; Souza, J.A.T. 2007. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. *Ciência Animal Brasileira*, 8: 521-527.
- Rengifo, M. E.; Navarro, D.T.; Urrunaga, A.B.; Vásquez, W.F.; Aspajo, F.V. 1996.Crianza familiar del majaz o paca (*Agouti paca*) en la Amazonia. *Tratado de Cooperacion Amazônica, Secretaria Pro Tempore*. Lima: Mirigraf S.R. L.45 pp.
- Ribeiro, A. P. C.; Vicente, W.R.L.; Santos, I.W.; Pires, E.A.; Alves, A. E.; Apparício, M.F. 2007. Gonadotrofinas na indução do estro em cadelas. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal*, 8: 324-334.
- Ribeiro, V. M. F.; Zamora, L. M. 2008. *Pacas e capivaras criação em cativeiro com ambientação natural*. Bagaço, Rio Branco, AC. 48 pp.
- Rocha, J.M.; Rabelo, M.C.; Santos, M.H.B.; Machado, P.P.; Bartolomeu, C.C; Neves, J.P.; Lima, P.F.; Oliveira, M.A.L.2007. IATF em vacas nelore: avaliação de duas dosagens de eCG e reutilização de implantes vaginais de progesterona. *Medicina Veterinária*, 1: 40-47.
- Rubianes, E.; Menchaca, A.; Carbajal, B. 2003. Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2. *Animal Reproduction Science*,78: 47–55.
- Santos, R., Lima, A.L., Barbosa, W.A., Vargas Junior, J.G. 2005. Determinação da curva de crescimento em pacas (*Agouti paca* L.) Criadas em cativeiro do nascimento ao desmame. *IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba* (<http://biblioteca.univap.br/dados/INIC/cd/inic/IC5%20anais/IC5-5.PDF>). Acesso em: 09 / 07/ 2008.
- SAS Institute 2003. Statistical Analysis System. SAS user's guide: statistic. Version 6. 12 ed. Cary, SAS Institute, 846 p.

Scherf, B. D. 2005. Lista mundial de vigilancia para la diversidad de los animales domésticos. 2ed. Roma: FAO, 1997. (www.fao.org/docrep/V8300S/v8300s00.htm.) Acceso em: 19 / 06 / 2009.

Sirois, J.; Fortune, J.E. 1990. Lengthening the bovine estrus cycle with low concentrations of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicle dominance. *Endocrinology*, 127: 916-925.

Smythe, N. 1991. PACA. 263 - 270. In: Robson, J.G.; Redford, K. H. *Microlivestock: little know small animals with a promising economic future*. Washington, DC: *NationalAcademy*. 449 pp.

Smythe, N.; Brown de Guanti, O. 1995. *La domesticación y cria de la paca (Agouti paca)*. Guia FAO conservación # 26. Roma: FAO. 91 pp.

CAPÍTULO 2

**QUADRO CITOLOGICO VAGINAL, CONCENTRAÇÃO
PLASMÁTICA DE PROGESTERONA DURANTE A GESTAÇÃO E
MEDIDAS FETAIS EM PACA (*Cuniculus paca* LINNAEUS, 1766)**

Quadro citológico vaginal, concentração plasmática de progesterona durante a gestação e medidas fetais em paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766)

(Artigo submetido à revista Acta amazônica)

RESUMO

Em 27 pacas (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) objetivou-se descrever aos 30, 60 e 90 dias (D) de prenhez, diagnosticada por ultrassonografia (US) os tipos celulares do epitélio vaginal em esfregaços vaginais, relatar as condições de abertura da vulva e as características do muco vaginal, determinar a concentração plasmática de progesterona (P4) por radioimunoensaio, e ainda, mensurar por ultrassonografia (US) o diâmetro biparietal (DBP) fetal aos 60 e 90 dias de prenhez. No D30, 40% das amostras exibiram células (com características estrogênicas) superficiais e presença de núcleos nus. Nos D60 e D90, células parabasais, intermediárias, superficiais, naviculares e estavam presentes nas mesmas proporções, mas células endocervicais foram descritas em apenas 73,9% e 69% das amostras daqueles dias, respectivamente. No D30 a maior proporção de células naviculares e superficiais diferiu ($P < 0,05$) em relação aos outros tipos celulares presentes. O muco vaginal apresentou-se cristalino e fluido em 100% e em 70% das fêmeas nos D30 e D60, respectivamente. Observou-se o vestíbulo vaginal aberto em torno de 50% das fêmeas em todos os dias de exames. Valores mínimos detectáveis de P4 foram obtidos em 72% e em 83% das fêmeas, enquanto que as médias das medidas dos DBP foram 1,25 cm ($\pm 0,16$) e 2,34 cm ($\pm 0,25$) nos D60 e D90, respectivamente. O quadro citológico vaginal nos D30, D60 e D90 e o DBP fornecem elementos que contribuem para diagnóstico de gestação em pacas. A concentração de P4 demonstra a necessidade de maiores estudos da endocrinologia da gestação em pacas.

PALAVRAS CHAVE: Prenhez em paca, diâmetro biparietal, progesterona, animais silvestres, região amazônica.

Vaginal cytology, serum progesterone concentration during pregnancy and fetal measurements in paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus 1766)

ABSTRACT

The objective of this work was to describe in 27 pacas (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) at 30, 60 and 90 days (D) of pregnancy diagnosed by ultrasonography (U.S.) the cell types of the vaginal epithelium by vaginal smears, to report the vulva opening condition and the characteristics of vaginal mucus, to determine the progesterone (P4) serum concentration by radioimmunoassay, and also measure by ultrasound (U.S.) the fetuses biparietal diameter (BPD) at 60 and 90 days of pregnancy. At D30, 40% of the smears exhibited surface cells (with estrogenic characteristics) and of naked nuclei. At D60 and D90, parabasal, intermediate, superficial, and navicular cells were present in the same proportions, but endocervical cells were described in only 73.9% and 69% of those day's smears, respectively. At D30 the highest proportion of navicular and surface cells differed ($P < 0.05$) compared with other cell types. The vaginal mucus was crystalline and fluid in 100% and 70% of females at D30 and D60, respectively. It was observed the vaginal vestibule open in around 50% of females in every day of exams. Minimum detectable P4 serum concentration was obtained on 72% and 83% of females, while the averages of the BPD were 1.25 cm (± 0.16) and 2.34 cm (± 0.25) on D60 and D90, respectively. Vaginal cytology aspects at D30, D60 and D90 and BPD provide elements to contribute to pregnancy diagnosis in paca. P4 concentration shows the need of further endocrinology of pregnancy studies of paca.

KEYWORDS: Pregnancy in paca, biparietal diameter, progesterone, wild animal, Amazon region.

INTRODUÇÃO

A paca tem sido utilizada como fonte de proteína na alimentação dos povos da floresta e de produtores rurais da região neotropical, mas a caça indiscriminada nas reservas extrativistas poderá provocar esgotamento populacional desta e de outras espécies (Mittermeier *et al.* 1992; IBAMA, 2003). Portanto, a criação em cativeiro se apresenta como uma alternativa à exploração econômica e sustentável desta espécie.

Na natureza, são animais de hábitos solitários, com pares de adulto vivendo em uma área de aproximadamente 2,5 ha em média, defendida contra invasores (Moreira e Macdonald, 1997). Em cativeiro, normalmente um macho pode conviver com três a cinco fêmeas em uma baía com 12 m² (Hosken e Silveira, 2001; Ribeiro e Zamora, 2008).

Pacas reproduzem-se o ano todo (Nogueira Filho e Nogueira, 1999; Landim Junior, 2000; Ribeiro e Zamora, 2008) e seu período gestacional é citado na literatura com grandes variações como desde 97 dias (Matamoros, 1982) até 155 dias (Rengifo *et al.* 1996).

A cópula em geral ocorre à noite e um achado pós-cópula é o tampão vaginal de sangue e sêmen que é expulso e pode ser ingerido pela fêmea (Hosken e Silveira, 2001). Estes autores relatam que por serem muito susceptíveis às condições ambientais a que estão submetidas em cativeiro, as pacas apresentam certas variações em alguns parâmetros reprodutivos.

A citologia vaginal tem sido empregada para identificar as fases do ciclo estral em pacas (Matamoros e Pashov, 1984; Nogueira *et al.* 2005; Guimarães *et al.* 2008). Por ser constituído por camadas morfológicamente distintas, o epitélio vaginal é alterado de acordo com o estímulo hormonal predominante em cada fase, as quais podem ser identificadas através de métodos apropriados de coloração histológica (Raposo *et al.* 2000; Porto, 2007).

Assim, em pacas, diversos autores (Matamoros e Pashov, 1984; Nogueira *et al.* 2005; Pérez e Baz, 2006, Guimarães *et al.* 2008) identificaram em um ciclo estral de cerca de 32,5 \pm 3,69 dias, diferentes fases como: proestro, estro, metaestro e diestro.

A influência da gravidez sobre os epitélios do útero, da cérvix e da vagina é bastante acentuada (Carvalho, 2002) e, no seu decurso, a citologia vaginal é caracterizada pela ausência das variações cíclicas motivada pela progressiva acentuação da estimulação hormonal do tipo gestacional (Gompel e Koss, 1997).

Diehl e Day (1973) afirmam que a quantidade de camadas do epitélio vaginal é um critério utilizado, entre vários, para distinguir prenhez de não prenhez; assim, o encontro de duas a três camadas apenas de epitélio vaginal pode ser considerado prenhez.

Durante a prenhez, a concentração de progesterona no plasma das espécies hystricomorphas (subordem dos roedores) pode ser dividida em duas fases: níveis hormonais baixos e altos (Busso, *et al.* 2007).

Em chinchilas (*Chinchila laninger* Gray, 1831) de acordo com Tam (1970) e Busson *et al.* (2007), durante os primeiros 40 dias de prenhez a progesterona no plasma permanece sem mudanças relevantes, mas a partir dos 60 dias, o conteúdo hormonal alcança altos valores e assim se mantém. Gromadzka-Ostrowska *et al.* (1985) relatam que nesta espécie, conforme a gravidez avança, as concentrações de progesterona apresentam marcadas mudanças que vão desde altos valores no início (9 a 29 dias) e em estágio mais avançado da prenhez (70 – 80 dias) até valores não detectáveis por volta do 40º ao 60º dia de prenhez e valores muito baixos trinta dias antes da parição. Em cutiaras (*Myoprocta pratti* Pocock, 1913), Rowlands *et al.* (1970) verificaram um aumento da concentração de progesterona no início da gestação o qual foi assim mantido além da metade da prenhez, com um declínio no final da prenhez. De acordo com estes autores, as diferenças na quantificação de progesterona entre algumas espécies hystricomorphas se dão principalmente durante a prenhez, com relação aos níveis

máximos encontrados e sua duração. Pérez e Baz (2006) descrevem valores para progesterona plasmática de 23 e 37.36 ng/mL em duas pacas no início da gestação.

A estimativa da idade gestacional por ultra-sonografia é baseada na correlação entre tamanho e idade fetal (Varol *et al.* 2001). A mensuração do diâmetro biparietal (DBP) é rotineiramente utilizada durante o exame pré-natal em humanos (Torres, 2008) e, para De Bulnes *et al.* (1998) e Abreu *et al.* (2007) é um dos melhores e mais confiáveis parâmetros para estimar com elevada precisão a idade fetal em ovelhas e cabras. Outras medidas como circunferência abdominal, órbita ocular, e do coração, comprimento crânio caudal, diâmetro torácico, comprimento do fêmur, diâmetro dos placentomas, diâmetro do tronco fetal, também, são estimativas que se correlacionam com precisão com o crescimento fetal em cabras e ovelhas (Haibel e Perkins, 1989; Dilmen *et al.* 2002; Lee *et al.* 2005; Abreu *et al.* 2007).

Em pacas, Oliveira *et al.* (2003) diagnosticaram gestação a partir do nono dia após a cobertura, pela visualização da vesícula embrionária e utilizaram medidas da área da placenta e da área cardíaca do feto, durante 129 e 89 dias respectivamente antes do parto, para estimar a idade gestacional.

Por serem as pacas de hábitos noturnos (Rengifo *et al.*, 1996; Hosken e Silveira, 2001), nem sempre é possível ao criador observar uma cópula, deduzir se houve fertilização e assim, estimar a data de parição destes animais. Além disso, observa-se apenas o crescimento abdominal e intumescimento das mamas em pacas gestantes com bom escore corporal, a partir dos 90 dias de prenhez, há cerca de 2/3 do período gestacional (Ribeiro e Zamora, 1998).

Estabelecer critérios para um diagnóstico de gestação e determinar o período gestacional em uma fêmea é de fundamental importância na clínica veterinária, pois permite que o profissional da área e o criador estabeleçam um manejo reprodutivo adequado,

possibilitando ainda a tomada de decisões que afetem diretamente os índices de produtividade, evitando assim perdas econômicas.

Até o momento, a melhor forma de diagnosticar precocemente a gestação em pacas é por meio de ultra-sonografia (Oliveira *et al.* 2003). Porém, nem sempre existe a disponibilidade para o produtor ou veterinário, do equipamento necessário para este fim. Por outro lado, existe uma escassez de trabalhos que possibilitam determinar o período gestacional desta espécie utilizando-se de medidas fetais. Assim sendo, é de primordial importância que se estabeleçam novos métodos de diagnóstico de prenhez, que sejam mais acessíveis ao veterinário e ao criador e que se busque a aplicabilidade de novas medidas, como o diâmetro biparietal em fetos, que possibilitem determinar a idade gestacional da fêmea de paca, uma vez que ainda não foram testadas.

Com vistas ao exposto, este trabalho teve como objetivos descrever e caracterizar os tipos celulares presentes nos esfregaços vaginais de pacas, relatar as condições de abertura da vulva e do muco vaginal aos 30, 60 e 90 dias de prenhez. Além disso, propôs-se determinar a concentração plasmática de progesterona e mensurar o diâmetro biparietal dos fetos, aos 60 e 90 dias de prenhez, avaliando a aplicabilidade desta medida, como forma de contribuir com o diagnóstico e o estabelecimento da idade gestacional nesta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Fazenda Experimental Catuaba, da Universidade Federal do Acre, situada no município de Senador Guiomard/AC, km 30 rodovia BR - 364 (10°04' S e 67°37' W). O clima da região é do tipo amazônico equatorial quente e úmido com temperaturas anuais médias variando entre 24,5 °C a 32 °C (Acre, 2006).

Um total de 40 animais adultos foram utilizados, sendo 27 fêmeas e 13 machos, identificados por meio de microchips (AnimallTAG® - KORTH – RFID, São Paulo - Brasil), os quais foram alocados em baias, na proporção de um macho para duas fêmeas, mas, em

uma das baias, um macho foi posto com três fêmeas. As fêmeas eram comprovadamente pluríparas, e não estavam prenhes quando foram postas com os machos. A alimentação dos animais foi composta de frutos, tubérculos e grãos produzidos na fazenda e colhidos na mata adjacente ao criatório. A água servida para banhos e ingestão foi posta *ad libitum*.

Esfregaços vaginais para preparação e coloração de lâminas para citologia

Com os animais devidamente contidos, a colheita do material para citologia vaginal foi feita com *swabs* estéreis umedecidos com solução fisiológica, introduzidos cerca de seis centímetros no canal vaginal, após higienização adequada da vulva. Com o material obtido dos *swabs*, foram feitos esfregaços em lâminas histológicas identificadas com número do animal e data de coleta e imediatamente fixadas em álcool 95% para, posteriormente, serem coradas pela técnica de Shorr e PAS e examinadas em microscópio óptico (Olympus CH30 - Japão, objetivas de 10x e 40x). Para se comprovar a presença de glicogênio no material dos esfregaços, a técnica de PAS era acrescida de amilase salivar, conforme sugerem Junqueira e Carneiro (1979). Para identificação dos tipos celulares foram contadas 100 células por lâmina, observando-se a porcentagem dos tipos celulares presentes em cada lâmina. Os esfregaços vaginais foram feitos diariamente, pelas manhãs, até a identificação de espermatozoides nas lâminas quando se tinha então a confirmação da cobertura.

Aos 30, 60 e 90 dias após confirmação das coberturas, foram feitos esfregaços vaginais, como descritos anteriormente e, nessas ocasiões, inspecionou-se, também, as condições da vulva quanto ao seu fechamento ou abertura, presença e aspecto de muco vaginal.

O intervalo entre as coberturas e as parições foi anotado de maneira que se pudesse estabelecer o período gestacional.

Colheita de sangue para dosagem de progesterona plasmática:

Nessas mesmas datas especificadas no tópico anterior, foram colhidas compreendendo 3 mL de sangue de todas as fêmeas, por venopunção da veia cefálica, safena lateral ou safena medial, com *scalps* descartáveis 21G e seringas de 5 mL contendo EDTA, devidamente identificadas e mantidas sob refrigeração em caixas térmicas com gelo (por no máximo 3 horas) até que se procedesse a centrifugação, feita a 1000 rotações por minuto durante 10 minutos. As amostras de plasma obtidas foram acondicionadas em frascos de polipropileno e armazenadas à temperatura de -20°C até a realização das dosagens. As concentrações plasmáticas de progesterona foram determinadas de acordo com a técnica de radioimunoensaio empregando danazol, descrita por Knickerbocker *et al.*, 1986, modificada por Carriere e Lee (1994).

Exames ultrassonográficos

Os exames ultrassonográficos, também nas datas já especificadas, com equipamento de ultrassom para uso veterinário, transdutor convexo de 7,5 MHz (Aloka, modelo SSD-500v – Aloka Co. Tóquio, Japão) aos 30 dias após as coberturas para confirmação da prenhez e aos 60 e 90 dias após as coberturas, para que se mensurasse o DPB fetal, por ser este considerado na literatura um dos melhores e mais confiáveis parâmetros para estimar com elevada precisão a idade fetal em animais e humanos. A opção de se tomar a medida do DBP apenas nestes dois períodos gestacionais foi feita, para minimizar a manipulação das fêmeas prenhas, evitando causar o estresse (animais silvestres são altamente susceptíveis ao estresse por manipulação), e eventuais abortamentos por este fator.

Para tanto, cada fêmea foi devidamente contida em puçá e posta em decúbito dorsal, sem uso de tranquilizantes ou de anestésicos. Não se efetuou tricotomia na área abdominal trabalhada, por ser uma região com poucos pelos, porém, utilizou-se gel apropriado para exame ultrassonográfico (Carbogel®), como meio de contato do transdutor com a pele.

Inicialmente posicionava-se o transdutor cerca de dois centímetros cranialmente ao par de mamas inguinais, para o procedimento de varredura longitudinal da região abdominal caudal e cavidade pélvica. Na sequência, deslocava-se o transdutor cranial e lateralmente à linha alba por aproximadamente 12 cm, passando-se pela porção média do abdômen e finalizando na porção cranial até o encontro do crânio fetal, identificado pela imagem em tempo real. A partir daí, quando as órbitas foram identificadas e a imagem congelada, mensurou-se em corte sagital o DBP que correspondeu à medida externa da região mais larga do crânio fetal (Figura 1).



Figura 1. Imagem ultrassonográfica de feto de *Cuniculus paca*, 60 dias pós concepção. DBP = 1,10 cm.

Análises Estatísticas:

Todos os dados obtidos foram analisados através de procedimentos de estatística descritiva. Com relação aos tipos celulares encontrados foram efetuados percentuais médios e desvio padrão e, para comparação entre médias, o teste t de Student ($P > 0,05\%$); Os dados relativos à concentração de progesterona aos 60 e 90 dias de prenhez, foram expressos por médias e respectivos desvios padrão e pelos valores absolutos da máxima e da mínima concentração. As condições de muco e do vestíbulo vaginal foram dadas em percentuais. A medida do DBP aos 60 e 90 dias é apresentada em forma de média, desvio padrão e os dados

obtidos foram submetidos ao teste de Correlação de Pearson, adotando-se valor de $P > 0,05\%$; Para isto, utilizaram-se os softwares Excel 2000 e SAS – Statistical Analysis System (SAS, 2003).

ASPECTOS LEGAIS

Este trabalho foi realizado com autorização da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério do Meio Ambiente-MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, sob número 24669-1 (Autorização para atividades com finalidade científica).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, pela citologia vaginal gestacional, constataram-se padrões celulares particularmente exclusivos, com a presença de tipos celulares diferenciados, somente observados em situações específicas.

As células intermediárias apareceram frequentemente na forma de células naviculares (Figura 2).

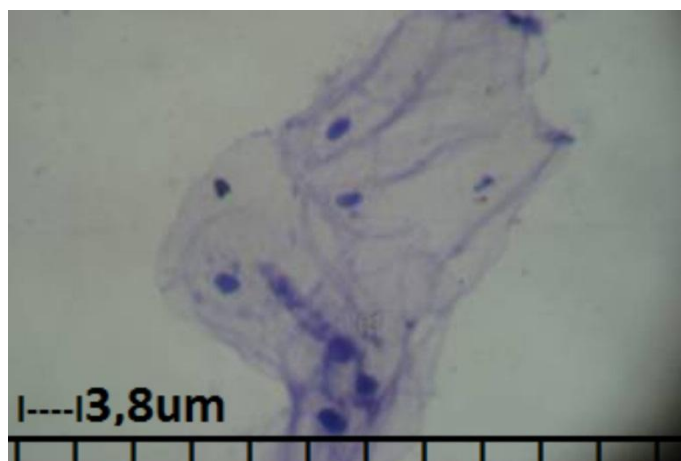


Figura 2. Fotomicrografia de esfregaço vaginal de *Cuniculus paca*. Células naviculares, Coloração PAS + amilase, 400 X. Barra 3,8 μm .

Para Gompel e Koss (1997) em mulheres, durante a gravidez a quantidade elevada do glicogênio caracteriza a célula navicular. Esta tem forma de barco, com núcleo deslocado pelo glicogênio para periferia da célula. Nos outros tipos celulares, não se observou mudanças de padrão.

As células endocervicais (Figura 3) encontradas, raramente observadas em esfregaços de epitélios vaginais de um ciclo estral, mostraram-se muito ativas na produção de muco e estiveram presentes em 73,9% e em 69% das lâminas aos 60 e 90 dias prenhez respectivamente. Estes resultados conferem com as descrições da citologia esfoliativa vaginal em mulheres grávidas (Gompel e Koss, 1997; Floriano *et al.* (2007). e em fêmeas prenhas de catetos (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) descritas por Mayor *et al.* (2004).

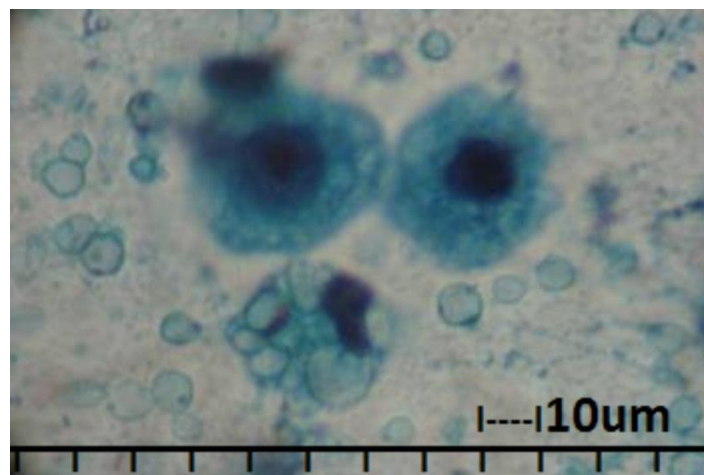


Figura 3. Fotomicrografia de esfregaço vaginal de *Cuniculus paca*. Células endocervicais, Coloração Shorr 400 X. Barra 10 μ m.

A abundância de muco produzido pelas células endocervicais encontradas neste trabalho, provavelmente favoreceu a formação do tampão mucoso gestacional, conforme relata Hafez (2004).

Em lâminas coradas pela técnica histoquímica PAS adicionado de amilase, as células endocervicais coravam-se em magenta, estavam repletas de mucina e provavelmente, continham glicogênio; Além disso, foram encontrados vacúolos isolados, corados em azul tênue, supostamente excitados por estas células. Este achado é corroborado por Gompel e Koss (1997) quando afirmam que a carga glicogênica aumenta sob a ação da progesterona e é máxima durante a gestação. Os autores chamam a atenção para o fato de que a gestação em mulheres pode se desenvolver com a ausência de qualquer imagem citológica característica.

Ayen *et al.*, 2002, verificando as mudanças histológicas da parede vaginal de vacas em diferentes estágios de prenhez, também evidenciaram uma marcada diferença entre o nono mês e os restantes. A partir do 8º mês, células colunares secretórias foram observadas no epitélio e aumentaram em quantidade até o nono mês de prenhez. Todas estas alterações, de acordo com os autores, se devem a mudanças hormonais nos diferentes estágios de prenhez. Neste trabalho, as células secretoras puderam ser vistas a partir do segundo mês de gestação (correspondente aproximadamente ao segundo terço da prenhez).

Em aproximadamente 40% das lâminas, foram observados muitos núcleos nus no material vaginal coletado aos 60 e 90 dias de prenhez. Este fenômeno de citólise, conforme Gompel e Koss (1997) atingem particularmente células intermediárias e é resultado da digestão do glicogênio por lactobacilos deixando os esfregaços caracterizarem-se por exibir núcleos nus e detritos celulares. De acordo com Carvalho (2002) os núcleos nus se observam principalmente na fase pós ovulatória e na gravidez.

Aos 30 dias de prenhez, as células intermediárias e superficiais aparecem praticamente na mesma proporção nos esfregaços e à primeira vista, em um padrão muito semelhante ao proestro nesta espécie, evidenciando intensa estrogenia. Entretanto, as células intermediárias na forma navicular, que não são comuns em um ciclo estral estão presentes em 75% das lâminas, compondo no mínimo 30% dos tipos celulares encontrados e fazem a diferença entre estas duas fases.

Aos 60 dias de prenhez, 73,9% das fêmeas apresentaram em seus esfregaços células endocervicais, compondo no mínimo 5% do total de células encontradas. As células intermediárias, do tipo navicular, estão presentes em 47,8% das lâminas. Em seis fêmeas, 40 a 60% das células eram do tipo superficial, muitas das quais anucleadas, sugestivo de fase estrogênica cíclica.

Aos 90 dias de prenhez, 69% das lâminas continham de 10 a 60% de células endocervicais e células naviculares em 39,1% das lâminas. Também, neste período gestacional, cinco fêmeas mostraram tipos celulares característicos de intensa estrogonia, compatíveis com um padrão de proestro.

Os valores descritos para os tipos de células parabasais, intermediárias, naviculares e endocervicais não diferiram ($P < 0,05$) nos períodos gestacionais de 60 e 90 dias, o que indica uma uniformidade nos padrões celulares do epitélio vaginal de pacas durante estes períodos gestacionais citados. Entretanto, diferiram ($P < 0,05$), os tipos celulares naviculares e superficiais aos 30 dias dos demais períodos (Tabela 1).

Tabela 1- Tipos celulares em esfregaço vaginal de pacas (*Cuniculus paca*) aos 30, 60 e 90 dias de prenhez (média \pm desvio padrão dos percentuais). Rio Branco, 2010.

Período	C P (%)	C I (%)	C N (%)	C S (%)	C E (%)
30 dias		25 ($\pm 11,2$)a	25 (± 15)a	47,5 ($\pm 4,3$)a	
60 dias	14,3 ($\pm 12,3$)a	29,7($\pm 13,4$)a	9,5($\pm 12,2$)b	21,0 ($\pm 17,3$)b	25,2 ($\pm 22,4$)a
90 dias	12,8 ($\pm 14,3$)a	24,1($\pm 12,3$)a	13,9 ($\pm 20,6$)b	20,9 ($\pm 20,4$)b	27,3 ($\pm 23,4$)a

C P = células parabasais, C I = células intermediárias, C. N = célula , C S = células superficiais, C E = células endocervicais. Médias de tratamento seguida de letras diferentes (nas colunas), diferem significativamente pelo teste t –Student ($P > 0,05\%$).

O padrão celular estrogênico, sugerindo atividade folicular, encontrado na citologia esfoliativa vaginal aos 30 dias de prenhez, assim como em seis e em cinco fêmeas aos 60 e aos 90 dias de prenhez respectivamente, provavelmente se deve ao fato de que fêmeas de paca prenha, de acordo com Matamoros (1981) e Pérez e Baz (2006) tenham em seus ovários, folículos em diferentes fases do seu desenvolvimento, entre os quais alguns poderão luteinizar ou serão responsáveis pelo desencadeamento de um cio pós parto (Matamoros, 1981). Em porcos espinhos (*Hytrix afriaeaustralis* Linnaeus, 1758) Van Aarde e Skinner

(1986) e em cutiarias (Rowlands *et al.* (1970) encontraram atividade folicular em fêmeas prenhes durante todo o período gestacional e observaram que estas estruturas sofriam luteinização, formando os corpus lúteos acessórios importantes para suplementar a progesterona necessária a manutenção da prenhez. Uma grande quantidade de corpo lúteo acessório proveniente de folículos em desenvolvimento, também foi observada em pacas prenhes por Matamoros (1981).

O padrão celular estrogênico observado em fêmeas de pacas prenhes encontradas neste trabalho, também foi observado por Mayor *et al.* (2004) em exames histológicos de ovários de pecaris (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) gestantes. Segundo estes autores, existem crescimentos de grupos de folículos com estabelecimento de dominância e que o crescimento folicular responsável pela síntese ovariana de estrógenos, poderia justificar a alteração do padrão celular que ocorre no epitélio vaginal destas fêmeas, mesmo durante a gestação. De acordo com Thomas e Dobson (1989) de 8 a 10% de vacas gestantes, também apresentam sinais de estro em plena gestação.

No criatório onde a pesquisa foi realizada, uma fêmea pariu uma cria com 900 gramas de peso e outra, uma com 800 gramas. Aos 30 e 45 dias pós parto, as duas fêmeas voltaram parir uma cria cada. Este episódio, sugere ser possível ocorrer desenvolvimento folicular e cio fértil com cobertura, em pacas no período gestacional, fato este corroborado pelos achados citológicos neste experimento e pelos trabalhos de Mayor *et al.* (2004) e Thomas e Dobson (1989).

Aos 30 dias de prenhez, o muco vaginal apresentou-se cristalino e pouco viscoso em todas as fêmeas. O vestíbulo vulvar em metade delas apresentava-se aberto.

Aos 60 dias de prenhez, 53% das fêmeas apresentaram vestíbulo vaginal fechado e 47% aberto. Aproximadamente, os mesmos números ocorreram aos 90 dias, isto é, 50% das fêmeas permaneceram com o vestíbulo vaginal aberto. Estas constatações diferem das de

Weir e Rowlands (1973) os quais relataram que os caviomorfos (Grupo de roedores que apresentam quatro molares de cada lado da mandíbula), com exceção do *Myocastor coypus* (Ratão-do-banhado), possuem uma membrana vaginal oclusa formada em razão da hiperplasia de células epiteliais, abrindo-se somente durante o estro ou o parto. Diferem ainda de Hosken e Silveira (2001) e Nogueira *et al.* (2005) segundo os quais, a membrana vaginal da paca geralmente permanece aberta no cio e fechada nos outros estágios reprodutivos.

Matamoros e Pashov (1984) também observaram pacas com vestíbulo vaginal aberto durante a prenhez. Esta situação durante a prenhez em pacas, provavelmente se dá devido às variações hormonais (relação progesterona / estrógenos) que ocorrem em roedores e constatados em porco espinho, coelhos (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) e chinchilas durante a gestação (Van Aarde e Potgieter, 1986; Van Aarde e Skinner 1986; Holt, 1989; Busso *et al.* 2007).

Ao se efetuar os *swabs* vaginais constatou-se que 26% e 30% das fêmeas estudadas, respectivamente, aos 60 e 90 dias de prenhez apresentaram muco mais viscoso ou espesso, provavelmente, devido à ação da progesterona; essa característica do muco confere maior proteção ao ambiente uterino na prenhez. No restante dos animais o muco apresentava-se fluido e cristalino. Estes resultados diferem, portanto em parte, dos encontrados em catetos por Mayor *et al.*,2004, que verificaram uma grande quantidade de muco espesso e viscoso em fêmeas prenhes.

As características do muco encontrado aos 30, 60 e 90 dias de prenhes, estão de acordo com os achados citológicos nestas mesmas fases de período gestacional, uma vez que, aos 30 dias, o epitélio vaginal apresentou fortes características de estrografia, o que provavelmente tenha levado a formação de um muco mais fluido e menos viscoso, enquanto que aos 60 e 90 dias de prenhez com a intensa produção de muco observada pelas células endocervicais é de se esperar um muco mais viscoso. Além disso, as variações hormonais

sofridas pelo epitélio vaginal ao longo da prenhez, conforme observado em outros roedores (Van Aarde e Potgieter, 1986; Van Aarde e Skinner 1986; Holt, 1989; Busso *et al.* 2007), podem ter corroborado para este fato.

Os resultados da determinação da concentração plasmática de progesterona demonstraram que 94% e 88,8% das fêmeas aos 60 e 90 dias de prenhez respectivamente, tinham valores inferiores a 1 ng/mL. Os valores máximos encontrados foram 3,03 e 3,55 ng/mL aos 60 e 90 dias de prenhez respectivamente, enquanto que o mínimo foi 0,31 ng/mL para os dois períodos. Esta grande variabilidade entre os valores máximos e mínimos encontrados para progesterona plasmática deste roedor aos 60 e 90 dias de prenhez, explica as médias e os desvios padrão obtidos: 0,54 ng/mL ($\pm 0,65$) aos 60 dias e 0,53 ng/mL ($\pm 0,77$) aos 90 dias de prenhez.

De acordo com Jainuden e Hafez (2004) a quantificação da progesterona, tem sido amplamente utilizada para diagnóstico da gestação em animais domésticos e que embora seja um método não específico para a prenhez, esta pode ser utilizada em razão da persistência do corpo lúteo durante o início da gestação em todos os animais domésticos. Normalmente, a amostra (sangue ou leite) é coletada um ciclo estral após a inseminação ou cobertura, ou seja, 22 a 24 dias em bovinos e bubalinos, 16 a 18 dias em ovinos, 18 a 21 dias em caprinos, 16 a 22 dias em equinos e 21 dias em suínos. Naqueles períodos, o nível de progesterona é baixo no animal não prenhe e alto no animal prenhe.

Neste trabalho, as dosagens de progesteronas só foram efetuadas no segundo terço gestacional. As lacunas causadas pela falta de amostragem no primeiro e último terço gestacional, dificultaram o entendimento sobre o comportamento da concentração plasmática de progesterona ao longo da gestação de pacas e, por conseguinte, seu papel no diagnóstico da gestação nestes animais. Porém, os níveis mínimos detectáveis deste hormônio na maioria das fêmeas, durante os períodos gestacionais pesquisados (60 e 90 dias de prenhez, segundo terço

da gestação), são compatíveis aos encontrados por Mc Cormack e Greenwald (1974) e Gromadzka-Ostrowska (1985) no segundo terço da gestação em camundongos (*Swiss mice* Linnaeus, 1758) e chinchilas respectivamente, quando a concentração plasmática de progesterona também encontravam – se em níveis mínimos detectáveis nestas espécies. Andreazzi et al. (2004) observaram que em coelhas gestantes, a concentração de progesterona aumenta linearmente até o décimo dia da gestação, atingindo os níveis máximos que começam então a cair cerca de 10 dias antes do parto. Em cutiarias os níveis de progesterona plasmática começam a decair no segundo terço gestacional, até atingir níveis mínimos próximos à parição (Rowlands *et al.* 1970). Estes últimos autores relatam que nas espécies hystricomorphas, as diferenças entre níveis mínimos e máximos de progesterona e sua duração se dão principalmente durante a prenhez. Pérez e Baz (2006) relatam que em duas pacas, logo após a implantação dos embriões, os níveis de progesterona atingiram 23 e 37,36 ng/mL. No entanto, não acompanharam o desenvolvimento da gestação nestes animais e, por conseguinte, as possíveis modificações nos níveis de progesterona plasmática.

As avaliações ultrassonográficas levadas a efeito aos 30 dias de prenhez não possibilitaram determinar o DBP dos fetos, embora permitissem a visualização da vesícula embrionária e o saco gestacional. Este parâmetro foi bem estabelecido aos 60 e 90 dias de prenhez (Figura 1)

Os valores das medidas dos DBP em cm (média \pm desvio padrão) aos 60 e 90 dias de prenhez e o incremento observado foram 1,25 (\pm 0,16) e 2,34 (\pm 0,25), 1,09 cm (\pm 0,30), respectivamente. Os valores mínimos e máximos registrados aos 60 foram 1,04 cm e 1,57 cm e aos 90 dias 1,75 cm e 2,74 cm. O maior incremento observado no período de 30 dias foi de 1,51cm e o menor de 0,49 cm. Valores dos DBP aos 60 e 90 dias são diferentes ($P < 0,05$).

Os DBP dos fetos aos 90 dias de prenhez não mostraram correlação ($r = 0$) com os de 60 dias, sugerindo, portanto, que o maior diâmetro encontrado aos 60 dias, necessariamente, não será o maior diâmetro encontrado aos 90 dias.

Das 27 fêmeas trabalhadas, apenas uma não levou a gestação a termo, pois abortou logo após o manuseio aos 90 dias de prenhez. O período gestacional das fêmeas restantes durou em média 152,33 ($\pm 0,47$) dias e é similar aos de Smythe & Brown de Guanti (1995) 157 dias; Rengifo *et al.* (1996) 145 a 155 dias; Guimarães *et al.* (2008) 148,6 + 4,8.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados demonstram que a citologia esfoliativa vaginal, bem como o diâmetro biparietal, podem ser utilizados como parâmetros para diagnóstico de prenhez e determinação da idade gestacional em pacas. Entretanto, apenas o exame do muco ou as condições em que se encontram o vestíbulo vaginal destes animais não oferecem confiabilidade para estes propósitos. Por outro lado, para que se possam utilizar dados da quantificação de progesterona como fator de diagnóstico de prenhez em pacas, mais estudos devem ser efetuados durante todo o período gestacional.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Acre. Governo do Estado do Acre, 2006. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico-Econômico do Estado do Acre. *Zoneamento Ecológico-Econômico do Acre Fase II: documento síntese –Escala 1:250.000*. SEMA. Rio Branco, Acre. 356 pp.

Abreu, D.; Almeida, J.C.; Silva, S.; Azevedo, J.; Fontes, P.; Simões, J. 2007. Estimativa da idade fetal por ultra-sonografia em cabras da raça Serrana. *REDVET- Revista electrónica de Veterinaria*, 8:1-6. (<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/636/63614239004.pdf>). Acesso em: 14/05/2010.

Andreazzi, M.A.; Scapinello, C.; Moraes, G.V.; Faria, H.G.; Aoki, E.e.; Michelan, A.C. 2004. Avaliação de metabólitos lipídicos e hormônios esteroides em soro de coelhas alimentadas

com ração contendo diferentes fontes de óleos vegetais. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 26: 359-365.

Ayen, E.; Hasanzadeh, S.H.; Abdollah-Vand, M. 2002. Histological changes of the vaginal wall during different stages of pregnancy, oestrus and di-oestrus in cow. *Journal of Veterinary Research*, 57: 15-19.

Bastos, L. V.; Guimarães, D.A.; Luz-Ramos,R.S.; Ferreira, A.C.S; Ohashi, O.M.. 2003 Aspectos da citologia vaginal durante o ciclo estral de *Agouti paca* criada em cativeiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27: 294 - 295.

Busso, J. M.; Ponzio, M. F.; Cuneo, M. F.; Ruiz, R.D. 2007. Noninvasive monitoring of ovarian endocrine activity in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Endocrinology*, 150: 288-297.

Carriere, P.D.; Lee, B. 1994. Direct radioimmunoassay of progesterone in bovine plasma using danazol (17-alpha-2,4-pregnadien-20-yno(2,3-d)isoxazol-17-ol) as a displacing agent. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 58: 230-233.

Carvalho, G. 2002. Achados Citológicos nas Diferentes Circunstâncias Obstétricas, p.117-120. In: Carvalho, G.(Ed.). *Citologia do Trato Genital Feminino*. 4ª Edição. Atheneu, São Paulo.

De Bulnes, A.G.; Moreno, J.S.; Sebastian, A.L. 1998. Estimation of fetal development in Manchega dairy ewes by transrectal ultrasonographic measurements. *Small Ruminantes Research*, 27: 243 - 250.

Diehl, J.R.; Day, B.N. 1973. Utilization of frozen sections with the vaginal biopsy technique for early pregnancy diagnosis. In: Swine. *Journal Animal Science*, 37: 114-117.

Dilmen, G.; Koktenes, A.; Turhan, T.O.; Tez, S. 2002. Growth of the fetal lens and orbit. *International Journal Gynecology Obstetrics*, 76: 267-271.

- Floriano, M. I.; Araújo, C. S. A.; Ribeiro, M. A. 2007. Conhecimento sobre fatores de risco associados ao câncer do colo uterino em idosas em Umuarama-PR. *Arquivo Ciência Saúde*, 11: 199-203.
- Gompel, C.; Koss, L. 1997. Citologia do Aparelho Genital Feminino p.39 - 48. In: Gompel, C.; Koss, L. (Eds.). *Citologia Ginecologia e suas Base Anatomoclínicas*. Manole, São Paulo.
- Gromadzka-Ostrowska, B.; Zalewska, E.; Szylarska-Goźdz. 1985. Peripheral plasma progesterone concentration and hematological indices during normal pregnancy of Chinchillas (*Chinchilla laniger*), *Comparative Biochemistry and Physiology*. Parte A 82: 661–665.
- Guimarães, D.A.; Bastos, L.V.; Ferreira, A.C.S.; Luz-Ramos, R.S. Ohashi, O. M.; Ribeiro, H.L. 2008. Características reprodutivas da paca fêmea (*Agouti paca*) criada em cativeiro. *Acta Amazonica*, 38: 531-538.
- Hafez, E.S.E. 2004. Anatomia Funcional da Reprodução Feminina. P.13-29: In: Hafez, E. S. E. (Ed). *Reprodução Animal*. Manole, São Paulo, São Paulo.
- Haibel, G.K.; Perkins, N.R.; Lidl, G.M. 1989. Breed differences in biparietal diameters of second trimester Toggenburg, Nubian, Angora goats fetuses. *Theriogenology*. 32: 827 – 835.
- Holt, J.A.1989. Regulation of progesterone production in the rabbit corpus luteum. *Biology of reproduction*.40: 201- 208.
- Hosken, F. M.; Silveira, A. C. 2001. *Criação de pacas*. Coleção Animais Silvestres. v. 3. Aprenda Fácil, Viçosa, 206 pp.
- IBAMA. Instituto Nacional do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Disponível em: <<http://www.ibama.org.br>>. Acesso em: 21/03/ 2003.
- Jainudeen, M.R.; Wahid, H.; Hafez, E. S.E. 2004. Indução da ovulação, Produção e transferência de Embriões, p.409 - 434. In: Hafez, E.S.E.; Hafez, B. (Eds.) *Reprodução Animal*. Manole, São Paulo.

- Junqueira, L.C.; Carneiro, J. 1979. Histoquímica e Citoquímica, p. 20-29. In: Junqueira L.C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Knickerbocker J.J, Thatcher, W.W, Bazer F.W, Drost M, Barron, D.H, Ficher K.B, Roberts R.M. 1986. Protein secreted by Day 16 to 18 bovine conceptuses extends corpus luteum function in cows. *Journal Animal Science*, 77: 381-391.
- Lee, Y.; Lee, O.; Cho, J.; Shin, H.; Choi, Y.; Shim, Y.; Choi, W.; Shin, H.; Lee, D.; Lee, G.; Shin, S. 2005. Ultrasonic measurement of fetal parameters for estimation of gestational age Korean black goats. *Journal of Veterinary Medical. Science*, 67: 497-502.
- Matamoros, Y. 1981. Anatomia e histologia del sistema reproductor del tepezcuinte (*Cuniculus paca*). *Revista Biología Tropical*, 29: 155-156.
- Matamoros, Y. 1982. Notas sobre la biología del tepezcuinte, *Cuniculus paca*, Brisson (Rodentia: Dasyproctidae) em cativerio. *Brenesia*, San Jose. 20:71-82.
- Matamoros, Y.; Paschov, B. 1984. Ciclo estral del tepezcuite (*Cuniculus paca*, Brisson), em cautiveiro. *Brenesia*, 22: 249–260.
- Mayor, P.; Jori, F.; López-Bejar, M. 2004. Anatomicohistological characteristics of the tubular of genital organs of the female collared pecary (*Tayassu tajacu*) From North – Eastern Amazonia. *Anatomy Histology Embriology*, 33: 65-74.
- McComarck, J.T.; Greenwald, G.S. 1974. Progesterone and oestradiol 17 β concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *Journal Endocrinology*, 62: 101-107.
- Mittermeier, R.A., Schwarz, M.; Ayres, J.M. 1992. A new species of marmoset, genus *Callithrix* Erxleben, 1777 (Callitrichidae, Primates) from the Rio Maues region, state of Amazonas, central Brazilian Amazonia. *Goeldiana Zoologia*, 14:1-17.
- Moreira, J.R.; Macdonald, D.W. 1997. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores na Amazônia, p. 186-213. In: Vallades-Pádua, C.; Bodmer, R. E; Wellen J. L. *Manejo e Conservação de Vida Silvestre no Brasil*. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, Pará.

- Nogueira, T.M.R.; Toniollo, G.H.; Giannoni, M.L. 2005. Estrous cycle colpocytology in captive pacas (*Agouti paca* Linnaeus, 1766). *ARS Veterinária*, 21: 209-214.
- Nogueira-Filho, S.L.G.; Nogueira, S.S. 1999. *Criação de Pacas (Agouti paca)*. Fealq: Piracicaba, São Paulo. 60 pp.
- Oliveira, F.S.; Machado, R.F.; Canola J.C. 2003. Real time B- mode ultrasound in pacas pregnancy (*Agouti paca*, Linnaeus, 1776). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 40: 73-78.
- Pérez, R. C. M.; Baz, E. A. C. 2006. Actividad ovárica del tepezcuintle *Agouti paca* (Rodentia: Agoutidae) en cautiverio. *Revista de Biología Tropical*, 54: 903-912.
- Porto R.R.M.; Cavalcante, T.V.; Dias, F.E.F.; Rocha, J.M.N.; Souza, J.A.T. 2007. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. *Ciência Animal Brasileira*, 8: 521-527.
- Raposo, R.S., L.D.M. Silva, R.N.B. Lobo, V.J.F. Freitas e F.E.F. Dias. 2000. Comparação da citologia vaginal de cabras cíclicas e gestantes da raça Saanen. *Revista Científica de Produção Animal*, 2: 12-16.
- Rengifo, M.E.; Navarro, D.T.; Urrunaga, A.B.; Vásquez, W.F.; Aspajo, F.V. 1996. - *Crianza Familiar del Majaz o Paca (Agouti paca) en la Amazonia*. Mirigraf S.R.L., Tratado de Cooperacion Amazonica-Secretaria pró tempore # 48, Lima, Peru. 45pp.
- Ribeiro, V.M.F ; Zamora, L.M. 2008. *Pacas e capivaras criação em cativeiro com ambientação natural*. Editora Bagaço, Rio Branco, AC. 48 pp.
- Rowlands, I.W.; Tam, W.H.; Kleiman, D.G. 1970. Histological and Biochemical Studies on the ovary and of progesterone levels in the systemic blood of the green acouchi (*Myoprocta pratti*). *Journal Reproduction Fertility*, 22: 533-545.

- SAS INSTITUTE 2003. Statistical Analysis System: user's guide. Version 9.1, Cary, Tam, W.H. 1970. A comparative study of the production of progesterone by various hystricomorph rodents, *Journal Endocrinology*. 48: 18-19.
- Thomas, I.; Dobson, H. 1989. Oestrus during pregnancy in the cow. *The Veterinary Record*. 124: 387-390.
- Torres, C.A. 2008. *Estimativa da idade gestacional por ultra-sonografia no primeiro terço da gestação em cabras Saanen*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – Ceará. 54 pp.
- Van Aarde, R.J.; Potgieter, H.C.1986. Circulating progesterone, progesterone-binding proteins and oestradiol 17 β concentrations in the pregnant cape porcupine *Hystrix africaeaustralis*. *Journals of Reproduction & Fertility Ltd.*, 76: 561-567.
- Van Aarde, R.J.; Skinner, J. D. 1986. Functional anatomy of the ovaries of pregnant and lactating Cape porcupine, *Hystrix africaeaustralis*. *Journals of Reproduction & Fertility Ltd.* 76: 553-559.
- Varol, F.; Saltik, A.; Kaplan, P.B. 2001. Evaluation of gestational age based of ultrasound fetal growth measurements. *Yonsei Medical Journal*, 42: 299-303.
- Weir, B.; Rolands, I.W. 1974. Reproductive strategies of mammals. *Acta Review Ecology Systemic*, 4: 139-163.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM UM PLANTEL DE *PACAS* (*Cuniculus paca* L.) POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Caracterização da variabilidade genética em um plantel de *pacas* (*Cuniculus paca* L.) por meio de marcadores ISSR

RESUMO

A paca (*Cuniculus paca*) um dos maiores roedores existentes, é intensamente caçada por causa de sua carne e por esporte. Atualmente são criadas com sucesso em cativeiro devido o seu potencial econômico. Neste trabalho, a diversidade genética de um plantel de 48 pacas (*Cuniculus paca* L.) foi avaliada utilizando-se marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). Os marcadores foram eficientes na amplificação de DNA genômico de pacas. A partir de seis *primers*, foram gerados 50 locos polimórficos. Os valores da heterozigosidade esperada (H_E) variaram de 0.142 a 0.506, com média de 0.407. Entre as populações formadoras do plantel, a menor distância genética de Nei encontrada ocorreu entre Rio Branco-AC e Belém-PA (0.042). Tal fato pode ser resultante da base genética estreita nesta espécie. As análises de agrupamento demonstraram a tendência de formação de grupos entre indivíduos provenientes da mesma região geográfica. Os dados obtidos indicaram baixa variabilidade genética para a espécie e a necessidade de monitoramento genético dos reprodutores para planejamento de cruzamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Parâmetros genéticos, roedores, animal silvestre, marcadores moleculares.

Characterization of genetic variability of a paca (*Cuniculus paca* L.) population through ISSR markers

ABSTRACT

Paca (*Cuniculus paca*) is one of the largest living rodents and it is hunted intensively for sport and food. They are successfully kept in breeding farms, because of their economic potential. In this paper, the genetic diversity of a herd containing 48 pacas (*Cuniculus paca* L.) was evaluated using *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) markers. These markers were efficient in amplifying pacas DNA. From six primers used, it was generated 50 polymorphic loci. The values of expected heterozygosity (H_E) ranged from 0.142 to 0.506, with an average of 0.407. Considering the herd populations, the shortest Nei genetic distance was detected between Rio Branco-AC and Belém-PA (0.042). It could be resulted from the genetic strict base in this species. Clustering analysis detected a trend to group animals collected in the same geographic region. The data indicated low genetic variability in the species and the necessity of genetic monitoring for reproductive animals and for planned crosses.

KEYWORDS: Genetic parameters, rodents, wild animal, molecular markers

INTRODUÇÃO

Na América Latina, a paca (*Cuniculus paca* L.) está entre as espécies mais intensamente caçadas, principalmente por causa de sua apreciada carne (Santos, 1984; Deutsch e Puglia, 1988). É o segundo maior roedor neotropical (Matamoros, 1982; Oliveira *et al.*, 2009) e ocupam uma grande variedade de habitats desde a América Central até a América do Sul (Santos, 1984; Deutsch e Rodrigues, 1989). Quanto à dieta, a paca é considerada por muitos autores, como generalista em relação ao consumo de alimentos, consomem os frutos disponíveis em cada estação do ano (Perez, 1992), como herbívoros controla o crescimento das folhas de arbustos e herbáceas e é um dispersor de sementes (Montes, 2005).

Espécies da fauna brasileira, por exemplo, como a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), a paca (*Cuniculus paca*), e a ema (*Rhea americana*) sofrem com a caça predatória e a destruição de seus habitats, levando a diminuição progressiva das populações, e até mesmo risco de extinção em determinadas áreas (Hosken 1999).

A avaliação da variabilidade genética de uma espécie é um importante parâmetro para a definição de programas de manejo e conservação, principalmente para aquelas sob forte pressão antrópica. O conhecimento da variação genética intra-específica é fundamental para a utilização e conservação dos recursos genéticos naturais e da biodiversidade. Além disso, estes estudos geram informações sobre relações genéticas entre plantéis de reprodutores, possibilitando minimizar os efeitos deletérios do endocruzamento através do planejamento apropriado dos cruzamentos (Taberlet, 1998; Sekino *et al.* 2002).

Os marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramenta para estudos de diversidade genética entre indivíduos e entre espécies relacionadas (Souza *et al.*, 2008). Dentre os marcadores existentes, destacam-se os ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*, Zietkiewicz *et al.* 1994). Estes marcadores são amplificados por PCR em presença de um oligonucleotídeo complementar a um motivo microssatélite. Dentre as vantagens, destaca-se

que a sua utilização não requer informações prévias sobre o genoma da espécie, são altamente polimórficos, de baixo custo e abundantes ao longo do genoma de eucariontes (Fang e Roose, 1997; Esselman *et al.*, 1999). Marcadores ISSRs têm sido amplamente utilizados em estudos de genética de populações, detecção clonal e diversidade (Salimath *et al.*, 1995; Oliveira *et al.* 1996).

Há estudos sobre caracterização genética utilizando este marcador molecular em várias espécies de artrópodes (Reddy *et al.* 1999; Abbot, 2001; Lopes, 2008; Souza *et al.*, 2008), mamíferos (Kostia *et al.*, 2000; Almeida, 2008), e aves (Faria; 2006).

Com vistas ao exposto, este trabalho teve como objetivo verificar a diversidade genética em um plantel de pacas criadas em cativeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Foram analisados 48 indivíduos pertencentes ao plantel de pacas do Programa de Pesquisa e Criação de Animais Silvestres, situado na Fazenda Experimental Catuaba, de propriedade da Universidade Federal do Acre, no município de Senador Guiomard-AC. O plantel de pacas foi formado a partir de 17 indivíduos, sendo que quatro foram advindos de Belém-PA, um de Tarauacá-AC e 12 de Rio Branco-AC. A partir destes animais, 31 crias (gerações F₁ e F₂) foram obtidas, totalizando em 48 indivíduos amostrados em 2009.

Extração DNA Genômico:

Para extração do DNA foram utilizadas amostras de sangue dos 48 indivíduos formadores do plantel. Cerca de 2 mL de sangue foram coletados da veia safena. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C. O DNA de cada amostra foi extraído utilizando-se o kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. O DNA genômico foi quantificado em géis de agarose (1%) corados com brometo de etídeo.

Amplificação do DNA genômico por reações de PCR para ISSR

Os iniciadores 10Zm, 2Zm, 3Pv, 10Ps, 7Ps e 8Ps, desenvolvidos a partir de *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* e *Pisum sativum*, foram testados com relação a temperatura de anelamento e eficiência de amplificação. As reações de PCR foram otimizadas para 13 μL de volume final, contendo 10 ng de DNA; 1X de tampão (10 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl); 1.5 mM de MgCl₂; 2.30 μM dos iniciadores; 0,2 mg. μL^{-1} de BSA; 0,2 mM de dNTP e 0,1 U *Taq* polimerase (Phoneutria). Para os iniciadores 2Zm e 10Zm a concentração utilizada foi de 3.08 μM . As amplificações foram realizadas em termocicladores Biocycle MJ 96+ de acordo com as seguintes condições: 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 53 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Ao final do último ciclo, seguiu-se um período de extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram verificados em gel de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo. O tamanho dos fragmentos foi estimado com o padrão 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir da presença (1) ou ausência (0) de fragmentos amplificados, para cada indivíduo amostrado foram construídas matrizes binárias. Para análise da variabilidade entre as três populações formadoras do plantel utilizou-se o programa TFPGA (Miller, 1997). Foi estimada a distância e similaridade genética (Nei, 1978) e um dendrograma foi obtido a partir destes dados utilizando UPGMA (*Unweighed Pair Group Method Arithmetic Average*). A estabilidade dos agrupamentos foi testada pelo procedimento de reamostragem com 10,000 *bootstraps*.

O *software* Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.*,2000) foi utilizado para determinação dos agrupamentos genéticos (K) pela metodologia Bayesiana. A análise foi feita com o modelo “no admixture model”, assumindo que cada indivíduo procede de umas das K populações,

com cinco interações para cada K. Os resultados foram obtidos através de simulações de 20.000 períodos, seguidos de 20.000 repetições MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*). A escolha do melhor valor de K foi realizada de acordo com parâmetros definidos por Evanno *et al.* (2005).

ASPECTOS LEGAIS

Este trabalho foi realizado com autorização do Ministério do Meio Ambiente-MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, sob número 24669-1 (Autorização para atividades com finalidade científica).

RESULTADOS

Os marcadores ISSRs foram eficientes na amplificação de DNA genômico de pacas (Figura 1). Os seis iniciadores utilizados amplificaram 50 locos informativos. Os fragmentos variaram de 170 a 1650 pares de base (Tabela 1). Os valores da heterozigosidade esperada variaram de 0.142 a 0.506 com média de 0.407.

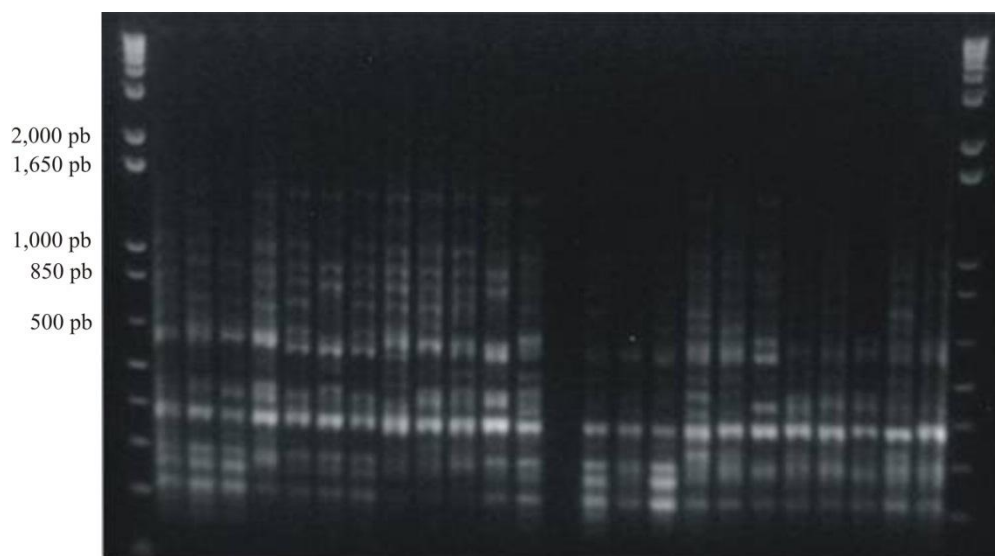


Figura 1 – Perfil de amplificação do marcador Zm2 em 24 amostras de *Cuniculus paca*, M = *Ladder*1Kb (Fermentas).

Tabela 1 - Sequência de iniciadores utilizados, número de locos encontrados, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos no estudo populacional de *Cuniculus paca* usando marcadores ISSR.

Iniciador Sequência (5' – 3')	Número de locos selecionados	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho dos Fragmentos (pb)
ISSR 2Zm CAC ACA CAC ACA CAC AGG	10	53	1600 1300 1000 850 750 500 420 300 200 - 170
ISSR 10Zm CAC ACA CAC ACA CAG TCC	08	52	1000 900 800 670 570 500 400 200
ISSR 3PV GAG AGA GAG AGA CAG ARG	05	52	850 700 600 550 170
ISSR 7PS AGA CAG ACA GAG AGA GYG	04	52	850 690 350 300
ISSR 8PS CAC ACA CAC ACA CAC ARY	11	50	1030 880 750 650 570 500 450 400 330 280 200
ISSR 10PS AGA GAG AGA GAG AGA GYT	12	50	1650 1500 1050 860 800 670 570 500 400 350 300 200
TOTAL	50		

A análise da similaridade e da distância genética entre as três populações originadoras do plantel (Tabela 2), revelou diferenciação entre estas populações. A maior distância genética (0.528) foi a que ocorreu entre a população de Rio Branco-AC e Tarauacá-AC.

Tabela 2 – Matriz de similaridade e distância genética entre três populações de *Cuniculus paca*

População	Rio Branco-AC	Belém-PA	Tarauacá-AC
Rio Branco-AC	*****	0.042	0.528
Belém-PA	0.958	*****	0.385
Tarauacá-AC	0.589	0.683	*****

Valores acima da diagonal correspondem à distância genética não enviesada e abaixo da diagonal correspondem à identidade genética não enviesada (Nei, 1978)

A partir dos dados de distância genética de Nei, foi construído um dendrograma (Figura 2) com o método UPGMA, que agrupou as populações em dois *clusters*. O primeiro formado pela população de Rio Branco-AC e Belém-PA e o segundo pela população de Tarauacá-AC. O índice de consistência para o *bootstrapping* para 10.000 replicações foi de 100%.

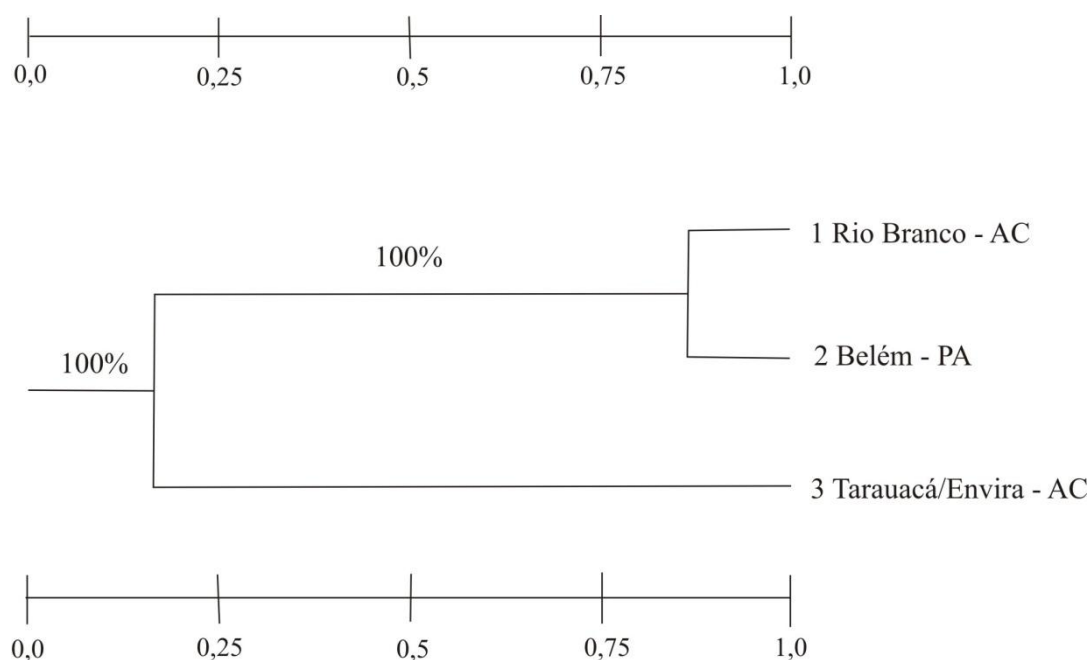


Figura 2 – Dendrograma agrupando populações de *Cuniculus paca* de Rio Branco-AC, Belém-PA e Tarauacá-AC com base na similaridade genética. Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética - UPGMA (Nei, 1978).

O dendrograma com os 48 genótipos de pacas (Figura 3), demonstrou a existência de agrupamentos por similaridade (Nei, 1978) e estes ocorreram de acordo com a proximidade genética e geográfica e entre os indivíduos. Os que possuem maior similaridade genética são os que compõem predominantemente os animais coletados em Rio Branco - Acre, e seus descendentes (F1 e F2). Os indivíduos procedentes de Belém – Pará e da região de Tarauacá/Acre- Envira, bem como o restante dos animais nascidos no criatório, permaneceram em ramos distintos dentro do agrupamento, sendo estes os que apresentaram maior distanciamento genético dos demais componentes do plantel, com exceção do indivíduo 10.

A correlação cofenética ($r = 78\%$) entre os dados de dissimilaridade e as matrizes fenéticas obtidas pelos UPGMA demonstra a confiabilidade do dendrograma obtido. A similaridade genética entre os 48 indivíduos variou entre 0.76 e 0.99. A maior similaridade encontrada (0.99), entre os indivíduos 40 e 36, refere-se aos descendentes (F₁ e F₂) de um mesmo ancestral (indivíduo 12). Os parâmetros genéticos gerados pelo “structure” revelaram a tendência de agrupamentos entre indivíduos de uma mesma região geográfica e identificou dois *pools* gênicos (Figura 4).

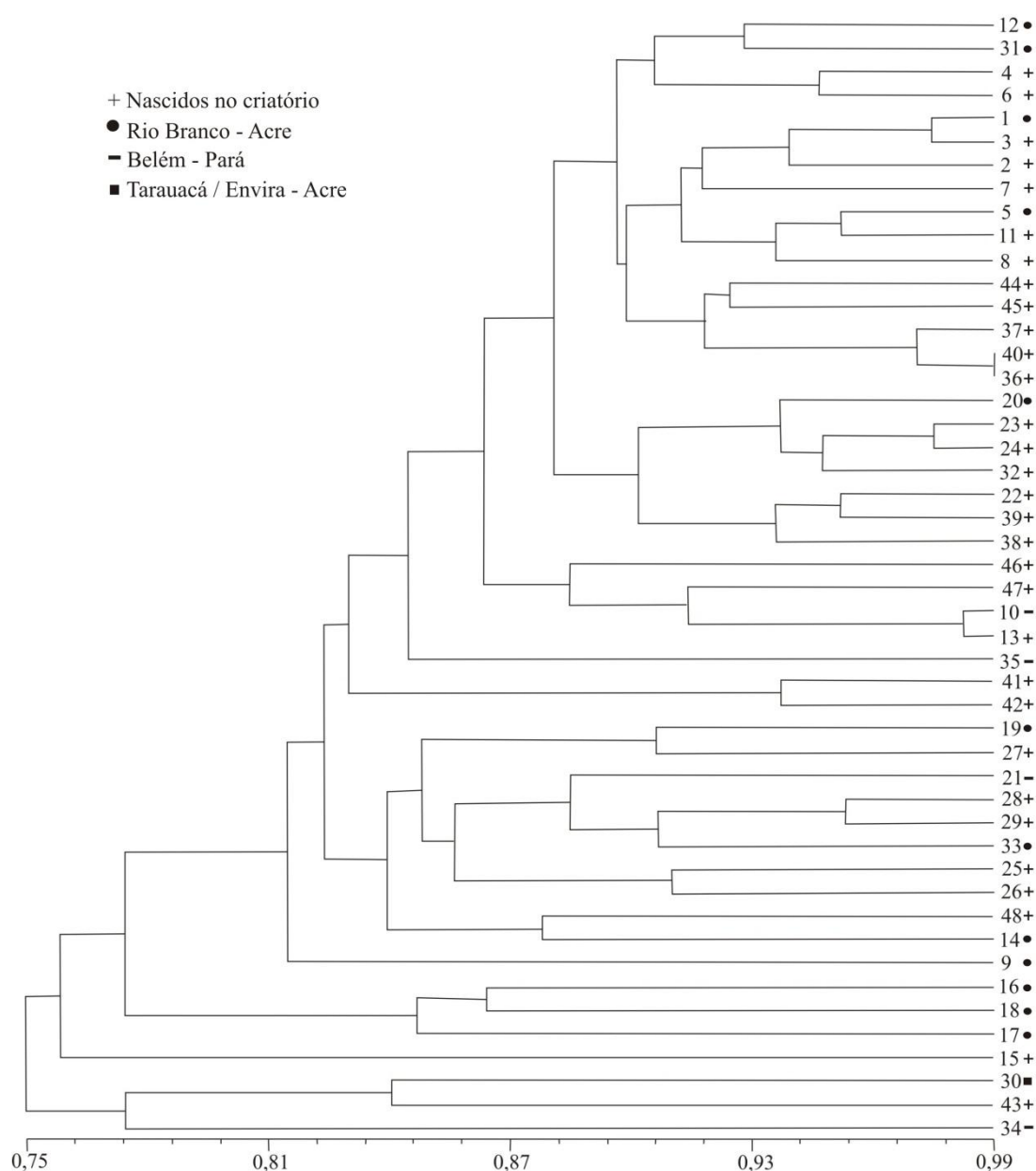


Figura 3- Dendrograma obtido a partir da análise de ISSRs com 48 genótipos de *Cuniculus paca*, utilizando o índice de similaridade de Nei (1978) e o método de agrupamento UPGMA.

DISCUSSÃO

O número de locos informativos (50) encontrados foi próximo ao descrito por Almeida (2008), que obteve 55 locos a partir de 5 ISSRs. Spritze *et al.*(2003) utilizaram 43 iniciadores e obtiveram 77 bandas polimórficas. Segundo estes autores, o número de regiões polimórficas obtidas por marcador varia de acordo com a população estudada.

A distância genética de Nei entre as populações de Rio Branco-AC e Belém-PA foi baixa (0.042) e tal fato pode ser decorrente de uma base genética estreita da espécie em geral. Estes dados corroboram com o estudo de Antunes *et al.* (2010), que também detectaram baixos valores de distância genética em populações de *C. paca*. Considerando a estreita base genética das pacas estudadas, é recomendável a introdução de reprodutores capturados em áreas florestais, para que haja um aumento da variabilidade genética do plantel. Estes dados, conforme observou Antunes (2006), demonstram a importância de troca de reprodutores entre fazendas de criação destes animais, como forma de manter a integridade genética da espécie. Endocruzamentos podem ser deletérios, mas podem ser evitados quando há um suporte genético. Por exemplo, as gerações F1 e F2 dispersas no dendrograma (Figura 3), podem ser usadas como reprodutores desde que as distâncias genéticas sejam observadas. A amostragem em Tarauacá-AC foi reduzida e tal fato pode ter causado um desvio, superestimando as distâncias genéticas (0.528 e 0.385) em relação às outras populações.

A análise bayesiana do Structure assumiu o modelo de $K = 2$ populações, o que também indica a baixa diversidade de *pools* gênicos formadores da estrutura genética na amostragem de *C. paca*. O reduzido número de populações encontradas corrobora com a baixa distância genética observada.

O histograma (Figura 4) e o dendrograma (Figura 3) agruparam o indivíduo 10 proveniente de Belém do Pará, no grupo dos indivíduos de Rio Branco-Acre. O indivíduo 10 apresentava diferenças fenotípicas em relação a seu grupo, sendo um animal mais longilíneo e de coloração mais clara que as demais. A observância dos agrupamentos genéticos relacionados com a procedência dos indivíduos, foi também verificada em cabras por Pariset, *et al.* (2006) e em pacas por Montez-Pérez *et al.* (2006) e Antunes *et al.* (2010).

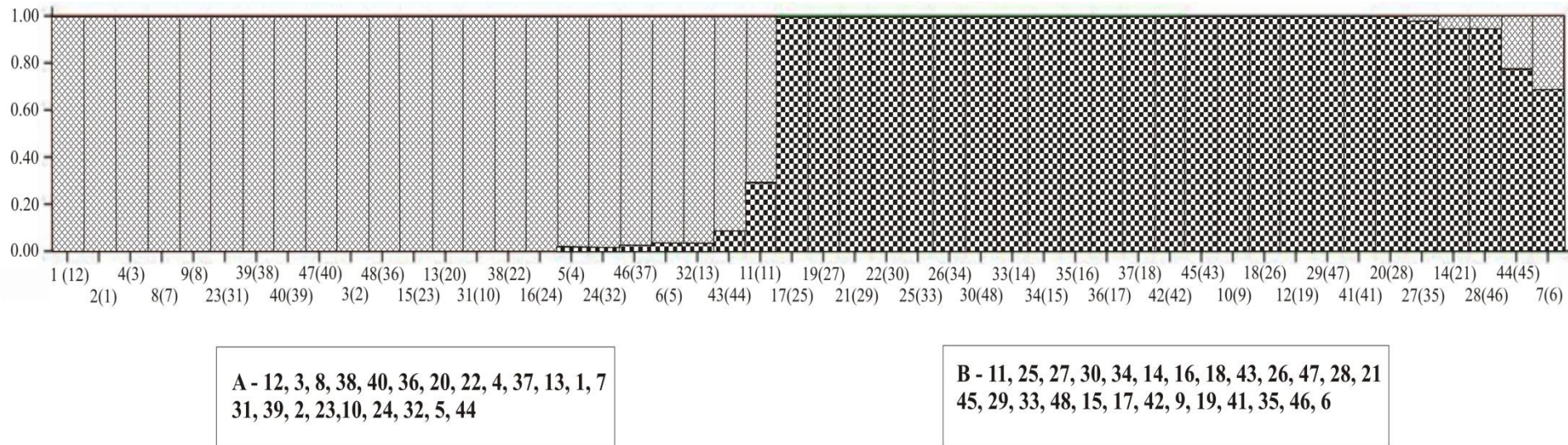


Figura 4 - Histograma dos 48 indivíduos de *Cuniculus paca* com a composição dos *pools* gênicos dos grupos obtida pela análise do Structure, sob a observância do $K = 2$. Cada indivíduo está representado por uma linha vertical dividida em $K = 2$ segmentos, com comprimentos proporcionais a cada inferido *pool*.

Pérez (1992) relata que a *Cuniculus paca* possui cinco subespécies, duas das quais presentes no Brasil. Através de comunicação pessoal, populações ribeirinhas no Estado do Acre relatam três diferentes fenótipos de paca: “Acaju” (coloração avermelhada e de tamanho menor), “Concha” (são maiores, de coloração amarronzada e ganachas proeminentes) e o tipo “Mirim” (coloração amarronzada e bem menor que as anteriores). O indivíduo 10 apresentou-se fenotipicamente próximo ao tipo “Acaju.” Desta forma, sugere-se mais estudos com enfoque na classificação taxonômica destes grupos. Destaca-se para isto, a região ocidental da Amazônia, uma vez que nesta região não foram efetuados estudos por Pérez (1992).

A avaliação de variabilidade genética de uma espécie é um importante parâmetro para a definição de programas de manejo e conservação, principalmente para aquelas sob forte pressão antrópica (Ciampi *et al.*, 2007). Os resultados obtidos permitem propor estratégias de melhoramento genético, uso e conservação desta espécie silvestre com potencial zootécnico, pois as distâncias genéticas podem ser utilizadas para programação dos cruzamentos mais divergentes, explorando a base genética existente. Entretanto, para resultados mais conclusivos com relação à distância genética obtida entre a população formadora deste plantel de pacas, é necessário ampliar o número de amostragens.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Abbot, P. 2001. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*, 1.8 (insectscience.org/1.8). Acesso em: 9/12/2010.

Almeida, G.M. 2008. *Caracterização Genética da Raça Pé-duro utilizando microssatélites ancorados*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí. 92 pp.

- Antunes, K.V., Machado, T.M.M., Serão, N.V.L., Guimarães S.E.F., Paiva, S.R. 2010. Genetic diversity of captive spotted paca (*Agouti paca*) from south east Brazil assessed by the RAPD-PCR technique. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39: 268-272.
- Ciampi, A.Y.; Sujji, P.S.; Alegria, M.R. de M. 2007. Análise genética em populações *trithrinax brasiliensis* Mart. utilizando marcadores moleculares RAPD. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 558-560.
- Deutsch, L.; Puglia, R.R. 1988. *Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo*. Rio de Janeiro: Globo. 187 pp.
- Deutsch, L.; Rodrigues, S. 1989. Paca. *Revista Globo Rural*, 43: 58-61
- Esselman, E. J.; Jiangiag, L.; Crawford, D.J; Winduss, J.L.; Wolf, A. D. 1999. Clonal Diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Insuperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 8: 443-451.
- Evanno, G.; Regnaut, S; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2.611-2.620.
- Fang, D.Q.; Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with Inter Simple Sequence Repeats Markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 408-417.
- Faria, P.J.; Miyaki, C.Y. 2006. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae (Psittaciformes, Aves). *Genetics and Molecular Biology*, 29: 231-240.
- Hosken, M.F. 1999. Criação de pacas. Cuiabá: SEBRAE/MT, 178 pp.

- Kostia S.; Ruohonen-Lehto M; Vainola R, Varvio S. L. 2000. Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the Artiodactyla and evolution of the Bov-tA SINE. *Heredity*, 84: 37-45.
- Lopes, D.M. 2008. *Análises moleculares em Melípona rufiventris e Melípona monduri* (Hymenoptera: Apidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 96 pp.
- Matamoros, Y. 1982. Notas sobre la biología del tepezcuinte, *Cuniculus paca*, Brisson (Rodentia: Dasyproctidae) em cativeiro. *Brenesia*, 20: 71-82.
- Montes, R. C. 2005. El tepezcuintle, un recurso biológico importante. *CONABIO Biodiversitas*. 63: 6-10
- Montes - Pérez, R.C.; Garcia, A. W.E.; Castro, J.Z; Gamboa, G.A. 2006 Variaciones nucleotídicas de dos grupos de tepezcuintles, *Agouti paca* (Rodentia: Agoutidae), en cautiverio provenientes de dos localidades de Yucatán, México. *Revista de Biología Tropical*, 54: 911-917.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, version 1.3. Northern Arizona University, Arizona.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Oliveira, A. C.; Richter, T.; Bennetzen, J. L. 1996. Regional and racial specificity in sorghum germplasm accessed with DNA markers. *Genome*, 39: 579-587.

Oliveira, F.S.; Martins, L.L.; Pauloni, A.P.; Machado, M.R.F.; Toniollo, G.H.; Canola, J.C. 2009. Descrição Anátomo-Radiográfica do esqueleto axial da cutia (*Dasiprocta azarae*, LICHTENSTEIN,1823).*ARS Veterinária*, 25: 24-27.

Pariset, L.; Cappuccio, I.; Ajmone Marsan, P.; Dunner, S.; Luikart, G.; England, P.R.; Obexer-Ruff, G.; Peter, C.; Marletta, D.; Pilla, F.; Valentini, A. 2006. Assessment of population structure by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in goat breeds. *Journal of Chromatography B*, 883: 117-120.

Pérez, E. M. 1992. Mammalian Species: *Cuniculus paca*. *The American Society of Mammalogists*, 404: 1-7.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.

Reddy, K.D.; Nagaraju, J.; Abraham, E.G., 1999. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity*, 83: 681-687.

Santos, E. 1984. Entre o gambá e o macaco: vida e costume dos mamíferos do Brasil. Belo Horizonte: Itatiaia, 264 pp.

Salimath, S.S.; Godwin, I.D.; Bennetzen, J.L. 1995. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome*, 38: 757-763.

Sekino, M.; Hara, M.; Taniguchi, N. 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 213: 101-122.

Souza, G.A.; Carvalho, M.R.O.; Martins, E.R.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, L.O. 2008. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 843-849.

Spritz, A.; Egito, A.A.; Mariante, A.S.M.; Mcmanus, C. 2003. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 1.157-1.164.

Taberlet, P. 1998. Biodiversity at the intraspecific level: the comparative phylogeographic approach. *Journal of Biotechnology*, 64: 91-100.

Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caça, a pesca e a domesticação de animais ocorrem desde os primórdios da humanidade até os dias atuais, fazendo parte da cultura e muitas vezes da necessidade de sobrevivência dos povos que habitam a floresta, sendo os seus produtos a principal fonte de proteína animal para índios e extrativistas. Entretanto, a caça é também efetuada por produtores rurais como forma de diversificação da alimentação, sendo o excedente levado à cidade para comercialização como forma de suprir a demanda do mercado de carnes exóticas. Além disso, existe ainda a caça esportiva realizada frequentemente por moradores das cidades e o tráfico de animais silvestres. Estes fatores associados a constante depredação de reservas florestais pelo homem levam a redução ou mesmo ao esgotamento populacional de espécies, principalmente aquelas mais procuradas.

Atualmente, a criação de animais silvestres para fins comerciais em muitos países da América latina apresenta-se como uma alternativa para suprir a necessidade cada vez mais crescente pela demanda de carne de caça, sendo também, uma solução benéfica do ponto de vista ecológico, uma vez que não há necessidade de grandes alterações ambientais para sua produção, tendo em vista o fato desses animais serem nativos de florestas tropicais, estarem adaptados às condições climáticas e aos alimentos disponíveis localmente. Desta forma, é possível o aproveitamento econômico das áreas abandonadas e/ou degradadas e, com isso, evitar o desmatamento das áreas florestais.

Há que se levar em conta, entretanto que, para algumas espécies (a exemplo da paca) a criação comercial pode ser desencorajada por requerer investimentos expressivos na instalação e manutenção dos criatórios, associado ao tempo necessário para obtenção de retorno econômico, em função da baixa taxa reprodutiva, ainda que diversos estudos constatem ser a criação desta espécie uma atividade economicamente viável. Assim sendo, a

aplicação de biotécnicas reprodutivas já estabelecidas em espécies domésticas na superação de índices biológicos, passa a ter papel primordial nesta questão.

O controle da reprodução também propicia a antecipação do período de reprodução em animais sujeitos a estacionalidades reprodutivas ou mesmo em períodos pré puberais; diminui os períodos improdutivos; aumenta a prolificidade e o incremento do progresso genético. É imprescindível, porém, que haja rigoroso planejamento dos cruzamentos para que assim as endogamias e seus fatores deletérios não ocorram por perda da variabilidade genética do plantel.

É sabido, no entanto, que o uso de técnicas de reprodução assistida para conservação de espécies silvestres se dá ainda em passos lentos devido a diversos fatores como, por exemplo: fonte limitada de recursos para pesquisas, pouco conhecimento sobre a anatomia e fisiologia reprodutiva de muitas espécies bem como estudo do comportamento das mesmas.

Dentro deste contexto, os resultados apresentados neste trabalho mostram-se promissores não só para os potenciais criadores bem como para o futuro da espécie *Cuniculus paca* L., uma vez que:

A) As fêmeas estudadas responderam de forma satisfatória às dosagens de progestágenos utilizados, demonstrando ser possível manipular o ciclo estral nesta espécie e que, provavelmente, 50 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina, estimulam o desenvolvimento e amadurecimento de folículos ovarianos, proporcionando ovulações múltiplas que resultaram em partos gemelares. Além disso, as crias nascidas após indução hormonal demonstraram ser saudáveis e as fêmeas submetidas aos tratamentos hormonais não apresentaram distúrbios reprodutivos ou de qualquer outra natureza, após a utilização dos mesmos.

É de fundamental importância, entretanto, que novos estudos sejam efetuados no sentido de se avaliar novas dosagens e combinações de progestágenos e gonadotrofinas, com um número maior de exemplares, testar novos protocolos, mas principalmente que, seja

avaliada a capacidade do macho em servir mais de uma fêmea durante o curto período de estro.

O sucesso de um programa de indução e sincronização de cio se dá pelo número de fêmeas em estro e cobertas em um determinado período de tempo, mas especialmente, pelo número de crias obtido após o mesmo. Para isto, é necessário que os machos utilizados sejam de comprovada fertilidade e que tenham a capacidade de fertilizar o maior número de fêmeas durante o período de aceite da monta ou que se utilize a técnica de inseminação artificial. Esta última técnica, entretanto, ainda não está bem estabelecida nesta espécie.

B) Os estudos para determinação da idade gestacional onde foram utilizadas a biometria fetal (diâmetro biparietal), citologia vaginal esfoliativa, e as dosagens de progesterona aos 30, 60 e 90 dias de prenhez, mostraram-se efetivos a este propósito. Entretanto, é importante um acompanhamento mais amigável do período gestacional, para que se tenham resultados mais conclusivos da relação destes parâmetros com as diferentes idades gestacionais da paca.

C) O uso dos marcadores ISSR neste estudo mostrou-se eficiente na amplificação e determinação da diversidade genética do plantel de *Cuniculus paca* L estudado, o que proporcionará um melhor manejo reprodutivo neste criatório.