

**MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO
TECNOLÓGICO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS**



**Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos
(*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)**

**Glycosaminoglycans in the production events of collared peccaries
(*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)**

Renovação de Bolsa Produtividade 1D – Chamada 06/2019

MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA

Coordenador: Moacir Franco de Oliveira, Dr.
Correio Eletrônico: moacir@ufersa.edu.br
Telefone comercial: (84) 3317 8274 (DCAN/UFERSA)
Telefone celular: 84 9986-8660

Mossoró-RN, 2019

IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

Título:

Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

Instituição Executora:

Laboratório de Morfofisiologia Aplicada – LABMORFA
Responsável Técnico: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira
Universidade Federal Rural do Semi Árido – UFERSA, Campus de Mossoró
Endereço: Avenida Francisco Mota, 572 - Km 47 da BR 110, Bairro Presidente Costa e
Silva, Mossoró-RN
CEP: 59625-900 Fone: (84) 3317 8274

Instituições Parceiras:

Laboratório de Morfofisiologia e Microscopia - Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia – FMVZ / Universidade de São Paulo – USP
Responsável Técnico: Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, Bolsista Produtividade
CNPq
Endereço: Av. Profº. Dr. Orlando Marques de Paiva, Cidade Universitária, Bairro
Butantã, São Paulo-SP
CEP: 05.508-270 Fone: (11) 3091-7690

Laboratório de Bioquímica
Universidade Federal do Rio grande do Norte
Responsável Técnico: Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, Bolsista
Produtividade CNPq
Endereço: Av. Salgado Filho 3000 - Campus Universitário, Lagoa Nova
CEP: 59072-940 - Natal, RN Fone: (84) 32153416 (Ramal 207)

AREA DO CONHECIMENTO PREDOMINANTE

- a) Medicina Veterinária
- b) Clínica Veterinária

Renovação de Bolsa Produtividade 1D – Chamada 06/2019

Temos em curso com base no processo 306697/2015-7 o projeto “Glicosaminoglicanos no estro e gestação de ovinos da raça Morada Nova (Ovis Aries)”. Deste projeto resultaram uma orientação em nível de doutorado, um trabalho de conclusão de curso (TCC) e uma iniciação científica do tipo PIBIC. A tese de doutorado está para ser finalizada em até março de 2020. O TCC será finalizado já em agosto de 2019 e a orientação de IC foi finalizada em 2018. Foram submetidos dois artigos e um está em elaboração. Todas as etapas previstas no projeto foram desenvolvidas e realizadas dentro do cronograma previsto. No momento estamos finalizando a fase de identificação dos GaGs com base em tese de doutorado de discente do Programa de Pós-Graduação e Ciências Animal. Contribuiu para isto os recursos de bancada concedido pelo CNPQ.

PERFIL DO COORDENADOR DA PROPOSTA - BOLSISTA PRODUTIVIDADE

De forma a situar os pareceristas *ad hoc* e o próprio comitê de área do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico quanto ao perfil do coordenador da proposta que está sendo encaminhada, apresenta-se a seguir um pequeno *release* curricular do mesmo.

Nossas atividades na Universidade Federal Rural do Semi-Árido estão vinculadas à administração, como Pró-reitor Adjunto de Planejamento e a aulas de graduação e de pós-graduação nos cursos de Medicina Veterinária, agronomia e no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Desde a conclusão do curso de doutorado pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, temos trabalhado com modelos de placentação de diferentes espécies e mesmo com outros temas da Morfofisiologia, o que proporcionou-nos várias publicações de artigos em periódicos nacionais e internacionais com demanda qualificada, assim como resumos em eventos nacionais e internacionais.

Estas publicações resultaram de projetos de pesquisa e orientações de alunos de graduação, em nível de iniciação científica e de trabalhos de conclusão de curso e de pós-graduação em nível de mestrado e de doutorado.

No período de 2004 a 2019 foram publicados cerca de 180 artigos nacionais e internacionais resultantes de orientações de 08 monografias, 18 iniciações científicas, 15 orientações de mestrado e 08 orientações de doutorado, sendo que três orientações de mestrado e três de doutorado estão em andamento. Neste período também orientamos 02 alunos em nível de pós-doutorado.

Nossos trabalhos estão vinculados, especialmente, a área da Morfofisiologia envolvendo modelos reprodutivos de machos e de fêmeas, em função de formação em nível de doutorado, mas também estão relacionados à biotécnicas em função da linha de pesquisa que integramos no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, denominada Morfofisiologia e Biotecnologia Animal. Neste sentido, têm sido produzido pesquisas envolvendo preservação de sêmen, oocistos, modelos de placentação e Morfofisiologia de estruturas componentes dos sistemas reprodutor do macho e da fêmea.

Assim, para que possa ser identificada essa produção, faz-se referência a mesma com finalidade de permitir que os avaliadores identifiquem mais facilmente o que está

sendo produzido, destacando-se que foi considerado apenas as orientações e produção dos dez últimos anos. **Destacando-se que a referência à nossa produção como um todo está especificada no item da proposta, observando o que estabelece a Chamada/CNPq 06/2019.**

Como resultado dessas orientações e dos projetos de pesquisas desenvolvidos pelo proponente do total de artigos publicados, como já referenciado, 104 artigos foram produzidos no período de 2014 a 2019, o que representa uma média de 20,8 artigos/ano, dos quais estão apresentados àqueles considerados mais relevantes, pois são resultados das ações que temos desenvolvido para consolidação das ações de pesquisas, voltadas a mantermos nossa produção de qualidade e ainda de modo a demonstrar que nossas pesquisas têm produzido artigos que são aceitos pela comunidade científica. Esta produção tem aferido, conforme Google Acadêmico, um Índice H igual 46 se considerado toda nossa produção e um índice de 31 se considerado 2014 a 2019. Também pode ser verificado nesse site, que nossa produção é crescente desde 2012.

Assim, de modo a permitir que seja observada nossa produção com temas objeto da bolsa produtividade estão apresentadas a seguir alguns trabalhos objeto do tema com glicosaminoglicanos além de outros artigos objeto outras abordagem e mesmo artigos produzidos em parceria.

- Orientações em nível de mestrado e de doutorado – Formação de Recursos Humanos

1 - André Menezes do Vale. Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). Início: 2011. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

2 - Carlos Magno Oliveira Júnior. Morfologia das Glândulas Salivares Maiores em Catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1766). Início: 2014. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

3 - Carlos Magno Oliveira Júnior. Morfologia das Glândulas Salivares Maiores em Cutias (*Dasyprocta aguti tajacu* Linnaeus, 1758). Início: 2012. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

4 – Felipe Venceslau Câmara. Morfologia da glândula pineal de preá (*Galea spixii* wagler, 1831) e cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). Início: 2013. Tese (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

5 - Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra. Alterações morfológicas na placenta e no ovário de preás (*Galea spixii* wagler, 1832) aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Início: 2014. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

6 - Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra. A subplacenta do Preá (*Galea spixii* Wagler, 1831). Início: 2012. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

7 - Gleidson Benevides de Oliveira. Desenvolvimento placentário em cutias (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1756). Início: 2010. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador). Concluída.

8- Herson da Silva Costa. Morfologia do encéfalo de emas (*Rhea americana americana* Linnaeus, 1758). Início: 2016. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Moacir Franco de Oliveira). Concluído (2018).

9 - Herson da Silva Costa. Morfologia do sistema reprodutor feminino, placentação e glicosaminoglicanos em ovinos da raça Morada Nova (*Ovis aries*) ao longo do terço inicial da gestação. Início: 2018. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Moacir Franco de Oliveira). Andamento.

10 - João Paulo Araújo Fernandes de Queiroz. Dinâmica térmica em (*Galea spixii* wagler, 1831) e cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). Início: 2012. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

11 - Júlio Cesar dos Reis Saraiva. Vascularização do Encéfalo do Cateto (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). Início: 2013. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

12 – Radan Elvis Matias de Oliveira. Morfologia e achados anatomopatológicos do aparelho digestório de tartarugas marinhas (Testudines) encalhadas na Bacia Potiguar, Brasil. Início: 2018. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador). Andamento.

Resultaram de temas diretamente relacionados ao objeto da vigente, até o momento, as orientações e artigos seguintes, mas destacando-se que se encontra em andamento uma tese de doutorado, um trabalho de conclusão de curso e foi concluída uma orientação de iniciação científica e que três artigos estão sendo elaborados para submissão, conforme especificado a seguir:

1 - Desenvolvimento embrionário e fetal, anexos extra-embrionários e glicosaminoglicanos no aparelho reprodutor e na placenta de ovinos da raça Morada

Nova ao longo do terço inicial da gestação. Projeto de doutorado do discente Herson Costa da Silva. Em andamento.

2 - Costa, Herson da Silva; Câmara, Felipe Venceslau; Pereira, Alexandra Fernandes; Silva, Alexandre Rodrigues; Miglino, Maria Angélica; Oliveira, Moacir Franco. Placentation and glycosaminoglycans in the female reproductive tract and placenta of ruminants. **Acta scientae veterinae** - Submetido

3 - Costa, Herson da Silva; Bezerra, Ferdinando Fernandes Vinicius; Câmara, Felipe Venceslau; Moura, Carlos Eduardo Bezerra de, Pereira, Alexandra Fernandes; Silva, Alexandre Rodrigues; Miglino, Maria Angélica; Oliveira, Moacir Franco de. Embryonic and fetal development in Morada nova ewes (*Ovis aries*) – **Journal Morphology** - Submetido.

4 - Araújo Júnior, Hélio Noberto; Costa, Herson da Silva; Tertulino, Moisés Dantas; Oliveira, Moacir Franco de. Morfologia do sistema reprodutivo feminino e placentação de ovinos morada nova (*Ovis aries*) Em elaboração.

5 - Araújo Júnior, Hélio Noberto; Costa, Herson da Silva; Tertulino, Moisés Dantas Câmara, Felipe Venceslau; Oliveira, Moacir Franco de. Morfologia do sistema reprodutivo feminino e placentação de ovinos morada nova (*Ovis aries*). A ser apresentado no XXIV Seminário de Iniciação Científica (SEMIC/UFERSA), 2018.

No momento a tese de doutorado encontra-se em fase final de experimentação, especificamente com GAGs de modo que pelo menos mais três artigos envolvendo o perfil dos Gags, hormônios e placentação serão desenvolvidos de modo a dar cumprimento as metas definidas no projeto da bolsa de produtividade em andamento. A parte relativa à extração de GAGs, trata-se de uma linha de pesquisa nova introduzida por nós quando da aprovação de nossa bolsa produtividade, desde 2013 e cujo desenvolvimento das técnicas é dependente de acompanhamento de ciclos estrais e períodos gestacionais, o que requer maior tempo para obtenção de resultados conclusivos e que foram bastante influenciados pela escassez de chuvas ao longo dos dois últimos anos na região Nordeste, mas que já se encontram em fase de extração e identificação.

Um fator que tem contribuído para o sucesso de nosso grupo de pesquisa tem sido a possibilidade de executar projetos financiados. Desde a nossa qualificação como doutor coordenamos projetos envolvendo modelos de placentação financiados pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Norte, por meio do edital primeiros projetos, onde foram desenvolvidas pesquisas com o modelo de placentação de *Galea spixii*, cujo trabalho publicado recebeu prêmio internacional, durante International Federation of Placenta Associations – IFPA/2008; coordenamos também projetos financiados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico aprovados por meio de editais Universal (Identificação de glicosaminoglicanos durante o ciclo estral e gestação de roedores: cutias, mocós e preás; Modelo de inversão do saco vitelino de roedores hystricomorfos cutia e preás; Glicosaminoglicanos em modelos de placentação de roedores do semiárido: cutias – *Dasyprocta leporina* e preás – *Galea spixii*) e coordenamos ainda as ações do projeto aprovado por meio do edital Casadinho/Procad – Chamada 2011, intitulado “Integração de Programas de Pós-Graduação em Medicina Veterinária: Consolidação da Pós-Graduação em Ciência

Animal do Semiárido Nordeste” que proporcionou a melhoria do quantitativo e qualidade das publicações do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA, bem como proporcionou o estabelecimento de parcerias com os Programas de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres e o de Cirurgia, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, garantindo, também, a melhoria da infraestrutura dos programas de forma conjunta, pela aquisição de equipamentos e mesmo das publicações entre os programas, como já referenciado.

Por último, destaca-se que a proposta que se apresenta tem como intuito dar continuidade a linha de pesquisa com modelos reprodutivos de fêmeas envolvendo estruturas e aspectos da reprodução como o útero, a tuba uterina, a placenta, ciclo estral (estro), entre outros, inferindo por meio da identificação de GAGs, aspectos morfofuncionais da reprodução, conforme descreve o objetivo principal estabelecido no projeto, mas sobretudo fortalecerá os grupos de pesquisas dos quais fazemos parte envolvendo dados modelos de placentação, Morfofisiologia, desenvolvimento, entre outros aplicados a animais de produção e a animais silvestres. Destaca-se que, já desenvolvemos pesquisas com o tema em cutias, preás e atualmente temos projeto com Gags em ovelhas da raça Morada Nova. Desse modo, entendemos que o projeto que estamos submetendo “*Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos Pecari tajacu Linnaeus, 1758*” como proposta de renovação de bolsa de produtividade em pesquisa, fica respaldado quanto a sua possibilidade de execução. Nestes animais temos desenvolvidos vários trabalhos com morfofisiologia e fisiologia da reprodução ((Miranda-Moura, et al., 2016.; Santos, et al., 2016; Borges, et al., 2017 e 2018; Bolina, et al., 2018; Queiroz Neta, et al., 2018; Bezerra, et al.,2019; Maia, et al., 2019), mas ainda continuam em aberto pesquisas, que envolvem os eventos que ocorrem na matriz extracelular dos tecidos reprodutivos sejam quanto as fases do ciclo estral, seja quanto ao período gestacional, razão pela qual estamos submetendo a proposta, por entender que para definição do *status* zootécnico de uma espécie há a necessidade de ter conhecimento do maior número possível de informações sobre os eventos reprodutivos, a fim de que as atividades de manejo sejam realizadas adequadamente.

DADOS DO PROPONENTE E EQUIPE

- a) Pesquisador – Coordenador: Moacir Franco de Oliveira – Professor Associado da UFERSA Responsável-Técnico Aplicada pelo Laboratório de Morfofisiologia e pelo Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da UFERSA. Doutor em Ciências (Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) pela FMVZ/USP, Brasil. Tem larga experiência com a linha de placenta e placentação de animais domésticos e silvestres e esta buscando novas implementações para a linha de pesquisa, de forma a torná-la mais aplicada;
- b) Antônio Chaves de Assis Neto – Professor Doutor do Departamento Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo/Colaborador; CPF: 746.406.073-34; E-mail: neto.antonioassis64@gmail.com. O colaborador tem larga experiência com imunohistoquímica. Por seu intermédio realizamos parte das atividades de nossas atividades imunohistoquímica na FMVZ/USP;

- c) Alexandre Rodrigues Silva – Docente do Departamento de Ciências Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA/Colaborador; CPF: 702.982.543-87; E-mail: alexrs@ufersa.edu.br. Tem despontado como excelente pesquisador na área de reprodução e passará a compor nosso grupo de pesquisa com morfologia de animais silvestres. O mesmo tem graduação e doutoramento realizado na Universidade Estadual do Ceará, integra o programa de pós-graduação em ciência animal da UFERSA, com disciplinas nas quais somos colaborador;
- d) Alessandra Fernandes Pereira – Professora Doutora do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde - Centro de Biociências da Universidade Federal Rural do Semi-Árido/Colaboradora; CPF: 913.071.983-68; e-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br. A colaboradora tem experiência em morfofisiologia de animais domésticos e silvestres, atuando na área de quantificação morfológica, trabalhando com técnicas de extração e cultivo celular.
- e) Ferdinando Vinicius Fernandes Bezerra (008.354.344-94) – Médico Veterinário, Pós doutorando vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal PPCA/UFERSA, sob nossa orientação, que estará envolvido com atividades de co-orientação de alunos de graduação em subprojetos oriundos desta proposta, bem como auxiliará pós-graduados na execução de atividades de laboratório, junto ao projeto, dentre outras. E-mail: Ferdinando_vinicios@hotmail.com.
- f) Gleidson Benevides de Oliveira (013.586.734-70) – Médico Veterinário com título de doutor e egresso do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal PPCA/UFERSA, que estamos propondo a inserção do mesmo no projeto como bolsista de auxílio técnico, auxiliando alunos envolvidos na proposta com atividades de coleta e processamento de material. E-mail: gleidson_benevides@hotmail.com.
- g) Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa (06116654339) e Moisés Dantas Tertulino (07491656420) – Acadêmicos em medicina veterinária da Universidade e, que estão iniciando atividades de iniciação científica sob nossa orientação, que serão beneficiados com projetos de pesquisa em forma de subprojetos objeto desta proposta. E-mail: carolfreitas04@outlook.com e moises.tertulino@gmail.com, respectivamente. Participarão da proposta desenvolvendo trabalhos de iniciação científica.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Para execução da proposta estarão envolvidas a Universidade Federal Rural do Semi-Árido, instituição a qual está vinculado o proponente e coordenador da proposta e as seguintes instituições como parceiras:

- a) A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para fins de realização das atividades de pesquisas que envolvem microscopia eletrônica de transmissão;

b) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, com a finalidade de treinarmos os alunos em técnicas de extração de Glicosaminoglicanos e desenvolvermos parte dos experimentos.

RESUMO

O Semiárido brasileiro ocupa uma parcela relevante da Região Nordeste do Brasil, onde as adversidades ambientais provocam sérias limitações no processo produtivo das populações, desse modo ações que ressaltem estrategicamente sua importância e o desenvolvimento de pesquisas que forneçam informações acerca de animais de produção, visando o desenvolvimento científico, tecnológico e sustentabilidade desse ambiente deve ser sempre objeto de ações públicas. Os catetos são animais silvestres cujo status junto a IUCN foi modificado recentemente graças sua criação em cativeiro no modelo semi extensivo, pois com essa ação foi possível aumentar o número de indivíduos em basicamente todas as regiões do País. Atento a estas questões e a importância que a espécie pode vir a ter para a produção animal, identificou-se que junto com nossas pesquisas outros pesquisadores têm desenvolvido pesquisas acerca de aspectos morfofuncionais e reprodutivos com a espécie, motivo que nos levou a optar por trabalhar com o sistema reprodutor feminino desses animais, considerando aspectos relativos a alterações na matriz extracelular, placentação e desenvolvimento embrionário, não descartando ao longo da realização do experimento, a oportunidade de obter dados macroscópicos importantes sobre cada estrutura reprodutiva, além de oportunamente descrever o desenvolvimento embrionário até os 60 dias de gestação. Para tanto, a presente proposta será executada considerando-se três etapas distintas, embora não dissociadas (Extração de glicosaminoglicanos, placentação e desenvolvimento embrionário). Os animais dos quais se pretende avaliar os glicosaminoglicanos em função das fases do ciclo estral serão submetidos à citologia vaginal diária e com base na fase do ciclo estral serão adotados procedimentos de coletas. Já para os animais em que buscar-se-á avaliar os glicosaminoglicanos em função das idades gestacionais, esses serão submetidos a protocolo de sincronização do cio e as coletas serão realizadas observando-se as fases de gestação. Nos dois procedimentos serão coletados fragmentos de vagina, cérvix, tuba uterina, útero, enquanto fragmentos de placenta e os embriões serão coletados apenas nas fêmeas prenhas. Quanto aos glicosaminoglicanos serão coletados fragmentos de vagina, cérvix, tuba uterina, útero e placenta destinados ao processamento para imunohistoquímica dos glicosaminoglicanos dos órgãos reprodutivos nas fases do ciclo estral e idades gestacionais. Além disto, serão processadas amostras destas mesmas estruturas para extração, identificação e caracterização dos polissacarídeos, conforme técnicas descritas no item referente à Metodologia. Já quanto à placentação serão coletados fragmentos da placenta e demais anexos fetais para análises sob microscopia de luz convencional e imunohistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura, posteriormente as análises macroscópicas de morfometria. Em relação ao desenvolvimento embrionário, após descrição morfológica e morfometria os mesmos serão processados com base em técnicas de microscopia luz convencional de modo que se possa descrever a organogênese em função das idades definida na metodologia. Com a execução da presente proposta espera-se fornecer subsídios importantes para utilização na clínica veterinária, para a biologia da conservação da espécie, formar recursos humanos em nível de graduação e de pós-graduação na área de medicina veterinária e, sobre tudo contribuir com informações acerca dos catetos (*Pecari tajacu*),

úteis ao seu manejo zootécnico e de preservação, já que tem sido imbuídos esforços de órgãos governamentais e não governamentais visando à preservação da espécie e consequentemente melhorar o status de sobrevivência da população da mesma nos diferentes biomas brasileiros.

Palavras-chave: Embriões, Glicosaminoglicanos, Imunohistoquímica, Placenta, Catetos, Tuba uterina e Útero.

ABSTRACT

The Brazilian semiarid occupies a relevant portion of Brazil's northeast region, where the environment adversities induce serious limitations in the productive process of populations, from there, actions that strategically emphasize its importance and the development of researches which provide information about animals that integrate its fauna, aiming the scientific and technological development, as the environment sustainability, which must always be object of public actions. The collared peccaries are wild animals whose status in the International Union for Conservation of Nature was recently modified thanks to its captive breeding in the semi-extensive model, once this action made possible the increasing of numbers of these specimens basically in all regions of the country. Aware of these issues and to the importance that the species might have for animal production, it was identified that with our researches, other researchers have been developing researches involving morphofunctional and reproductive aspects of the species, the reason why we chose to work with the female reproductive system of these animals, considering aspects related to alterations in extracellular matrix, placentation and embryonic development, not discarding during the experiment, the opportunity to obtain important macroscopic data about each reproductive structure, as well the opportunity to describe the embryonic development until 60 days of gestation. Therefore, the present propose will be executed considering three distinct, but not dissociated, steps (glycosaminoglycans extraction, placentation and embryonic development). The animals which glycosaminoglycans are to be evaluated according to the estrous cycle phase, will be submitted to daily vaginal cytology and to collection procedures that will be adopted based on the estrous cycle phase. For animals which glycosaminoglycans will be evaluated according to the gestational ages, they will be submitted to estrous synchronization protocol and the collections will be performed following the gestation phases. In both procedures will be collected fragments of vagina, cervix, uterine tube, uterus, while fragments of placenta and embryos, will be collected only in pregnant females. In what concerns to glycosaminoglycans, will be collected fragments of vagina, cervix, uterine tube, uterus and placenta that will be sent to immunohistochemistry process of glycosaminoglycans of the reproductive organs in the estrous cycle phase and gestational ages. In addition, samples of these structures will be processed for extraction, identification and characterization of polysaccharides, according to techniques described in item referring to the Methodology. As for the placentation, fragments of placenta and other fetal attachments will be collected for analysis under conventional light microscopy and immunohistochemistry, electronic transmission microscopy and scanned microscopy transmission, after macroscopic morphometric analysis. Regarding to embryo development, after morphological description and morphometry they will be processed based on conventional light microscopy techniques in a way that allows the organogenesis description according to the ages defined in the methodology. With the implementation of the present propose, it is expected to provide important subsidies for

use in veterinary clinics, for the conservation biology of the species, create human resources in a undergraduate and postgraduate level in the veterinary medicine field and, above all, contribute with informations about the *Pecari tajacu*, useful to its zootechnical and preservation management, once government and non-government organs have been atributting efforts aiming the species preservation and, in consequence, improving the surviving status of the population in different brazilian biomes.

Keywords: Embryos, Glycosaminoglycans, Immunohistochemistry, Placenta, Collared peccaries, Uterine tube and Uterus.

1 INTRODUÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO PRINCIPAL PROBLEMA A SER ABORDADO

1.1 CARACTERIZAÇÃO DOS CATETOS (*Pecari tajacu*)

A fauna silvestre brasileira é definida pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente como espécies autóctone, migratória ou qualquer outra aquática ou não, que tenha todo ou parte de seu ciclo de vida ocorrendo dentro dos limites do território brasileiro ou em águas jurisdicionalmente pertencentes ao Brasil (BRASIL, 1967, Art. 1º). Dentre os integrantes dessa fauna encontra-se o *Pecari Tajacu*, espécie objeto da proposta de pesquisa largamente utilizado em pesquisas com reprodução e morfologia, a exemplo de outras espécies.

Os catetos são mamíferos Cetartiodactyla, ordem que reuni a antiga ordem dos cetáceos (Cetacea) e artiodátiles (Artiodactyla). Pertencem a família Tayassuidae se considerado o que descreve Grubb, (2005), quanto aos clados e são nativos das Américas, distribuindo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, conforme Altrichter et al., (2018).

Sobre o que se observa da espécie é possível destacar que a pele é coberta por pelos ásperos com tonalidade variando entre preto e branco que dão aos animais um aspecto de cor que varia entre preto e cinza. Os indivíduos possuem cabeça relativamente grande, com focinho curto e o pescoço é pouco evidente. A cauda é curta e os membros torácicos e pélvicos possuem quatro e três dígitos, respectivamente. Contudo, não são características preponderantes na identificação dos mesmos, uma faixa esbranquiçada que se estende do pescoço as bochechas e ainda a presença de uma glândula dorsal que secreta uma secreção pálida utilizada na demarcação dos indivíduos que compõem os grupos sociais.

Segundo Nowak e Paradiso (1983), os catetos são animais com peso variando entre 14 a 30kg, com membros delgados e a cabeça relativamente grande em relação ao restante do corpo. Apresentam orelhas e olhos pequenos, nariz em forma de tromba, cauda curta e dentes caninos maxilares bem desenvolvidos e dirigidos para baixo e, que de acordo com (SOWLS, 1997) a presença de dimorfismo está associada a apenas a visualização do escroto nos machos, quando observados a curta distância. Nossa experiência com estes animais permite inferir ainda que as fêmeas possuem gestação que corresponde a um período entre 138 e 146 dias e com média de um a dois filhotes, mas que não é rara a parição de três filhotes, sendo que neste último caso um deles é rejeitado pela mãe (Grifos nossos).

Do ponto de vista biológico os catetos são considerados indivíduos importantes ecologicamente, pois são onívoros e dentre os seus itens de dieta encontra-se o hábito de ingerir sementes, sendo em razão disto considerados dispersores de sementes, o que pode representar uma ameaça ao equilíbrio dos ecossistemas (WRIGHT; DUBER, 2001). Este aspecto tem levado a que alguns pesquisadores defendem a criação de animais silvestres em cativeiro como ferramenta para preservação do ambiente e das espécies (MIRANDA et al., 2010), evitando, desta forma, a caça predatória, o tráfico de animais silvestres e o desmatamento causado por outras atividades mais tradicionais, como a bovinocultura, além de servir como alternativa para a diversificação da produção e renda para produtores rurais (SANTOS et al., 2009).

Também é importante considerar que, estes animais têm sido citados como a única fonte protéica de origem animal para muitas populações, ribeirinhas, indígenas e colonos da região amazônica segundo o que descreve Parry; Barlow; Peres (2009), o que reforça o entendimento de pesquisadores quanto a ser estimulada a criação de animais silvestres em cativeiro.

Assim, se considerado o porte, as características reprodutivas, os hábitos alimentares e comportamentais e a qualidade da carne, pesquisas envolvendo manejo reprodutivo, manejo alimentar e aspectos morfofuncionais visando o desenvolvimento de modelos sustentáveis de criação em cativeiro e modelos para o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas poderiam potencializar a criação de catetos de forma sustentável, que motiva o desenvolvimento de nossa proposta.

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS GLICOSAMINOGLICANOS

Os glicosaminoglicanos (GAGs), são polímeros de cadeia longa, não flexíveis e não ramificadas, que do ponto de vista funcional são importantes, especialmente, por serem componentes da matriz extracelular dos tecidos conjuntivos, entre outros. Os mesmos participam de grande número de funções celulares, a exemplo da formação de géis, formação de filtros de moléculas, estabelecimento de gradientes moleculares e estimulação de processos de migração e desopressão celular através da matriz extracelular. Estas macromoléculas estão presentes em diversos tecidos, podendo ser encontrados livres ou ligados a determinadas proteínas presente nos tecidos sob a forma de proteoglicanos. Existem diversos tipos de GAGs, tais como condroitin sulfato, heparan sulfato, que juntamente com o ácido hialurônico compõem a superfície das celulares, membranas basais e epitélios, a placenta, além do plasma sanguíneo e urina.

Estas pertencem ao grupo dos heteropolissacarídeos, estão distribuídas amplamente formando uma estrutura básica de unidades dissacarídicas repetitivas com hexosamina, ligadas a molécula de açúcar não-nitrogenada, ácido hialurônico e em determinados casos apresenta-se ligado a outros compostos, normalmente ligados covalentemente a proteínas formando os proteoglicanos, com exceção das moléculas de ácido hialurônico, no qual, encontram-se livres nos tecidos. Os GAGs estão presentes em todas as células de animais, mas apresentando diferenças estruturais dependendo do tecido e ou organismo de origem (KJELLEN e LINDAHL, 1991; BERTO et al., 2001). Sua presença na matriz extracelular resulta principalmente do metabolismo celular e tem como finalidade organizar estruturalmente essa matriz, a quem confere elasticidade, tônus e adesão.

Bellaiche et al., (1998); Lin et al., (2000) e Kitagawa et al., (2007) descrevem que os glicosaminoglicanos são polissacarídeos lineares integrantes da matriz extracelular de todas as células de metazoárias com relação importante no processo de

desenvolvimento embrionário dos invertebrados e vertebrados que se forem modificados podem promover defeitos graves no embrião ou mesmo leva-lo a morte.

Sun et al., (2016) considera que a matriz extracelular tem um papel central na mediação da comunicação entre células animais e, que esta comunicação se dar por meio de um conjunto de mecanismos e fatores sobre os quais interagem os glicosaminoglicanos, particularmente o sulfato de heparan, o dermatan sulfato e o condroitin sulfato.

A matriz extracelular tecidual é um complexo material constituído por proteínas fibrosas e substância fundamental representada pelos glicosaminoglicanos secretados pelas células. Essa matriz extracelular modula comportamentos celulares e dente eles propiciam os processos de adesão entre células. (BEACHLEY et al., 2018).

Cubas et al., (2010) estudando a concentração de glicosaminoglicanos no útero de ratos ovário ectomizados e tratados com progesterona e estradiol, descreve ao quantificar o ácido hialurônico, sulfato de condroitin e o sulfato de dermatan que as concentrações dessas substâncias variam entre os grupos em função do tipo de hormônio com os quais os animais foram tratados, indicando que as concentrações de glicosaminoglicanos tendem a diminuir caso as estruturas hormonais deixem de desempenhar sua função adequadamente.

As alterações na concentração desses Gags mostram-se tão significativos que a matriz extracelular passa a ser modificado ao ponto de permitir que se observe alterações na estrutura tecidual.

Prydz (2015) descreve que os glicosaminoglicanos podem ser proteínas glicosiladas de importância biológica á nível de superfície celulares, na matriz extracelular e na circulação, que se formam em vias secretoras dos animais. No caso dos proteoglicanos, durante o transporte, um grupo protéico liga-se a uma ao mais cadeias do glicosaminoglicano formando os proteoglicanos, que passam a denominados sulfato de heparan, sulfato de condroitina, dermatan sulfato ou ácido hialurônico em função do local e tipo de grupo protéico ligante.

Torres et al., (2018) descreve que os glicosaminoglicanos podem regular a proliferação celular, a invasão e migração celular e ainda a angiogênese em micro ambientes propício a metástase tumoral. Além deste citam que os glicosaminoglicanos são componentes da matriz extracelular que compreendem uma complexa classe de compostos sulfatados representados pelo condroitin, dermatan e heparan, entre outros.

Sabe-se que hormônios estrogênicos e progesterona atuam sobre estas moléculas glicanas promovendo alterações na matriz extracelular seja nível de ovário, útero, cérvix ou vagina durante as diferentes etapas reprodutivas, pois as variações nas concentrações glicosaminoglicanos afetem diretamente a organização da matriz extracelular e conseqüentemente a estrutura tecidual.

Sob o efeito dos hormônios os glicosaminoglicanos atuam sobre diversas funções biológicas como adesão, migração e proliferação celular, secreção de proteínas e expressão gênica, atuando como organizadores celulares e na maturação de tecidos especializados (DIETRICH, 1984). Estes também contribuem para a estrutura e as propriedades de permeabilidade do tecido conjuntivo, agem como guia para enzimas e fatores de crescimento tanto na matriz quanto na superfície das células, estando direta ou indiretamente envolvidos com a formação de tumores, metástases, reações imunológicas, desenvolvimento folicular, infertilidade e angiogênese e, ainda ao adequado desenvolvimento fetal (ESKO, 1991; CECHOWSKA-PASKO et al., 1996). Por sua vez, o crescimento vascular que acompanha o desenvolvimento da placenta provoca um aumento no fluxo sanguíneo neste órgão, resulta dessas substâncias e,

representam fator determinante para o desenvolvimento fetal (REYNOLDS; REDMER, 1995; REYNOLDS; REDMER, 2001). Há de se ressaltar que níveis elevados de GAGs ao final da gestação, acarretam uma vascularização irregular e por conseguinte um desenvolvimento fetal anômalo. Além desta situação, o aumento da resistência vascular uterina ou um fluxo sanguíneo uterino diminuído podem ser usados como apontadores de gestações de risco, estando associados com o retardo no crescimento fetal (TRUDINGER et al., 1985; NORTH et al., 1994; HARRINGTON et al., 1997).

Acredita-se que os GAGs desempenhem papéis essenciais na determinação de algumas propriedades físico-químicas do tecido placentário, especialmente por atuarem no transporte de substâncias entre as circulações materna e fetal. Entretanto, o envolvimento dos GAGs neste processo ainda não foram completamente elucidados, sendo necessário estudos em outras espécies que permitam elucidar a ação dos hormônios esteróides (estrogênio e progesterona) sobre os componentes da matriz extracelular ao longo do ciclo estral e assim melhor compreender algumas patologias do trato reprodutivo e anormalidades no desenvolvimento fetal.

No tecido uterino, é possível observar que a presença dos glicosaminoglicanos longo do ciclo estral nos animais, onde durante o estro, pode-se aumento na concentração destas moléculas, pois o aumento em sua concentração auxilia na capacitação espermática. E a sua concentração também apresenta concentração diferente ao longo de gestação, isto pode estar relacionado à suas funções fisiológicas no tecido. Estas moléculas promovem o reconhecimento celular, migração, adesão, proliferação e diferenciação das células, estando diretamente ligadas com o aparecimento de tumores, reações imunológicas, assim como no desenvolvimento folicular e na infertilidade (DIETRICH, 1984; NASCIUTTI et al., 2006).

No estro, observa-se aumento dos GAGs sulfatados, em especial, do sulfato de condroitin e do sulfato de dermatan isso auxiliando na capacitação espermática, além disso esse aumento durante esta fase promove o desenvolvimento do tecido uterino, além de auxiliar no processo de implantação embrionária. Enquanto na fase progesterônica verifica-se um ligeiro aumento do sulfato de heparan. (GOMES et al., 2007; CUBAS et al., 2010). No entanto, durante a gestação, observa-se uma diminuição nos níveis de ácido hialurônico, mas observando o seu aumento significativo momentos que antecede o parto (GOLICHOWSKI; KING e MASCARO, 1980; EL MARADNY et al., 1997).

Segundo (LEE et al., 1973; GOMES et al., 2007; FELDNER JÚNIOR et al., 2008), os principais fatores associados ao surgimento de tumores estavam relacionados somente a alterações nas próprias células. Contudo com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, passou-se a analisar a relação entre as células e o seu meio, a matriz extracelular e em função disto, vários autores voltaram sua atenção para alguns componentes dessa matriz, em especial os glicosaminoglicanos (GAGs). A matriz extracelular é composta por um conjunto de agregados, constituídos por uma rede molecular contendo colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e GAGs, responsáveis por manter as células associadas, possibilitando a organização dos tecidos e a sobrevivência das células (KRESSE; SCHÖNHER, 2001; HEINEGARD, 2009). Muitas evidências indicam que os proteoglicanos e GAGs, bem como as proteínas de adesão apresentam um notável efeito sobre o comportamento celular, influenciando em sua proliferação e diferenciação.

Kjellen e Lindahl (1991) e Merle et al., (1999) descrevem que estes compostos são componentes da superfície celular e da matriz extracelular, interagindo com colágenos, laminina e a fibronectina, além de determinados fatores de crescimento. A

interação dos componentes da matriz extracelular com os proteoglicanos podem afetar o crescimento celular, adesão e a diferenciação das células, no qual as suas funções são dependentes da cadeia lateral dos glicosaminoglicanos. Esta capacidade de ligação das proteínas com os GAGs reflete no funcionamento do organismo, tais como a ligação de enzimas com a lipoproteína lipase, proteínas extracelulares, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular

Os glicosaminoglicanos (GAGs), que estão presentes em diversos tecidos, podendo ser encontrados livres ou ligados a determinadas proteínas presente nos tecidos sob a forma de proteoglicanos. Existem diversos tipos de GAGs, tais como, ácido hialurônico, heparina, sulfato de condroitin, dentre outras, essas moléculas estão presente em cartilagem, superfícies celulares, membranas basais e epitélios, placenta, além do plasma sanguíneo e urina. Estas pertencem ao grupo dos heteropolissacarídeos, estão distribuídas amplamente formando uma estrutura básica de unidades dissacarídicas repetitivas com hexosamina, ligadas a molécula de açúcar não-nitrogenada, ácido hialurônico e em determinados casos apresenta-se ligado a galactose. Os glicosaminoglicanos estão ligados covalentemente a proteínas formando os proteoglicanos, com exceção das moléculas de ácido hialurônicos, no qual, encontram-se livres nos tecidos. Os GAGs estão presentes em todas as células de animais, mas apresentando diferenças estruturais dependendo do tecido e/ou organismo de origem (BERTO et al., 2001).

Os principais glicosaminoglicanos encontrados em animais são: condroitim 4 e 6 sulfato, dermatam sulfato, heparan sulfato, heparina, queratam sulfato e ácido hialurônico, que diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não aminado (ausência do grupo NH_2), quanto ao grau e posição de sulfatação, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intradissacarídica. Com exceção do ácido hialurônico, todos os glicosaminoglicanos estão ligados covalentemente ao esqueleto protéico, formando assim os proteoglicanos (FRASER et al., 1997).

Acredita-se que os GAGs desempenhem papéis essenciais na determinação de algumas propriedades físico-químicas do tecido placentário, especialmente por atuarem no transporte de substâncias entre as circulações materna e fetal. Entretanto, o envolvimento dos GAGs neste processo ainda não foram completamente elucidados, sendo necessário estudos em outras espécies que permitam elucidar a ação dos hormônios esteróides (estrogênio e progesterona) sobre os componentes da matriz extracelular ao longo do ciclo estral e assim melhor compreender algumas patologias do trato reprodutivo e anormalidades no desenvolvimento fetal.

Em ovinos, observa-se alterações na composição destas moléculas na cérvix ao longo de toda gestação. Mudanças na matrix extracelular da cérvix podem ser observadas no início da gestação, devido ao aumento da síntese de sulfato de dermatana. Pode-se também observar diminuição na quantidade de fibras colágenas, seguida da redução na concentração de proteoglicanos e ácido hialurônicos, associado com aumento da quantidade de água no tecido. Aos 140 dias de gestação, observa-se aumento nas concentrações de ácido hialurônico com aumento na concentração de células inflamatórias, sendo fonte potencial de collagenase e proteinase. Já as enzimas endógenas promovem mudanças hormonais, como uma diminuição dos níveis de progesterona e aumento do estrógeno, uma vez que a ação dos hormônios esteróides promova uma resposta inflamatória e como consequência aumento na produção de collagenase (HALME e WOESSNER, 1975; WOESSNER, 1979; FOSANG et al., 1984).

Em bovinos, observa-se dos GAGs no muco cervical durante a fase de estro, sugerindo que essas moléculas atuam no processo de capacitação espermática, no qual a motilidade espermática e a sua capacitação são induzidas pela presença de ácido hialurônico, heparina, sulfato de condroitina, no qual promovem mudanças funcionais na membrana celular dos espermatozoides (LEE e AX, 1984; MAHMOUD e PARRISH, 1996), bem como estimular a absorção de cálcio (MCNUTT et al., 1992) e a ativação do AMP cíclico intracelular (PARRISH et al., 1994). Assim, os glicosaminoglicanos são encontrados nos fluidos dos órgãos genitais femininos auxiliando a capacitação do espermática (KAWAKAMI et al., 2000).

Os glicosaminoglicanos foram identificados no tecido placentário, estando presente na matriz extracelular com propriedades físicas diferentes. Mudanças no transporte de moléculas através do tecido conectivo placentário, afeta diretamente crescimento fetal (LEE; JAMIESON e SCHAFER, 1973), variável nas diferentes fases da gestação. Além disso, o padrão dos GAGs no tecido placentário, o desenvolvimento de complicações na gestação, a exemplo da pré eclampsia (WARDA et al., 2008). Portanto, o entendimento do papel dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos na placenta poderá contribuir para a obtenção de importante alternativa para prevenir ou tratar a restrição de crescimento fetal (SAID, 2011).

Existe na placenta diversos proteoglicanos, contendo em sua cadeia moléculas de heparina sulfato, que quando presente no tecido placentário incluem o sindecan e perlecan, entretanto quando os proteoglicanos apresentam em sua constituição com sulfato de condroitina e heparina sulfato, a placenta apresenta decorin e biglican (JOKIMAA et al., 1998; YANG et al., 2005; CHEN; CHANG e YANG et al., 2007).

Na placenta de humanos, observa-se a presença de diversos tipos de glicosaminoglicanos, tais como o ácido hialurônico, sulfato de condroitina e heparina sulfato, no entanto, sendo observado baixas concentrações de queratan sulfato. Também observa-se que em placentas em estágio final tem-se altas concentrações de glicosaminoglicanos sulfatados, quando comparados em estágios iniciais (LEE; JAMIESON e SCHAFER, 1973).

De acordo (KIRN-SAFRAN et al., 2008) no processo de implantação e de placentação ocorre interações complexas entre tecidos embrionários, placentários e maternos durante o implante de embriões. Muitas dessas interações são controladas por fatores de crescimento, matriz extracelular e componentes da superfície celular que compartilham a capacidade de ligação de polissacarídeos de sulfato de heparan. Estas moléculas são transportadas por proteínas de superfície e secretadas pela célula, chamadas proteoglicano, que são expressas durante a implantação e a placentação.

Vallet et al., (2007) ao descrever o desenvolvimento da placenta de suínos cita que aos 30 e 35 dias da gestação os capilares fetais e maternos se desenvolvem adjacentes à bicamada e os fluxos sanguíneos são organizados de maneira cruzada em contracorrente. É que aos 85 dias de gestação o estroma fetal-placentário é parcialmente composto por glicosaminoglicanos, sendo o mais abundante o ácido hialurônico e o heparan sulfato sugerindo que estas moléculas têm papel importante no desenvolvimento placentário. Além de modificações estruturais, existem vários mecanismos específicos de transporte de nutrientes. É provável que esses mecanismos sejam tão importantes para o transporte de nutrientes específicos quanto o tamanho ou a estrutura da placenta.

Vallet et al., (2010) em estudo com a placenta de suínos infere que os glicosaminoglicanos são os principais componentes do estroma, incluindo o ácido hialurônico e o sulfato de heparan. Além disto cita que as hialuronidases e as

heparanases estão presentes nos tecidos placentários, e provavelmente desempenham papéis na modificação dos componentes do estroma para facilitar o desenvolvimento das pregas placentárias e ainda sugere que a síntese de glicosaminoglicanos estão associadas a síntese de glicose para o feto em desenvolvimento.

Analisados vários artigos e mesmo os citados na revisão de literatura constata-se que estudos que abordam a caracterização do nível de glicosaminoglicanos associados ao processo reprodutivo e modelos placentários dos animais, são incipientes e em tecido placentário de catetos não existe estudos algum. Assim justifica-se o desenvolvimento de pesquisas visando aprofundar os conhecimentos acerca dessas moléculas em relação às alterações estruturais que cada órgão do sistema reprodutor sofre durante o estro e a gestação, com o objetivo de compreender o papel dessas macromoléculas nos fenômenos reprodutivos de catetos e até mesmo utilizá-los como possíveis indicadores de gestação, mas, sobretudo verificar se existe alguma influência dessas moléculas na formação da placenta, no desenvolvimento do feto, na gestação inicial e na gestação final desses animais.

Trata-se de uma espécie cujos aspectos reprodutivos tem sido estudada por nós (MAIA, et al., 2019; BEZERRA, et al., 2019; DE QUEIROZ NETA, et al., 2018; BOLINA, et al., 2018; BORGES, et al., 2017; BORGES, et al., 2018; SANTOS, et al., 2016 e MIRANDA-MOURA, et al., 2016), em parceria e por outros pesquisadores (SONNER, et al., 2002; TEIXEIRA, et al., 2007; TONARELLI, et al., 2007; DE ANDRADE, et al., 2018; DA SILVA, et al., 2016; SANTOS, et al., 2018 e MAYOR, et al., 2019) o que se constitui um ponto importante e relevante quanto à apresentação de resultados ao CNPq e conseqüentemente a comunidade científica. Ademais a linha de pesquisa com glicosaminoglicanos já vem sendo trabalhada por nosso grupo de pesquisa em outras espécies gerando projetos que resultaram em orientação de doutorado, tendo sido duas defendidas e uma que se encontra em andamento proporcionado várias publicações como já referenciado.

Destaca-se que, a maioria desses trabalhos envolve aspectos reprodutivos dos machos, embora tenhamos algumas publicações envolvendo o sistema reprodutivo feminino. Contudo, aspectos relacionados à morfofisiologia da reprodução, ainda carecem de informações importantes para definições de biotécnicas assistivas, tais como período de implantação, desenvolvimento placentário, entre outros aspectos a serem estudados e aplicados na reprodução a exemplo da técnica de inseminação artificial.

Assim, expostas as considerações que nos levam a apresentar a presente proposta solicita-se desse Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a renovação da bolsa de produtividade em pesquisa tendo como tela o projeto intitulado “*Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos Pecari tajacu Linnaeus, 1758*”. Salientando-se que, do mesmo deverá resultar pelo menos uma orientação de mestrado e uma de doutorado e pelo menos quatro iniciações científicas, as quais estarão vinculadas pelo menos seis artigos científicos a serem publicados em períodos especializados e de bom fator de impacto.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar em catetos o perfil de GAGs sulfatados na vagina, cérvix, útero, tuba uterina e ovários nas diferentes fases do ciclo estral e da gestação, bem como identificar e quantificá-los na placenta aos 15, 30, 45 e 60 dias da penhez e ainda o

desenvolvimento embrionário, nestes mesmos dias de gestação, a fim de poder inferir sobre sua importância dessas substâncias nos eventos fisiológicos destes órgãos e verificar a possibilidade do uso dessas macromoléculas como indicadores da gestação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever macroscopicamente a placenta de catetos na fase inicial da gestação;
- b) Estabelecer relações peso e comprimento entre feto/placenta na fase inicial da gestação;
- c) Descrever microscopicamente placenta de catetos confrontando com dados nossos já publicados, uma vez que as idades de gestação eram estimadas, com base em diferentes técnicas de microscopia;
- d) Descrever a placenta e anexos fetais de catetos aos 15, 30, 45 e 60 dias da gestação;
- e) Descrever o desenvolvimento embrionário de catetos aos 15, 30, 45 e 60 dias da gestação;
- f) Definir o tempo de implantação embrionária;
- g) Estabelecer o perfil de progesterona e estrógenos ao longo do ciclo estral e gestação;
- h) Purificar, quantificar, identificar e analisar a distribuição de glicosaminoglicanos no sistema reprodutor e anexos fetais de catetos durante o ciclo estral e gestação;

3. METAS

- a) Obtenção de informações acerca da produção glicosaminoglicanos na placenta dos catetos;
- b) Publicação de três artigos científicos em periódicos indexados e apresentação de cinco resumos em congresso na área morfologia;
- c) Formar recursos humanos, através da iniciação científica de dois estudantes de graduação, bem como na realização da dissertação e tese de dois pós-graduandos;
- d) Permitir a fixação de pesquisadores voltados para a área de morfologia Animal na região do semi-árido nordestino, onde o presente projeto contribuirá principalmente para a realização de pesquisas conjuntas relacionadas à reprodução e morfologia da espécie;
- e) Fortalecer a pesquisa acerca da morfofisiologia dos órgãos reprodutores femininos de catetos na região do semi-árido nordestino, contribuindo tanto para a aquisição de conhecimentos acerca da fisiologia reprodutiva das fêmeas, bem como para a preservação da espécie e incentivando a utilização racional da mesma dentro de um sistema produtivo; e
- f) Contribuir para o aperfeiçoamento das condições de ensino e pesquisa na área da morfologia Animal nos cursos de Graduação em Medicina Veterinária, Zootecnia e na Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA, através da realização de aulas práticas no decorrer da execução do projeto.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os animais a serem utilizados para realização do experimento envolvendo o perfil dos glicosaminoglicanos durante o ciclo estral e gestação de catetos e ainda placentação e desenvolvimento embrionário, serão adquiridos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Os animais serão mantidos em recintos de 2,5x10m. Serão utilizados 20 catetos fêmeas, adultas com idade variando de 10 a 18 meses, sendo utilizadas quatro fêmeas por cada fase do ciclo estral e 16 fêmeas gestantes, com os seguintes dias de gestação: 15, 30, 45 e 60, sendo quatro fêmeas para cada idade gestacional. Adicionalmente serão avaliadas mais seis fêmeas com a finalidade de descrever o processo de implantação, que totaliza 26 animais. Ressalta-se que o projeto tem a duração de quatro anos para ser executado.

As fêmeas serão colocadas em baias numa relação (1Fêmea:1macho), a fim de que sejam fecundadas. Para isto, serão instaladas duas câmeras por baias para gravação das ações diárias dos animais com o fim de identificarmos os dias de cópula, sendo que serão trabalhadas quatro fêmeas por vez.

Os animais receberão água a vontade (*ad libitum*) e serão alimentados com ração concentrada para suínos, volumoso formado de capim Pangola (*Digitaria decumbens*) ou capim Elefante (*Pennisetum purpureum*) triturados em forrageira e ocasionalmente frutas da época disponíveis na Universidade.

Sobre a disponibilização dos animais é importante destacar que o CEMAS/UFERSA possui número de animais considerável que pode ser utilizado no experimento sem comprometer o plantel de animais, aspecto já entendido pelo ICMBio e Comissão de Ética no Uso de Animais, quando da autorização e aprovação de nossos experimentos.

4.2 COLETA E DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL

O protocolo de sincronização do estro será através da utilização de esponjas intravaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Progespon, Sytex, Argentina) por 7 dias, sendo que 24 h antes da remoção das esponjas, serão aplicados prostaglandina F2alfa (Sincrocio, Ourofino, SP), na dose de 250 mcg/Animal (1ml/animal/dose única), por via intramuscular e eCG (Folligon, MSD), na dose de 500 mcg /Animal (1 ml/animal/dose única), por via intramuscular. A detecção do estro será observada de 12/12 horas durante 2 dias. As fêmeas serão agrupadas junto com o macho a cada 12 horas, sendo três coberturas acompanhadas visualmente. Ocorrendo a cobertura o dia — “um” da gestação será considerado o dia seguinte ao da cópula. As gestações serão confirmadas mediante exame de ultrassonografia transretal (240 Parus, Pie Medical®) através da visualização dos primeiros parâmetros gestacionais, como a vesícula embrionária.

4.3 DOSAGEM HORMONAL

Para determinação das concentrações séricas de progesterona e estrógenos, serão colhidas amostras de sangue por venopunção da veia cefálica. Serão colhidos 5ml de sangue de cada animal com agulhas hipodérmicas 0,8mm x25mm em tubos de ensaio de vidro, sem anticoagulante. As amostras serão em seguida submetidas à centrifugação

por 15 minutos. Com a obtenção do soro, o mesmo será congelado com duplicata a -20°C.

As concentrações hormonais serão determinadas pelo método de radioimunoensaio em fase sólida onde serão utilizados kits comerciais (COATA-COUNT®, DiagnosticProducts Corporation, Los Angeles, CA, USA), utilizando-se metodologia descrita por Peixoto (2016).

4.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO

Os animais serão submetidos ao protocolo anestésico. Para tanto, serão submetidos a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 8 horas. Posteriormente será realizada a medicação pré-anestésica (MPA) mediante administração de xilazina a 1% (dose - 0,1 mg.kg⁻¹), por via IM, após 5 minutos, será realizado a indução anestésica com administração de cetamina a 10% (dose - 2,0 mg.kg⁻¹), por via IV, e, depois de 10 minutos, procederá a manutenção anestésica inalatória com utilização de isoflurano a volume de 3% até que seja observado o momento anestésico-cirúrgico correspondente ao estágio III e plano II. Em seguida, terá início o protocolo cirúrgico, com o animal em decúbito dorsal, tricotomia da região abdominal e antisepsia ampla com utilização de iodo povidine, logo após, será realizado uma incisão longitudinal mediana pré-retroumbilical na pele, tecido subcutâneo e peritônio (três planos) até a identificação do útero gravídico, onde será realizado a ovariohisterectomia total contendo os embriões/fetos e seus anexos. Feito isto, será realizado o fechamento dos três planos, com utilização de fio de nylon. Após cada procedimento, os cuidados pós-operatórios constarão de limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e aplicação de organnact prata spray a cada 24 horas até a completa cicatrização, além da administração de penicilina G procaína a 5.000.000 UI (dose - 20.000 UI.kg⁻¹) a cada 24 horas durante 10 dias, por via IM e flunixin meglumina a 50 mg.ml⁻¹ (dose - 2,2 mg.kg⁻¹) a cada 24 horas durante 3 dias, por via IM. As cirurgias serão realizadas no Hospital Veterinário (HOVET) da UFERSA.

4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Para a análise macroscópica serão utilizadas 16 fêmeas sendo que as coletas serão distribuídas da seguinte maneira: 4 fêmeas aos 15 dias de gestação; 4 fêmeas aos 30 dias de gestação; 4 fêmeas aos 45 dias de gestação e 4 fêmeas aos 60 dias de gestação. O material coletado será analisado no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

Sendo assim, após a realização da ovariohisterectomia, o útero será incisado e após exposição do conjunto de anexos embrionários e embrião, será realizada a caracterização macroscópica das membranas fetais, placenta, cordão umbilical e o embrião, útero, ovários, entre outros.

Na sequência, serão determinados os comprimentos do embrião e do cordão umbilical e o diâmetro dos placentomas, assim como o peso dos embriões e dos anexos fetais. Com isto serão obtidas as seguintes relações: - Peso fetal (g)/ peso dos anexos fetais (g); - Peso do embrião (g)/comprimento do cordão umbilical (cm); - Peso do embrião (g)/comprimento do embrião (cm).

Com o auxílio de fita métrica metálica graduada será obtido o comprimento do feto e do cordão umbilical. Utilizando-se uma balança digital, será determinado o peso

do embrião/feto e da placenta. Serão obtidas também as medidas de comprimento do feto (Oliveira, 2003).

Com os dados de mensuração e pesagem, serão obtidas as seguintes relações:

- a) Peso fetal (g)/peso da placenta (g) determinada como sendo o quociente entre o peso fetal em gramas e o peso da placenta em grama.
- b) Peso fetal (g)/comprimento do cordão umbilical (cm) como sendo o quociente entre o peso do feto em gramas e o comprimento do cordão umbilical em centímetros.
- c) Peso fetal (g)/comprimento do feto (cm) dividindo-se o peso do feto em gramas pelo comprimento do feto em centímetros.

Além disso, os embriões serão fixados em solução de formaldeído tamponado a 10% e serão realizadas as seguintes mensurações dos embriões: CR (crown-rump), comprimento total, cefálico, cefalocaudal; cauda; diâmetro biparietal, diâmetro do olho; comprimento do olho; orelha; dos membros torácicos e pélvicos; da tíbia; do rádio-ulna; das unhas do membro torácico e pélvico; largura das unhas do membro torácico e pélvico; comprimento dos dentes incisivos superiores e inferiores, perímetro torácico e perímetro abdominal, expressas em mm. Todas as medidas serão expressas por meio de média e desvio padrão.

Os dados das mensurações da placenta, cordão umbilical e do embrião serão submetidos a testes estatísticos não paramétricos (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Mann-Whitney) e regressão linear e análise correlação, visando a identificar o comportamento destas variáveis. Para isto, será considerada a existência de diferenças significativas entre as variáveis testadas quando o grau de significância for menor que 5% ($p < 0,05$).

Depois de realizadas a caracterização estrutural externa e as mensurações do embrião, o mesmo será dissecado e a macroscopia de sua organogênese analisada e descrita nas diferentes idades gestacionais. Para aqueles menores poderá ser realizada apenas a microscopia.

4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Para este fim, serão coletados fragmentos de cerca de 1cm das placentas, cordão umbilical, membranas fetais a partir de 16 fêmeas distribuídas igualmente em quatro idades gestacionais 15, 30, 45 e 60 dias de gestação. Estes fragmentos serão fixados solução de paraformaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4. Do mesmo modo serão coletados fragmentos dos diferentes órgãos e estruturas dos embriões para análise microscópica da organogênese e de sua organização tecidual nas mesmas idades gestacionais, visto que o período de organogênese está compreendido dentro do intervalo gestacional estudado (SINOWATZ, 2010).

Após a fixação, o material será lavado em água e então submetido à desidratação em bateria de banhos de imersão de uma hora de álcool em concentração crescente a partir do álcool 70% até a chegada ao álcool absoluto no qual serão realizadas três trocas. Feita a desidratação o material será diafanizado por banhos de imersão em dois xilóis durante uma hora para na sequência realizar o processo de parafinização, onde os fragmentos serão colocados em duas parafinas a 60°C, permanecendo “over night”, no primeiro, e por uma hora, no segundo. Em seguida será realizado o emblocamento do material.

Obtidos os blocos, estes passarão por microtomia (LEICA RM 2065), fazendo-se cortes de 5 a 7µm de espessura, que serão levados à esfufa a 55°C. Finalmente, as lâminas serão submetidas à coloração pela técnica de hematoxilinaeosina (HE), tricrômio de Gomori, Picrossírius, Ácido periódico de schiff (PAS) e Sudan black. Após montadas e analisadas, aquelas mais representativas serão então, selecionadas para fotomicrografia por meio de câmera (Leica ICC50 HD) acoplada a microscópio. No entanto, as amostras coradas pela técnica de picrossirius serão analisadas por meio de microscópio de luz polarizada necessário para a execução deste projeto de pesquisa. Estas técnicas seguirão preferencialmente a metodologia descrita por Tolosa et al., (2003)

Para identificação dos GAGs *in locu*, vistos a luz da microscopia, as lâminas serão submetidas aos métodos de coloração por Alcian Blue (pH 1,0) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para os estudos de microvascularização será realizada injeção de resina Mercor CL – 2R (Vilene, Tokyo, Japan) azul ou vermelho. Depois de completada a polimerização da resina injetada, o material será imerso em solução de hidróxido de sódio, variando entre 10% e 40%, deixados em estufa sob temperatura de 60°C, até completa corrosão, sendo, porém, lavadas periodicamente para substituição do hidróxido.

Completada a corrosão, os moldes vasculares serão lavados com água destilada e em seguida colocados em estufa a 37°C para secagem. Posteriormente serão incluídos em solução de gelatina incolor a 20%, e levados à geladeira para garantir maior resistência ao molde. Posteriormente, serão novamente imersos em solução de hidróxido de sódio para retirada da gelatina, levados a estufa para secagem, em seguida montagem em bases metálicas e metalização com ouro (EMITECH K550). Por fim, o material será analisado em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP). Neste procedimento será utilizada a metodologia adaptada por Oliveira (2003).

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Serão obtidos fragmentos com cerca de 0,5mm² de regiões de interesse e imersos em solução de glutaraldeído a 2,5%, tamponado com fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,4 por 72h. Na sequência o material será lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,4 por três vezes, e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Concluída a pós-fixação, os fragmentos serão imersos em acetato de uranila a 3%, “over night” para que então sejam submetidos à desidratação em álcool a 50%, 70%, 90% por dez minutos cada e em álcool absoluto.

Após desidratados os fragmentos serão lavados em óxido de propileno por dez minutos e infiltrados em resina spurr. Para este fim, os mesmos serão imersos em mistura de óxido de propileno e resina 1:1 durante uma hora; resina pura durante 12 horas; resina pura durante 2 horas e finalmente em resina pura para confecção dos blocos em estufa a 60°C por três dias, até completa polimerização.

Obtidos os blocos, serão feitos cortes semifinos com 0,4 µm em ultramicrótomo (LEICA ULTRACUT R), corando-se com azul de toluidina 1% e analisando-os em microscópio de luz. Identificadas as regiões de interesse, serão feitos cortes com 0,07 µm, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila saturado a 2% e

em citrato de chumbo a 0,5%. Por fim, o material será analisado e eletrofotomicrografado em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 100-CXII). Neste procedimento também será utilizada a metodologia adaptada por Oliveira (2003).

4.9 REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS

As reações imunohistoquímicas serão realizadas em material processado, até a obtenção dos cortes, da mesma maneira utilizada para a microscopia de luz. Estas reações objetivarão a imunolocalização de proteínas que evidenciam particularidades importantes para o estudo da placentação e embriogênese, entre elas a vimentina e a citoqueratina. Além disso, será avaliada a capacidade proliferativa dos diferentes tipos celulares com a utilização da imunomarcagem para a proteína nuclear Ki67.

Para isso os cortes serão aderidos em lâminas sinalizadas e submetidos a uma bateria de banhos em etanol em concentrações decrescentes para em seguida realizar o bloqueio da peroxidase endógena com a utilização de peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos. Após isso será feita a recuperação antigênica onde à temperatura ambiente, serão tratados em tampão citrato 0,1M, Ph 7,4 e irradiados por três vezes de cinco minutos em microondas de uso caseiro (700MHz). Em sequência serão feitas lavagens em Tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4, Adicionando em seguida a proteína Dako para bloquear as reações inespecíficas. Dando prosseguimento para que as reações sejam evidenciadas as amostras serão incubadas com anticorpo primário, sendo eles, anticorpo Anti-Vimentina, Anti-citoqueratina e Anti-Ki67 em câmara úmida (12h) entre 0 e 4°C. Passada esta etapa as lâminas serão lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase e revelados com diaminobenzidina/peróxido de hidrogênio em tampão TRIS-HCl Ph 8,2 e por fim Contracolorados com Hematoxilina de Harris e montados resina sintética – Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Com o resultado obtido com a imunorreação ao Ki67 será também calculado o índice mitótico. Para isso as lâminas serão fotomicrografadas, em um aumento de 400x e nas imagens obtidas serão contadas 1000 células diferenciando-as em positivas e negativas a reação, sendo que o índice mitótico será obtido pela razão entre o número de células positivas e o total de células contadas (1000), com este resultado multiplicado por cem e será expresso em percentual.

4.10 ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS GAGs

a) Extração do glicosaminoglicanos

Para análise dos glicosaminoglicanos, fragmentos dos órgãos genitais (5-10g), e do tecido placentário serão coletados, picotados e colocados em frascos de 15mL, contendo acetona, sendo realizado uma troca a cada 24 horas durante três dias consecutivos, para remoção dos lipídios (Delipidação).

Após finalizado o processo de delipidação, as amostras serão pesadas em balança de precisão (BEL M214 Ai) de modo a separar frações para cada órgão. Para a tuba uterina, será pesado 50mg e para os demais órgãos reprodutivos 1g, sendo estas frações colocadas separadamente em microtubos de 2 mL (Eppendorf) e identificados. Posteriormente, será adicionado a cada frasco prozima (4 mg/mL) em tampão TRIS-HCl, 0,05 M pH 8,0 com NaCl 0,15 M, na proporção de 1 mg de pó para 20 µL de tampão, incubado em temperatura de 60°C durante 24 a 48 horas. Em seguida, será adicionado ácido tricloroacético 90%, numa proporção de 10% do volume inicial da

amostra em banho de gelo durante 20 minutos para precipitação dos ácidos nucleicos. Depois, as amostras serão centrifugadas a 4700 giros (SOLAB, SL-701) durante 20 minutos a 20° C e ao término descartado o precipitado, sendo o volume de cada amostra verificado e ao sobrenadante adicionado 2 volumes de metanol para 1 volume da amostra.

As amostras serão congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (TERRONI, LS 3000), obtendo-se ao final o pó contendo os GAGs, o qual será ressuspenso em 30 a 70 µL de água destilada.

b) Identificação dos glicosaminoglicanos

A identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos serão realizadas por eletroforese em gel de agarose 0,6%, preparado com tampão 1,3-diaminopropanoacetato 0,05M, pH 9,0, como proposto por Dietrich e Dietrich (1976). Será aplicado no gel 5 µL do padrão (1 mg/mL) contendo condroitim (CS), dermatam (DS) e heparam sulfato (HS), sendo, a amostra agrupada no gel, por tecido, por fase do ciclo ou por idade gestacional e submetida a eletroforese com duração média de 1 hora e 15 minutos, sob a tensão de 110 V, 5 A 10 W.

Decorrido o período, o gel será retirado da cuba de eletroforese e colocado em solução de Cetavlon (CTV) 0,1%, permanecendo nesta solução por no mínimo 2 h. O gel será removido do CTV e envolvido em papel filtro e colocados para secar em fluxo de ar contínuo, em média por 45 minutos. Ao término da secagem, as lâminas serão coradas em azul de toluidina (0,1%) por 15 a 20 min, colocados em solução descorante (etanol 50% e ácido acético 1%) por alguns minutos sob agitação e por fim, colocadas para secar e digitalizadas.

As frações que contiverem polissacarídeos sulfatados desenvolverão coloração roxa característica, devido à capacidade de interação entre os grupamentos sulfatos e o azul de toluidina. A identificação dos GAGs encontrados no material será realizada através da técnica de eletroforese, sendo diferenciados conforme sua migração ao longo do gel.

c) Caracterização dos glicosaminoglicanos

As amostras serão submetidas ao processo de digestão enzimática, utilizando heparinase III obtidas de *Flavobacterium heparinum* (Sigma-Aldrich®) em solução tampão (20 mM Tris-HCl, pH 7,5 contendo 0,1 mg/ml BSA e 4 mM CaCl₂), seguindo recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich®).

d) Densitometria

A quantificação dos GAGs será realizada através da densitometria das lâminas de eletroforese em gel de agarose, analisadas através do software ImajeJ® (FLORENTIN, 2015).

4.11 GAGs SANGUÍNEOS

a) Isolamento e purificação dos GAGs sanguíneos

O sangue coletado por seringa plástica será armazenado em frascos de vidro estéreis contendo citrato de sódio e logo centrifugado (2500 g /10 minutos a 20°C) e o plasma sanguíneo obtido. Em seguida o plasma será liofilizado, pesado e submetido a extração lipídica com éter dietílico por 24 h a 4°C. Depois a amostra será reidratada, e realizada a desnaturação proteica e a digestão com Pronase E (Protease tipo XXV, Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri, EUA) por 6 horas a 57°C. O procedimento de digestão será realizado por cinco vezes. Depois do tratamento com NaOH (0,5M) por 24 horas a 4°C, as proteínas residuais serão precipitadas com ácido tricloroacético a 4°C e removidas por centrifugação (1500g / 20 minutos). Em seguida cada amostra será dialisada em água corrente por 48 horas, em água deionizada e finalmente em água destilada por 24 horas a 4°C. Posteriormente à liofilização e extração lipídica, as amostras serão solubilizadas pela adição de NaCl (0,03M) e os GAGs precipitados utilizando cloreto de cetilpirimidina (Sigma) a 4° por 24-48 horas. Este complexo, GAG-cloreto de cetilpirimidina será removido por centrifugação (1500 g a 20 minutos) e lavado três vezes com solução saturada de etanol com acetato de sódio a 80% e três vezes em etanol a 80%.

b) Quantificação e identificação dos GAGs do plasma sanguíneo

Os GAGs serão mensurados em termos de hexosamina (mg/ml) usando como padrão N-acetil-D-glucosamina (Sigma) e identificados pelo método enzimático/eletroforético. A eletroforese será realizada utilizando solução de acetato de bário (0,1M) e uma fita de poliacetato de celulose (Gelphore; Gelman Instruments, Wrightsville, Pensilvânia, EUA) a 5 V/cm por 180 minutos. Os padrões eletroforéticos serão visualizados pela coloração com Alcian Blue e registrados usando um densitômetro (ERV Proteo 125). As bandas eletroforéticas serão identificadas pela seletiva digestão enzimática com hialuronidase (Sigma), condroitinases ABC (Sigma) e AC (Sigma), Heparitinases (Miles Laboratories, Elkhart, Indiana, EUA) e keratanase (Sigma) e pela degradação com ácido nítrico. Os padrões apropriados de Keratan sulfato, heparan sulfato e condroitim 4 e 6-sulfato serão oriundos do Sigma.

4.12 Citoquímica e Imunohistoquímica

Os cortes de 5 µm dos órgãos genitais femininos e tecido placentário quando presente serão aderidos em lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100 a 50%) e imersos por 5 minutos em tampão fosfato (PBS; 137 mM NaCl/2.7 mM KCl/4.3 mM Na₂HPO₄/1.4 mM KH₂PO₄; pH 7.3) para lavagem. A exposição antigênica dos tecidos será realizada em tampão citrato (10 mM, pH 6,0), utilizando aparelho de micro-ondas (60° C, 5 min), seguida por duas lavagens em PBS. Para bloqueio da peroxidase endógena e reações inespecíficas será utilizado uma solução de metanol com 3% de peróxido de hidrogênio e Reagente Imunológico (RUO) ABC Elite VECTASTAIN (Vector Laboratories) por 10 min. As secções foram incubadas com anticorpo primário a 4°C por 20 h em câmara úmida. A expressão tecidual dos GAGs será determinada com o uso dos anticorpos contra condroitin sulfato (AC monoclonal, CAM-56, Abcam), contra ácido hialurônico

(Ac. Policlonal de ovelha, Abcam) (Tabela 1, Anexo A). Em seguida, os cortes serão incubados por 45 min. com anticorpo secundário universal Anti-Mouse/Anti-Rabbit/Anti-Goat IgG (H+L) (Universal Pan-Specific, Vector Laboratories). Para amplificação do sinal da reação será utilizado o complexo avidina-biotinilida (kit Vectastain Elite ABC®, Vector Laboratories). As lâminas serão analisadas em microscópio de luz (Leica DM 500 HD) com câmera acoplada (LEICA ICC50W) para captura de imagens da reação. Serão contadas 100 células de cada cinco seções por animal para determinação da porcentagem de células positivas para os GAGs no tecido uterino e placentário.

As técnicas de extração de GaGs serão realizadas segundo metodologia descrita por Dubois (1956).

5. PLANO DE ATIVIDADES E INDICADORES DE DESEMPENHO

O plano de atividades para a presente proposta apresenta uma estratégia a ser conduzida no decorrer de 48 meses, considerando que **a proposta está para renovação de Bolsa Produtividade na modalidade 1D** de acordo com o cronograma especificado logo a seguir.

a) Primeiro ano:

Previamente, os estudantes de graduação e pós-graduação envolvidos no projeto passarão por um processo de estágio e treinamento junto ao Laboratório de Bioquímica da UFRN e Laboratório Morfofisiologia e Microscopia da FMVZ/USP. Esta etapa já desenvolvemos em parte na UFERSA, porém em função da parceria estabelecida sempre solicitamos o estágio dos alunos envolvidos no projeto junto a UFRN. Em seguida, será realizada a implantação do projeto, onde a logística para sua execução será implementada e os materiais de consumo serão adquiridos. Além disso, serão realizados experimentos-piloto para adequação de metodologia, de acordo com o cronograma de manejo dos animais do CEMAS/UFERSA. Ainda neste primeiro ano, deseja-se realizar a primeira etapa do trabalho, referente à distribuição dos GAGs na tuba e útero, nas diferentes fases do ciclo estral e placenta e subplacenta, tuba e útero ao longo da gestação, almejando a confecção de um primeiro artigo e um resumo científico.

b) Segundo ano:

Será dada continuidade ao projeto, com a execução da segunda etapa do mesmo, sendo então confeccionado um artigo científico e dois resumos referentes ao experimento de purificação, quantificação e identificação dos GAGs na tuba, útero, cérvix, vagina e placenta de catetos durante o ciclo estral e gestação. Nesta ocasião, tenciona-se que tais trabalhos, até então executados, permitam a defesa de uma dissertação de mestrado, junto ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da UFERSA.

c) Terceiro ano:

Nesta etapa pretende-se definir o estabelecimento do perfil dos glicosaminoglicanos existentes na tuba, útero e placenta de catetos, ao longo da gestação e avaliar a possibilidade do uso dos GAGs como indicadores de gestação, que

ETAPA/ATIVIDADES	ANO III – Abril/2022 a Março/2023											
	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03
Processamento de material para extração de GAGs	x	x	x	x								
Processamento para identificação dos GAGs		x	x	x	x							
Processamento para caracterização dos GAGs			x	x	x	x						
Processamento para quantificação dos GAGs				x	x	x	x					
Elaboração de resumos artigos para publicação em ventos e artigos para publicação em periódicos especializados						x	x	x	x	x		
Defesa de tese doutorado vinculado ao subprojeto II												x

ETAPA/ATIVIDADES	ANO III – Abril/2023 a Março/2024											
	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03
Acompanhamento dos animais para avaliação de dia de cópula conforme específica em metodologia	x	x	x	x								
Coleta de sangue para dosagem de hormônios relacionados ao processo de implantação		x	x	x	x							
Coleta de embriões pré-implantacionais e de tecidos reprodutores para estudo de perfil de GaGs nesta etapa.			x	x	x	x						
Processamento de embriões				x	x	x	x					
Elaboração de resumos artigos para publicação em ventos e artigos para publicação em periódicos especializados						x	x	x	x	x		
Elaboração de relatório e encaminhamento ao CNPq										x	x	x

7. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS OU TECNOLÓGICAS DA PROPOSTA

Como principal resultado científico do projeto, espera-se contribuir com a aquisição de informações relacionadas à morfofisiologia do útero, tuba uterina, placenta e desenvolvimento embrionário da espécie *Pecari tajacu*, de forma que se possa inferir qual o papel dos GAG's no processo gestacional destes animais.

Dentre os avanços tecnológicos, a geração dos referidos conhecimentos supracitados contribuirão para o aumento das informações a cerca da biologia da reprodução destes animais, os quais poderão ser utilizados tanto para a conservação das referida espécies, como também para um futuro intercâmbio de material genético de alto

valor zootécnico entre diferentes criatórios. Salienta-se que muito pouco é ainda conhecido sobre a biologia reprodutiva desta espécie, e o presente projeto representa um dos passos iniciais para sua exploração científica, fornecendo conhecimentos básicos a serem utilizados, futuramente, em outras biotécnicas.

Nos aspectos de formação de recursos humanos e produção científica, espera-se formar, ao longo do projeto, alunos de iniciação científica bolsistas e ou voluntários, bem como estagiários, resultando em formação de recursos humanos para pesquisa e desenvolvendo a consciência crítica em alunos de graduação da UFERSA. O estudo irá contribuir ainda com a formação de alunos de pós-graduação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA. Todas estas participações e formações, aliadas ao expressivo montante de informações que se espera gerar, certamente, serão determinantes para a produção de artigos e resumos científicos pela equipe.

De forma mais sucinta, espera-se ao término do desenvolvimento da proposta considerando os objetivos e metas, previamente, definidos e ainda com base nos resultados obtidos:

- a) Produzir resultados que possam suscitar o interesse da comunidade científica a desenvolver outros tipos de pesquisas com a espécie em questão;
- b) Produzir informações científicas acerca da biologia da espécie que possam contribuir para o desenvolvimento de estudos na área de reprodução animal e clínica veterinária.
- c) Aplicar as informações obtidas após a finalização do projeto, para a interpretação de novos estudos com reprodução de tayassuídeos americanos.
- d) Fortalecer a linha de pesquisa na área de concentração do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e nossa linha de pesquisa com GaGs, iniciada durante com o financiamento de edital na modalidade - Bolsa Produtividade - com publicações de artigos em periódicos de elevado fator de impacto.
- e) Considerando que no Brasil existe pouca literatura especializada sobre morfofisiologia de espécies silvestres, especialmente, sobre o desenvolvimento embriológico de tayassuídeos, pretende-se num breve período de tempo compilar os dados publicados em um livro sobre reprodução de catetos, conjuntamente com nosso grupo de pesquisadores parceiros.

8. PARCERIAS

8.1 LABORATÓRIO DE MORFOFISIOLOGIA E MICROSCOPIA DA FMZ/USP

Esta parceria, estabelecida junto à pessoa do Prof. Dr. Antonio Chaves de Assis Neto e Maria Angelica Miglino, responsáveis por esse laboratório, representa a incorporação do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada da UFERSA a área aplicada de morfofisiologia, e tem por objetivos:

- a) Levantar a infra-estrutura dos laboratórios envolvidos;
- b) Otimizar a utilização da capacidade instalada de pesquisa dos laboratórios envolvidos;
- c) Realizar intercâmbios de estudantes, técnicos e pesquisadores;
- d) Elaborar projetos interinstitucionais visando à captação de recursos financeiros;
- e) Padronizar as condições de pesquisa (utilização de meio de cultivo de base em comum);

- f) Evitar duplicidade de pesquisas;
- g) Integrar os grupos de pesquisa envolvidos: grupo de discussão na internet, HP própria, encontros anuais (apresentação de resultados e definição de futuros protocolos);
- h) Colaboração científica efetiva (elaboração conjunta de artigos científicos, patentes, produtos e processos- formulário de colaboração científica).

8.2 LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DA UFRN

Esta parceria, representada na pessoa da Prof^o. Dr^o. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha. Sua principal atuação consiste em prover subsídios para a realização das atividades relacionadas à extração, identificação, quantificação, caracterização e funcionalidade dos GAGs. Para isto os alunos serão treinados para poderem desenvolver os protocolos a serem aplicados na extração e identificação do glicosaminoglicanos do útero, tuba uterina e placenta dos catetos.

Também se aplica a este parceiro a exemplo do parceiro anterior:

- a) Realizar intercâmbios de estudantes, técnicos e pesquisadores;
- b) Elaborar projetos interinstitucionais visando à captação de recursos financeiros;
- c) Padronizar as condições de pesquisa (utilização de meio de cultivo de base em comum);
- d) Evitar duplicidade de pesquisas;
- e) Integrar os grupos de pesquisa envolvidos: grupo de discussão na internet, HP própria, encontros anuais (apresentação de resultados e definição de futuros protocolos);
- f) Colaboração científica efetiva (elaboração conjunta de artigos científicos, patentes, produtos e processos- formulário de colaboração científica).

Em suma, as parcerias serão de sobremaneira importante para o apoio logístico na realização do projeto, através de assessoramento técnico-científico, bem como do treinamento de estudantes de graduação e pós-graduação para a realização dos experimentos. Mediante esta parceria, estão ainda firmados acordos de cooperação e uso conjunto da infra-estrutura de ambos os laboratórios no presente e em posteriores estudos.

9. DISPONIBILIDADE EFETIVA DE INFRAESTRUTURA E DE APOIO TÉCNICO PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

A Universidade Federal Rural do Semi-Árido conta com um Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) registrado junto ao IBAMA como criador científico (Registro nº 1478912) onde serão coletadas as amostras. Além disto, possui estrutura laboratorial onde serão desenvolvidos os experimentos envolvendo dissecação do material e processada as amostras, para microscopia de luz, imunohistoquímica e culturas celulares. No entanto, não dispõe de um microscópio eletrônico de transmissão e, por isto utilizará o equipamento existente na instituição colaboradora. Ressalta-se que, parte das condições de infraestrutura, hoje existente na UFERSA, para atividades no laboratório de morfofisiologia aplicada, foram adquiridos com recursos do CNPq, fato pelo qual estamos solicitando basicamente material de consumo. Por meio destes financiamentos, foram

adquiridos equipamentos básicos para funcionamento do laboratório de morfofisiologia aplicada, os quais possibilitarão a execução do projeto, como microscópios acoplados a sistema computadorizado de captura e edição de imagens, congelador biológico automático programável, estufa, botijões criobiológicos, dentre outros. Além disso, o referido laboratório consta de um técnico laboratorial, médico veterinário formado, com mestrado em Ciência Animal, apto a auxiliar na execução do projeto.

O CEMAS conta com técnicos com habilidades para auxiliar na execução do projeto sem que ocorra risco do mesmo não ser executado, no que se refere a manejo alimentar e sanitário dos animais.

A Universidade também assumirá como efeito de contrapartida despesas com deslocamento de membros da equipe e aquisição de parte do material necessário à execução do projeto.

10. ORÇAMENTO

RECURSOS SOLICITADOS				
Recursos	Qtde	Meses	Valor Individual (R\$)	Valor Total (R\$)
Bolsa de Produtividade em Pesquisa 1D (Duração 48 meses)	1	48	1.100,00	59.600,00
Adicional de Bancada	1	48	1.000,00	48.000,00
Total				105.600,00

11. POTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS DO PONTO DE VISTA TÉCNICO-CIENTÍFICO, DE INOVAÇÃO, DIFUSÃO, SÓCIO-ECONÔMICO E AMBIENTAL

Os catetos são animais de silvestres que nos dois últimos anos têm sido objeto de pesquisa por estudiosos visando resgatar a composição das populações e consequente possibilidade de serem criados em cativeiro como forma de garantir a sustentabilidade da espécie. Atento a estas questões e considerando a importância da espécie, estudos têm sido desenvolvidos no sentido de coletar informações sobre características morfofuncionais, fisiológicas e de melhoramento genético e reprodutivo desses animais.

Com base nestas considerações optou-se por pesquisar o sistema reprodutor feminino desses animais, uma vez que existem alguns aspectos relacionados à morfofisiologia do mesmo que dificultam o desenvolvimento de biotécnicas de reprodução, dentre eles o estabelecimento de um protocolo padrão para sincronização de cio, além de não existir na literatura informações acerca da relação entre os hormônios e GaGs ao longo do processo gestacional. Desse modo, o estudo do sistema reprodutor considerará a influência dos GaGs em tecidos de fêmeas penhez e de fêmeas vazias.

Nos tocante aos aspectos de formação de recursos humanos e produção científica, espera-se formar, ao longo do projeto, alunos de iniciação científica bolsistas e/ou voluntários, bem como estagiários, resultando em formação de recursos humanos para pesquisa e desenvolvendo a consciência crítica em alunos de graduação da UFERSA. O estudo irá contribuir ainda com a formação de alunos de pós-graduação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA em nível de mestrado e de doutorado.

Todas estas participações e formações, aliadas ao expressivo montante de informações que se espera gerar, certamente, serão determinantes para a produção de artigos e resumos científicos pela equipe. Assim, com base nos objetivos e metodologia propostos espera-se como principal resultado científico do projeto espera-se:

- a) Contribuir com a aquisição de informações relacionadas à morfofisiologia do útero, tuba uterina e placenta da espécie de forma que se possa inferir qual o papel dos GAG's no processo gestacional destes catetos;
- b) Contribuir com a formação de recursos humanos orientando três alunos de graduação, um aluno de mestrado e um aluno de doutorado;
- c) Produzir resultados que possam suscitar o interesse da comunidade científica a desenvolver outros tipos de pesquisas com a espécie em questão;
- d) Produzir informações científicas acerca da morfologia da espécie que possam contribuir para o desenvolvimento de estudos na área de reprodução animal e clínica veterinária, a exemplo do que se aponta com a biotécnica de reprodução;
- e) Aplicar as informações obtidas após a finalização do projeto, para a interpretação de novos estudos com placentação de catetos, visando à inserção de novos conhecimentos fisiológicos;
- f) Fortalecer a linha de pesquisa na área de placentação utilizando modelos de placentação de animais domésticos, uma vez que já trabalhamos há algum tempo com de animais silvestres, mas utilizando-se de informações em nível mais funcional, de modo a permitir publicações de artigos em periódicos de elevado fator de impacto;
- g) Considerando que não existe na literatura especializada sobre morfofisiologia de placentação, especialmente, sobre o desenvolvimento embriológico de catetos, pretende-se num breve período de tempo compilar os dados obtidos publicados em um livro sobre desenvolvimento embrionário de catetos, conjuntamente com nosso grupo de pesquisa parceiro, uma vez que as informações existentes com embriões da espécie carecem de complementares a fim de tornarem mais precisas.

12 COMPILAÇÃO SUCINTA DAS ATIVIDADES DE PESQUISA DESENVOLVIDAS NO PERÍODO ATÉ 2019, CONSIDERADAS ORIENTAÇÕES E ARTIGOS CIENTÍFICOS.

12.1 ORIENTAÇÕES DE ALUNOS DE MESTRADO E DOUTORADO - 2013 -2015 – FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS

1 - André Menezes do Vale. Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). Início: 2011. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

2 - Carlos Magno Oliveira Júnior. Morfologia das Glândulas Salivares Maiores em Catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1766). Início: 2014. Tese (Doutorado em Programa de

Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

3 - Carlos Magno Oliveira Júnior. Morfologia das Glândulas Salivares Maiores em Cutias (*Dasyprocta aguti tajacu* Linnaeus, 1758). Início: 2012. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

4 – Felipe Venceslau Câmara. Morfologia da glândula pineal de preá (*Galea spixii* wagler, 1831) e cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). Início: 2013. Tese (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

5 - Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra. Alterações morfológicas na placenta e no ovário de preás (*Galea spixii* wagler, 1832) aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Início: 2014. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

6 - Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra. A subplacenta do Preá (*Galea spixii* Wagler, 1831). Início: 2012. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

7 - Gleidson Benevides de Oliveira. Desenvolvimento placentário em cutias (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1756). Início: 2010. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador). Concluída.

8- Herson da Silva Costa. Morfologia do encéfalo de emas (*Rhea americana americana* Linnaeus, 1758). Início: 2016. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Moacir Franco de Oliveira). Concluído (2018).

9 - João Paulo Araújo Fernandes de Queiroz. Dinâmica térmica em (*Galea spixii* wagler, 1831) e cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). Início: 2012. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

10 - Júlio Cesar dos Reis Saraiva. Vascularização do Encéfalo do Cateto (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). Início: 2013. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (Orientador). Concluída.

12.2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

1. MAIA, K.M.; SOUZA, A.L.P.; SILVA, A.M.; SOUZA-JR, J.B.F.; COSTA, L.L.M.; BRANDÃO, F.Z.; **OLIVEIRA, M. F.**; COMIZZOLI, P.; SILVA, A.R. Environmental effects on collared peccaries (*Pecari tajacu*) serum testosterone, testicular morphology, and semen quality in the Caatinga biome. **THERIOGENOLOGY**, v. 126, p. 286-294, 2019.
2. BEZERRA, L.G.P.; SOUZA, A.L.P.; LAGO, A.E.A.; CAMPOS, L.B.; NUNES, T.L.; PAULA, VALÉRIA V.; **OLIVEIRA, M. F.**; SILVA, A.R. Addition of Equex STM to Extender Improves Post-Thawing Longevity of Collared Peccaries' Sperm. **BIOPRESERVATION AND BIOBANKING**, v. 00, p. bio.2018.0096, 2019.
3. BRAZ, J.K. F. S.; MARTINS, G.M.; SABINO, V.; VITORIANO, J.O.; BARBOZA, C. A.G.; SOARES, A.K.M.C.; ROCHA, H.A.O.; **OLIVEIRA, M. F.**; ALVES JÚNIOR, CLODOMIRO; MOURA, C.E.B. Plasma nitriding under low temperature improves the endothelial cell biocompatibility of 316L stainless steel. **BIOTECHNOLOGY LETTERS (ONLINE)**, v. x, p. 1-8, 2019.
4. SILVA, H. V. R.; PEREIRA N., T.G.; RIBEIRO, L.R.; DE FREITAS, L.A.; DE **OLIVEIRA, M.F.**; DE ASSIS NETO, A.C.; SILVA, A.R.; DA SILVA, L.D. MACHADO. Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. **ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE**, v. 203, p. 84-93, 2019.
5. PRAXEDES, E.A.; DE OLIVEIRA, L.R.; SILVA, M.B.; BORGES, A.A.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.V.; RODRIGUES SILVA, H.V.; **OLIVEIRA, M.F.**; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin - An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). **CRYOBIOLOGY**, v. 88, p. 15-22, 2019.
6. LIMA, GABRIELA L.; LUZ, VALESCA B.; LUNARDI, FRANCIELE O.; SOUZA, ANA L.P.; PEIXOTO, GISLAYNE C. X.; RODRIGUES, ANA PAULA R.; **OLIVEIRA, M. F.**; SANTOS, REGIANE R. ; SILVA, ALEXANDRE R. Effect of cryoprotectant type and concentration on the vitrification of collared peccary (*Pecari tajacu*) ovarian tissue. **ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE**, v. 205, p. 126-133, 2019.
7. DE ARO, MARIAN MAZETO ; DOS SANTOS, AMILTON CESAR ; DA SILVEIRA, ERICK EDUARDO ; DA SILVA LISBOA NETO, ANTÔNIO FRANCISCO ; **OLIVEIRA, M. F.**; DE ASSIS NETO, ANTÔNIO CHAVES . Morphological tools to evaluate the digestory apparatus in rocky cavy (*Kerodon rupestris*). **MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE**, v. 82, p. 696-708, 2019.
8. DE QUEIROZ, J. P. A. F.; DE SOUZA, J. B. F.; DE MORAIS OLIVEIRA, V. R.; DE SOUZA CASTELO, T.; TAVARES DANTAS, M.R.; DE MACEDO COSTA, L. L.; **DE OLIVEIRA, M.F.** Sensible heat transfer and thermal windows

- in *Dasyproctaleporina* (Mammalia, Rodentia). **BIOLOGICAL RHYTHM RESEARCH**, v. 50, p. 1-13, 2018.
9. COSTA, H. S.; ARAUJO-JUNIOR, H. N.; BEZERRA, F. V. F.; REBOUCAS, C. E. V.; MENEZES, D. J. A.; MOURA, C. E. B.; **OLIVEIRA, M. F.**. Anatomia macroscópica e vascularização do encéfalo de emas (*Rhea americana americana*). **ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE (ONLINE)**, v. 46, p. 1-8, 2018.
 10. SANTOS, E.A.A.; LIMA, G.L.; PRAXEDES, E.C.G.; SILVA, A.M.; MAIA, K.M.; **OLIVEIRA, M.F.**; RODRIGUES, A.P.A.R.; SILVA, A.R. Estimation, morphometry and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in agouti (*Dasyproctaleporina*). **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE)**, v. 38, p. 175-182, 2018.
 11. MACEDO, L.B.; MOURA, C.E.B.; **OLIVEIRA, M.F.**; PAULA, V.V.; BEZERRA, F.V.F.; QUEIROZ, G. F. . Imunolocalização de receptores de leptina no ovário de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE)**, v. 38, p. 558-564, 2018.
 12. DE QUEIROZ NETA, L.B.; LIRA, G.P.D.O.; BORGES, A. A.; SANTOS, M.V.D.O.; SILVA, M.B.; DE OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, A. R.; DE OLIVEIRA, M. F.; PEREIRA, ALEXSANDRA FERNANDES . Influence of storage time and nutrient medium on recovery of fibroblast-like cells from refrigerated collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) skin. **IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY. ANIMAL (ONLINE)**, v. 54, p. 486-495, 2018.
 13. SANTOS, A.C.; **OLIVEIRA, M.F.**; ASSIS NETO, A.C. Concentration of testosterone and estradiol in pregnancy and steroidogenesis in the placenta, ovaries and testes of spix cavy conceptus. **PLACENTA**, v. 69, p. e18-e18, 2018.
 14. BOLINA, C.D.S.; REGINATO, G. D. S.; WATANABE, II-SEI; **OLIVEIRA, M. F.**; ALMEIDA, S. R. Y.; CIENA, A. P. Morphologic Characteristics of the Submandibular Salivary Gland of the Collared Peccary (*Tayassu Tajacu*). **JOURNAL OF MORPHOLOGICAL SCIENCES**, v. 35, p. 116-121, 2018.
 15. BORGES, A. A.; SANTOS, M.V.; QUEIROZ NETA, L. B.; **OLIVEIRA, M.F.**; SILVA, A.R.; Pereira, A.F. In vitro maturation of collared peccary (*Pecari tajacu*) oocytes after different incubation times. **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE)**, v. 38, p. 1863-1868, 2018.
 16. BEZERRA, F.V.F.; FAVARON, P.O.; MESS, A.M.; ARAUJO-JUNIOR, H.N.; OLIVEIRA, G.B.; PEREIRA, A.F.; MIGLINO, M.A.; **OLIVEIRA, M.F.** Subplacental development in *Galea spixii*. **ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE (ONLINE)**, v. 38, p. 2175-2182, 2018.
 17. DOS SANTOS, A.C.; CONLEY, A.J.; DE OLIVEIRA, M.F.; DE ASSIS NETO, A.C. Development of urogenital system in the Spix cavy: A model for studies on sexual differentiation. **DIFFERENTIATION**, v. 101, p. 25-38, 2018.

18. DOS SANTOS, AMILTON CESAR; CONLEY, ALAN JAMES; **OLIVEIRA, M. F.**; **OLIVEIRA, G.B.**; VIANA, D.C.; ASSIS NETO, A.C.D. Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the vaginal mucous of *Galeaspixii* during the estrous cycle. **REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY**, v. 15, p. 1-8, 2017.
19. SILVA, A.M.; SOUSA, P.C.; CAMPOS, L.B.; BEZERRA, J.A.B.; LAGO, A. E. A.; **OLIVEIRA, M.F.**; SILVA, A.R. Comparison of different extenders on the recovery and longevity of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies (*Galeaspixii* Wagler, 1831). **ZYGOTE**, v. 25, p. 176-182, 2017.
20. BORGES, A.A.; LIMA, G.L.; DE QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.D.O.; **OLIVEIRA, M.F.**; SILVA, A.R.; PEREIRA, A. F. Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques. **CYTOTECHNOLOGY**, v. 69, p. 643-654, 2017.
21. MENEZES, D.J.A.; SILVA, A.R.N.; VIEIRA, F.A.S.; SILVA NETO, R.B.; **OLIVEIRA, M. F.**; PORTAL, M.J.I.; ASSIS NETO, A.C.; SANTOS, J.R.S.; CARVALHO, M.A.M. Morfologia e dinâmica testicular em cutias (*Dasyprocta pygmaea*) adultas. **ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA**, v. 69, p. 997-1005, 2017.
22. OLIVEIRA, G.B.; DE ARAUJO JUNIOR, H.N.; DA SILVA COSTA, H.; SILVA, A.R.; DE MOURA, C.E.B.; DE OLIVEIRA ROCHA, H.A.; MIGLINO, M.A.; DE **OLIVEIRA, M. F.** Post-implantation development of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). **ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE**, v. 182, p. 35-47, 2017.
23. LOPES, K.R.F.; LIMA, G.L.; BEZERRA, L.G.P.; BARRETO-JUNIOR, R.A.; **OLIVEIRA, M.F.**; SILVA, A.R. Characterization of the ovarian preantral follicle populations and its correlation with age and nutritional status in Brazilian Northeastern donkeys (*Equus asinus*). **ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE**, v. 187, p. 193-202, 2017.
24. **OLIVEIRA, M.F.**; OLIVEIRA, G.B.D.; BEZERRA, F.V.F.; CÂMARA, F.V.; PEREIRA, A.F.; SILVA, A.R.; MIGLINO, M.A. The placental barrier of *Kerodon rupestris* (Rodentia: caviidae). **BIOSCIENCE JOURNAL (ONLINE)**, v. 32, p. 208-218, 2016.
25. DOS SANTOS, A.C.; OLIVEIRA, G.B. ; VIANA, D.C.; **OLIVEIRA, M. F.**; SILVA, R.D.S.; RICI, R.E.G.; DE OLIVEIRA, M.F.; DE ASSIS-NETO, A. C. Development and morphological changes in the vaginal closure membrane throughout gestation in *Galeaspixii* (Rodentia: Caviidae). **MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE (PRINT)**, v. 79, p. 359-364, 2016.
26. FAVARON, P.O.; **OLIVEIRA, M F.**; BORGHESI, J.; ANUNCIACÃO, A.R.D.A.; MIGLINO, M.A. Development and maturation of the lung in fetuses of

- Galeaspixii and expression of markers. **CIÊNCIA RURAL**, v. 46, p. 1635-1641, 2016.
27. BATISTA, J.S.; FREITAS, C.I.A.; BRILHANTE, F.S.; VIANA, G.A.; OLINDA, R.G.; CAVALCANTE, T.V.; PAIVA, K.A.R.D.; **OLIVEIRA, M.F.** Alterações patológicas do sistema genital de cutias (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1758) fêmeas criadas em cativeiro. **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE)**, v. 36, p. 634-641, 2016.
28. SANTOS, M.L.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.; **OLIVEIRA, M.F.**; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. In vitro culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements. **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE)**, v. 36, p. 1194-1202, 2016.
29. ARROYO, M.A.M.; SANTOS, P.R.S.; **OLIVEIRA, M.F.**; CONLEY, A.J.; ASSIS NETO, A.C. Immunolocalization of aromatase and estrogen receptor β in the testis and epididymis of agoutis (*Dasyprocta leporina*) during postnatal development. **ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE**, v. 169, p. 130, 2016.
30. MIRANDA-MOURA, M.T.M.; OLIVEIRA, G.B.; PEIXOTO, G.C.X.; PESSOA, J.M.; PAPA, P. C.; MAIA, M.S.; MOURA, C.E.B.; OLIVEIRA, M.F. Morphology and vascularization of the corpus luteum of peccaries (*Pecari tajacu*, Linnaeus, 1758) throughout the estrous cycle. **ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (ONLINE)**, v. 68, p. 87-96, 2016.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTRICHTER, M.; TABER, A.; NOSS, A.; MAFFEI, L.; CAMPOS, J. *Catagonus wagneri*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2015**. Cambridge, 2015. DOI <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T4015A72587993>. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/4015/72587993>. Acesso em: 29 jul. 2019.

BEACHLEY, V.; MA, G.; PAPADIMITRIOU, C.; MATT, G.; CORVELLI, M. ELISSEFFI, J. Extracellular matrix particle–glycosaminoglycan composite hydrogels for regenerative medicine applications. **Journal of Biomedical Materials**. v.106A, n. 1.149, P. 147 - 159, 2018.

BELLAICHE Y, THE I, PERRIMON N. Toutvelu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. **Nature** n. 394, p. 85 - 88, 1998.

BERTO, A. G. A. Galactosaminoglycans from normal miometrium and leiomyoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.633-637, 2001.

BOLINA, C.D.S.; REGINATO, G. D. S.; WATANABE, II-SEI.; OLIVEIRA, M. F.; ALMEIDA, S. R. Y.; CIENA, A. P. Morphologic Characteristics of the Submandibular Salivary Gland of the Collared Peccary (TayassuTajacu). **Journal of Morphological Sciences**, v. 35, p. 116-121, 2018.

BORGES, A. A.; LIRA, G. P.O.; NASCIMENTO, L. E.; QUEIROZ NETA, L. B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F. Influence of Cryopreservation Solution on the In Vitro Culture of Skin Tissues Derived from Collared Peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, p. 77-1, 2017.

BORGES, A. A.; SANTOS, M.V.; QUEIROZ NETA, L. B.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; Pereira, A.F. In vitro maturation of collared peccary (*Pecari tajacu*) oocytes after different incubation times. **Pesquisa Veterinária Brasileira (ONLINE)**, v. 38, p. 1863-1868, 2018.

BRASIL. Lei nº 5.197/1967, de 03 de janeiro de 1967. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 177, 03 janeiro. 2002.

CECHOWSKA-PASKO, M.; PALKA, J. BANKOWSKI, E. Decreased in glycosaminoglycans content in the skin of diabetic rats: the role of IGI-I, IGF-binding proteins and proteolytic activity. **Mol. Cell. Bio. Chem.**, v.154, p.1-8, 1996.

CHEN, C. P.; S. C. CHANG; YANG, W. C. V. High glucose alters proteoglycan expression and the glycosaminoglycan composition in placentas of women with gestacional diabetes mellitus and in cultured trophoblasts. **Placenta**, v.28, n.2-3, p.97-106, 2007.

CUBAS, J. J. M. SIMÕES, R.S. OLIVIERA-FILHO, R.M. SIMÕES, M.J. BARACAT, E.C. SOARES-JUNIOR, J.M et al. Glycosaminoglycan Distribution in the Rat Uterine Cervix During the Estrous Cycle. **Clinics**, v.65, n.7, p.703–708, 2010.

DA SILVA, S. S. B.; LE PENDU, Y.; OHASHI, O. M.; OBA, E.; ALBUQUERQUE, N. I.; GARCIA, A. R.; MAYOR, P.; DE ARAUJO, G., D. A. Sexual behavior of *Pecari tajacu* (Cetartiodactyla: Tayassuidae) during periovulatory and early gestation periods. **Behavioural Processes** (Print), v. 131, p. 68-73, 2016.

DE ANDRADE, R. S.; MONTEIRO, F. O. B.; EL BIZRI, H. R.; PANTOJA, L.; BODMER, R.; VALSECCHI, J.; MAYOR, P. Embryonic and fetal development of the white-lipped peccary (*Tayassu pecari*). **Theriogenology**, v. 119, p. 163-174, 2018.

DE QUEIROZ NETA, L. B.; LIRA, G. P. O.; BORGES, A. A.; SANTOS, M. V. O.; SILVA, M. B.; DE OLIVEIRA, L. R. M. ; SILVA, A. R.; OLIVEIRA, M. F.; PEREIRA, A. F. Influence of storage time and nutrient medium on recovery of fibroblast-like cells from refrigerated collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) skin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. ANIMAL (ONLINE), v. 54, p. 486-495, 2018.

DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.343, p.34-44, 1974.

DIETRICH, C. P.; A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.17, p.5-15, 1984.

DUBOIS, M; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EL MARADNY, E. KANAYAMA, N, KOBAYASHI, H, HOSSAIN, B, KHATUN, S, LIPING, S, KOBAYASHI, T, TERAQ, T. The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. **Human Reproduction**, v.12, p.1080-1088, 1997.

ESKO, J. D. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.3, p.805-806, 1991.

FELDNER JÚNIOR, P. C.; KOBAYASHI, E. Y.; SARTORI, M. G. F.; NADER, H. B.; BARACAT, E. C.; GIRÃO, M. J. B. C. Avaliação dos glicosaminoglicanos do tecido periuretral de pacientes com e sem prolapso. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.54, n.2, p.173-177, 2008.

FOSANG, A. J. HANDLEY, C.J. SANTER, V. LOWTHER, D.A. THORBURN, G.D. Pregnancy-Related Changes in the Connective Tissue of the Ovine Cervix. **Biology of Reproduction**, v.30, p.1223-1235, 1984.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **J. Intern. Med.**, v.242, p.27-33, 1997.

GOLICHOWSKI, A M.; KING, S. R.; MASCARO, K. Pregnancy-related changes in rat cervical glycosaminoglycans. **Biochemical Journal**, v.192, p.1–8, 1980.

GOMES, R. C. T.; SIMÕES, R. S.; SOARES JÚNIOR, J. M.; NADER, H. B.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, E. C. Perfil de glicosaminoglicanos sulfatados no útero de camundongas durante o ciclo estral. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.53, n.3, p.261-266, 2007.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In **Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (eds.) Mammal Species of the World, Third Edition.** The Johns Hopkins University Press, Baltimore.: 637-722, 2005.

HALME, J., WOESSNER, J. F. Effect of progesterone on collagen breakdown and tissue collagenolytic activity in the involuting rat uterus. **Journal of Endocrinology**, v. 66, n.3, p. 357–362, 1975.

HARRINGTON, K.; CARPENTER, R. G; GOLDFRAD, C.; CAMPBELL, S. Transvaginal ultrasound of the uteroplacental circulation in the early prediction of pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.104, n.6, p.674-681, 1997.

HEINEGARD, D. Proteoglycans and more from molecules to biology. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.90, p.575-586, 2009.

JOKIMAA, V., INKI P., KUJARI H., HIRVONEN, O., EKHOLM, E., ANTTILA L. Expression of syndecan-1 in human placenta and decidua. **Placenta**, v.19, n.2-3, p.157-163, 1998.

KAWAKAMI, E., ARAI, T., OISHI, I., HORI, T., TSUTSUI T. Induction of Dog Sperm Capacitation by Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Amounts of Oviductal and Uterine Fluids in Bitches. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.62, n.1, p. 65–68, 2000.

KIRN-SAFRAN, C.B.; D'SOUZA, S. S.; CARSON, D. D. Proteoglicanos de sulfato de heparan e suas proteínas de ligação na implantação e placentação embrionária. **Semin Cell Dev Biol**. V. 19, n. 2, p. 187 – 93, 2008.

KITAGAWA H, IZUMIKAWA T, MIZUGUCHI S, DEJIMA K, NOMURA KH, EGUSA N, TANIGUCHI F, TAMURA J, GENGYO-ANDO K, MITANI S, NOMURA K, SUGAHARA K. Expression of rib-1, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the human tumor suppressor EXT genes, is indispensable for heparan sulfate synthesis and embryonic morphogenesis. **Journal Biology Chemistry**. n. 282, p. 8533 - 8544, 2007.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: Structures and Interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v.60, p. 443-475, 1991.

KRESSE, H; SCHÖNHER, E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **J. Cell Physiol.**, v.189, p.266-274, 2001.

LEE, T.Y.; JAMIESON, A. M.; SCHAFER, I. A. Change in the composition and structure of glycosaminoglycans in the human placenta during development. **Pediat. Res.**, v.7, p.965-977, 1973.

LEE, C. N.; AX, R. L. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. **Journal of Dairy Science.**, v.67, n.9. p. 2006-2009, 1984.

LIN X, WEI G, SHI Z, DRYER L, ESKO JD, WELLS DE, MATZUK MM. Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. **Development Biology**. N. **224**, p. 299 - 311, 2000.

MAHMOUD, A.I.; PARRISH, J.J. Oviductal fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p. 554-560, 1996.

MAIA, K.M.; Souza, A.L.P.; SILVA, A. M.; SOUZA-JR, J.B.F.; COSTA, L.L.M.; BRANDÃO, F.Z.; Oliveira, M.F.; COMIZZOLI, P. ; SILVA, A.R. Environmental effects on collared peccaries (*Pecari tajacu*) serum testosterone, testicular morphology, and semen quality in the Caatinga biome. **Theriogenology**, v. 126, p. 286-294, 2019.

MAYOR, P.; DA SILVA, G. P.; ANDRADE, R. S. DE; MONTEIRO, F. O. B.; EL BIZRI, H. R. Embryonic and fetal development of the collared peccary (*Pecari tajacu*). **Animal Reproduction Science**, v. 208, p. 106123, 2019.

MCNUTT, T. ROGOWSKI, L., VASOLATOS-YOUNKEN, R. KILIAN. G. Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 33, p. 313-323, 1992.

MERLE, B., DURUSSEL, L., DELMAS, P.D, CLÉZARDIN, P. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.75, p.538-546, 1999.

MIRANDA; R. J. S; DIAS, R. S.; GOMES, A. P.; ROSSI, G. F. A viabilidade econômica da criação de caititus (*Tayassutajacu*): um estudo de caso. In: 48º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2010, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande: SOBER, 2010.

MIRANDA-MOURA, M.T.M.; OLIVEIRA, G.B.; PEIXOTO, G.C.X.; PESSOA, J.M.; PAPA, P. C.; MAIA, M.S.; MOURA, C.E.B.; OLIVEIRA, M.F. Morphology and vascularization of the corpus luteum of peccaries (*Pecari tajacu*, Linnaeus, 1758) throughout the estrous cycle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (ONLINE), v. 68, p. 87-96, 2016.

NASCIUTTI, L.E. et al. Distribution of chondroitin sulfate in human endometrium. **Micron**, v.37, n.6, p.544-550, 2006.

NORTH, R. A.; FERRIER, C.; LONG, D.; TOWNEND, K.; KINCAID-SMITH, P. Uterine artery doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. **Obstetrics and Gynecology**, New York, 83(3): 378-386, 1994.

NOWAK, R.M, PARADISO, J.L. **Walker's Mammals of the World**. The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, 1: i–xlvi+ 1–568+ xlvii–xli and 2: i–x+ 569–1362+ xi–xxv, illustrated, 1983.

OLIVEIRA, M. F. **Placentação em mocós, *Kerodon rupestris* Wied 1820**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 193. 2013.

PARRISH, J. J, SUSKO-PARRISH, J.L, UGUZ, C, FIRST, N.L. Differences in the role of cyclic adenosine 3,5-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. **Biology Reproduction**, v.51, p. 1099–1108, 1994.

PARRY, L.; BARLOW, J.; PERES, C. A. Hunting for Sustainability in Tropical Secondary Forests. **Conservation Biology**, v. 23, n. 5, p. 1270–1280, 2009.

PRYDZ, K. Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. **Biomolecules**. v.5, p. 2003 - 2022, 2015.

REYNOLDS L. P.; REDMER D. A. Utero-placental vascular development and placental function. **Journal Animal Science**, v.73, p.1839–1851, 1995.

REYNOLDS, L. P; REDMER, D. A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction**, v.64, n.4, p.1033-1040 2001.

SAID, J.M. The role of proteoglycans in contributing to placental thrombosis and fetal growth restriction. **Journal of pregnancy**, v.2011.p.1-4, 2011.

SANTOS, D. O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. Criação comercial de caítilus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2009.

SANTOS, E. A. A.; LAGO, A. E. A.; SOUSA, P. C.; SILVA, A. M.; PAIVA, A. L. C.; PAULA, V. V.; PEREIRA, A. F.; MOURA, A. A. A.; SILVA, ALEXANDRE R. Superoxidodis mutase and catalase activity in collared peccary (*Pecari tajacu*) seminal plasma and their relation to sperm quality. **Semina Ciências Agrárias**, v. 39, p. 787-796, 2018.

SONNER, JUSSARA BARREIRA ; SANTOS, T. C. ; MIGLINO, Maria Angelica. Morfologia dos testículos em queixadas (*Tayassu pecari* Link 1795). In: Simpósio sobre inovações Científicas e Tecnológicas em Reprodução Animal, 2002, São Paulo. Revista Brasileira de Reprodução Animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v. 26. p. 83-85.2002.

SOWLS, L. K. **Javelinas and other Peccaries: their biology, management, and use.** 2nd ed. Tucson: University of Arizona Press, 1997.

SUN, C.; MARCELLO, M.; LI, Y. MASON, D.; LÉVY, R.; FERNIG, D. G. Selectivity in glycosaminoglycan binding dictates the distribution and diffusion of fibroblast growth factors in the pericellular matrix. **Open Biology**. V. 6, n. 3. 2016.

TEIXEIRA, F. A.; TONARELLI, C.; SANTOS, T. C.; OLIVEIRA, Moacir Franco; MIGLINO, Maria Angelica. Aspectos ultraestruturais da tuba uterina de catetos (*Tayassutajacu*) prnhes e não prnhes. **In: XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. ABRAVAS, 2007, São Paulo. XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. ABRAVAS CD, v. 1. p. 1-1, 2007.**

TOLOSA, E. M. C; RODRIGUES, C. J; BEHMER, O. A; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 2. ed. Barueri: Manole, 2003. p331.

TONARELLI, C.; SANTOS, T. C.; OLIVEIRA, Moacir Franco; MIGLINO, Maria Angelica. Proliferação celular em placenta e útero de cateto (*Tayassutajacu*). **In: XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. ABRAVAS, 2007, São Paulo. XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. ABRAVAS CD, v. 1. p. 1-1 2007.**

TORRES, S. M. P. S.; NADER, H. B.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J.; FUCHS, L. F. P.; SOARES-JR, J. E. M.; GOMES, R. C. T. Concentration of sulfated glycosaminoglycans in the mammary tissue of female rats with the aging and about hormonal influence. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n.1, p. 64-68, 2018.

TRUDINGER, B. J.; GILES, W. B.; COOK, C. M. Uteroplacental blood flow velocity-time waveforms in normal and complicated pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.92, n.1, p.39-45, 1985.

VALLET, J.L., FREKING, B.A. Differences in placental structure during gestation associated with large and small pig fetuses. **Journal Animal Science**. v. 85, 3267–3275, 2007.

Vallet, J. L.; Miles, J. R. Freking, B. A. Effect of fetal size on fetal placental hyaluronan and hyaluronoglucosaminidases throughout gestation in the pig. **Animal Reproduction Science**. v. 118, 297 – 309, 2010.

WARDA, M, ZHANG, F, RADWAN, M, ZHANG, Z, KIM, N, KIM, Y.N, LINHARDT, R.J., HAN J. Is human placenta proteoglycan remodeling involved in pre-eclampsia **Glycoconjugate Journal**, v.25, n.5, p.441-450, 2008.

WOESSNER, J. R. Total, latent and active collagenase during the course of postpartum involution of the rat uterus. Effect of oestradiol. **Biochemical Journal**, v. 180, p. 95-102, 1979.

WRIGHT, S. J.; DUBER, H. C. Poachers and forest fragmentation alter seed dispersal, seed survival, and seedling recruitment in the palm Attaleabutyraceae, with implications for tropical tree diversity. **Biotropica** 33: 583-595, 2001.

YANG, W.C, SU, T.H, YANG, Y.C, CHANG, S.C, CHEN, C.Y, CHEN, C.P. Altered perlecan expression in placental development and gestacional diabetes mellitus. **Placenta**, v.26, n.10, p.780-788, 2005.