



Obtenção de oócitos *post mortem* em *Leopardus tigrinus* Schreber, 1775 – Relato de Caso

Obtention of post mortem oocytes in Leopardus tigrinus Schreber, 1775 - Case Report

Artur da Nóbrega Carreiro¹, Ana Yasha Ferreira De La Salles¹, Brunna Muniz Rodrigues Falcão¹,
Joyce Galvão de Souza², Débora Vitória Fernandes de Araújo², Norma Lúcia de Souza³, Ana Karoline
Rocha Vieira², José Rômulo Soares dos Santos³, Otávio Brilhante de Sousa^{1,2},
Danilo José Ayres de Menezes^{1,4,5}

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, 58708-110, Patos, Paraíba, Brasil.

²Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

³Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil.

⁴Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁵Correspondência: arturpets1992@gmail.com

Resumo

Entre as várias técnicas utilizadas para a preservação e manejo de espécies selvagens, as biotécnicas aplicadas à reprodução são apresentadas como alternativas promissoras na conservação do germoplasma de espécies ameaçadas, além de fornecer dados cada vez mais detalhados sobre a fisiologia reprodutiva dessas espécies. O presente relato pretende demonstrar a aplicabilidade da técnica de fatiamento ovariano (*slicing*) na recuperação de oócitos *post mortem* em um exemplar de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) vítima de atropelamento, observando a quantidade de oócitos e seus respectivos graus morfológicos para uma possível maturação celular. Um total de 88 oócitos foram coletados e estes foram classificados em três graus de acordo com sua conformação. A técnica de corte de ovário foi viável para a recuperação de oócitos na espécie e apresentou um número considerável de coleta com ovários em ótimo estado de conservação, no entanto, sugere-se a realização de estudos adicionais para obter dados complementares.

Palavras-chave: felino, gato selvagem, reprodução, felídeo.

Abstract

*Among the various techniques used for the preservation and management of wild species, biotechniques applied to reproduction are presented as promising alternatives in the conservation of the germplasm of endangered species, as well as providing increasingly detailed data on the reproductive physiology of these species. The present report intends to demonstrate the applicability of the slicing technique in the recovery of postmortem oocytes in a small leopard (*Leopardus tigrinus*), a victim of trampling, observing the amount of oocytes and their respective morphological degrees for possible cell maturation. A total of 88 oocytes were collected and classified into three grades according to their conformation. The ovarian cutting technique was feasible for the recovery of oocytes in the species and presented a considerable number of ovarian collection in excellent condition, however, it is suggested to carry out additional studies to obtain complementary data.*

Keywords: *feline, wild cat, reproduction, felidae.*

Introdução

O *Leopardus tigrinus* é a menor espécie de felino do Brasil. Possui porte e proporções corporais semelhantes ao gato doméstico, com comprimento da cabeça e corpo de 49,1cm (40 a 59,1 cm), membros pequenos e proporcionais ao corpo, além de cauda longa, com comprimento de 26,4 cm (20,4 a 32 cm), o que equivale a 60% do comprimento da cabeça e corpo. A massa corporal varia de 1,75 a 3,5 kg (média de 2,4 kg) (Oliveira et al., 2010). Estima-se que nos próximos 15 anos, ou três gerações, ocorrerá um declínio de pelo menos 10% desta população, principalmente pela perda e fragmentação de *habitat* causadas pela expansão agrícola (Oliveira et al., 2013). Uma fonte de obtenção de oócitos é crucial para a preservação de recursos genéticos, conservação de espécies ameaçadas, transgênese e clonagem, por transferência nuclear, para propósitos reprodutivos ou para geração de células-tronco embrionárias para serem utilizadas em medicina regenerativa (Ferraz et al., 2016). O sucesso dessa biotecnologia depende, principalmente, da qualidade oocitária que está diretamente relacionada à presença das células do *cumulus* e às peculiaridades dos métodos de recuperação dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs). O fatiamento ovariano (*slicing*) está entre os métodos de coleta comumente utilizados para obtenção de CCOs ainda não maturados (Ferraz et al., 2016). A recuperação folicular pode ser realizada *post mortem* ou depois de uma ovariectomia, podendo ser recuperados até após 36 horas a partir dos ovários armazenados *ex situ* em meio fisiológico (Johnston et al., 1991). O presente trabalho objetivou a obtenção de oócitos através da técnica de fatiamento ovariano (*slicing*) observando a aplicabilidade

de tal técnica em situações emergenciais como óbitos inesperados, por exemplo, onde a preservação de material genético é crucial, quantificando e qualificando os oócitos coletados em ovários *post mortem* de uma fêmea de *Leopardus tigrinus* vítima de atropelamento, visto que tal técnica tem sido pouco relatada em animais silvestres.

Metodologia diagnóstica utilizada

Utilizou-se uma fêmea da espécie *Leopardus tigrinus*, a qual foi encaminhada ao Parque Zoológico Arruda Câmara, na Cidade de João Pessoa, Paraíba, vítima de atropelamento em uma das rodovias locais, em estado grave, apresentando diversas fraturas, ferimentos e com perdas significativas de sangue. Durante o atendimento, o animal veio a óbito. De imediato foi realizada a coleta de seus dois ovários, ambos foram cuidadosamente dissecados, medidos e pesados e em seguida encaminhados em caixa térmica ao laboratório do Zoológico em tubos com solução fisiológica estéril de NaCl aquecidos a 38°C. Ambos os ovários foram imediatamente colocados em placas de Petri estéreis aquecidas a 38°C com a mesma solução e fatiados individualmente com auxílio de lâminas de bisturi nº 24 estéreis, em cortes transversais, com 1 a 2 mm de espessura. Utilizou-se uma lupa estereomicroscópica (marca Zeiss®, modelo Stemi 2000-C) para a identificação, quantificação e classificação dos oócitos.

O critério avaliativo utilizado para qualificar os oócitos coletados baseou-se na morfologia do Complexo *cumulus ooforos* (COCS) para felinos domésticos (Johnston et al., 1989), sendo classificados em Grau I os que apresentavam pigmentação homogênea e enegrecida do citoplasma, rodeados por células do *cumulus* e *corona radiata* compacta, Grau II os que apresentavam citoplasma ligeiramente pigmentado ou manchado com *corona radiata* e células do *cumulus* envolvendo apenas parcialmente a célula, Grau III os que mostravam-se com formas anormais, pálidos e com ausência das células do *cumulus ooforos* e *corona radiata*. Os métodos foram aprovados pelo Ministério do Meio Ambiente, por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade-SISBIO (Nº 56866-1) do Instituto Chico Mendes-ICMBio.

Resultados e considerações finais

Os ovários apresentavam-se íntegros, relativamente paralelos entre si, caudais aos rins e ligados à cavidade pelos ligamentos suspensores do ovário. O ovário esquerdo e direito pesaram respectivamente 0,9312g e 1,0052g, apresentando estruturas semelhantes a folículos em seus parênquimas (Fig. 1) o mesmo é observado na gata doméstica quanto a localização e morfologia ovariana (Dyce et al., 2010). Durante o fatiamento, observou-se a necessidade de manter ambos os ovários bem hidratados para maior destreza nos cortes transversais. Os oócitos apresentaram-se como estruturas circulares bem definidas, onde era possível distinguir com facilidade os citoplasmas e as células do *cumulus*. Foi possível coletar um total de 88 oócitos, sendo 19 oócitos de Grau I, 42 oócitos de Grau II e 27 oócitos de Grau III (Fig. 2). Em um estudo realizado com a mesma espécie em questão, Paz et al. (2009) utilizaram a técnica de aspiração e obtiveram uma quantidade de oócitos imaturos considerável, porém, menor que o presente estudo através do fatiamento. Com relação a animais silvestres e exóticos, a técnica de fatiamento ovariano (*slicing*) já foi empregada também em outros estudos com cutias, chinchilas e camundongos (Aiudi et al., 2007; Martín-Coello et al., 2008), obtendo-se resultados satisfatório, mostrando ser uma técnica viável para obtenção de oócitos também para a espécie em questão.

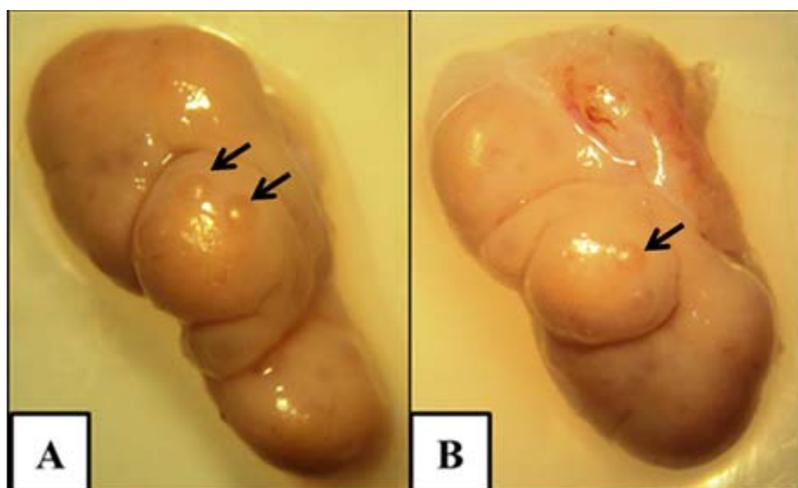


Figura 1. Ovários coletados de *Leopardus tigrinus* com a presença de folículos ovarianos (seta). A- Ovário esquerdo; B- Ovário direito.

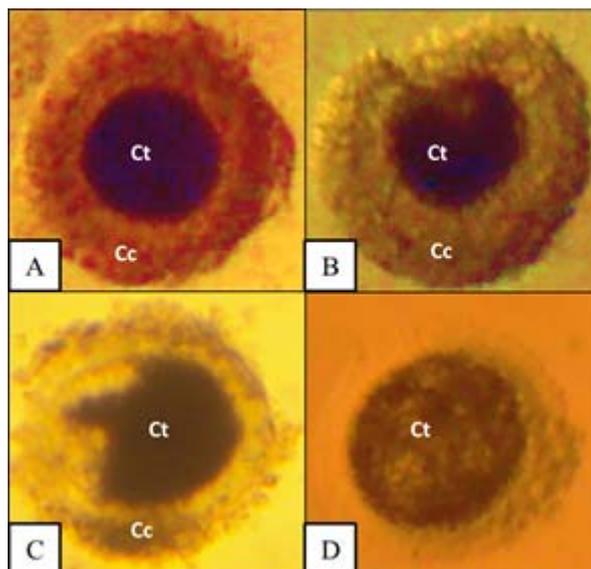


Figura 2. Oócito de grau I com pigmentação homogênea e enegrecida do citoplasma, rodeados por células do *cumulus* e *corona radiata* compacta (A); Oócito de grau II com citoplasma ligeiramente pigmentado ou manchado com *corona radiata* e células do *cumulus* envolvendo apenas parcialmente a célula (B); Oócito de grau III com formas anormais, pálidos e com ausência das células do *cumulus ooforos* e *corona radiata*. (C e D). Ct = citoplasma; Cc = Células do *cumulus*.

Referências

- Aiudi G, Cinone M, Maritato F, Sandro SA, Dell'Aquila ME.** Rescue and in vitro maturation of follicular oocytes in *Chinchilla laniger*. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.119-324, 2007.
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG.** Tratado de anatomia veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- Ferraz MS, Moraes Júnior FJ, Feitosa MLT, Almeida HM, Bezerra DO, Pessoa GT, Albuquerque DMN, Carvalho MAM.** Técnica de fatiamento do ovário para obtenção de oócitos em cutias (*Dasyprocta prymnolopha*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36, p.204-208, 2016.
- Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE.** Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilization and embryo development in the domestic cat. *Journal of Experimental Zoology*, v.257, p.350-359, 1991.
- Johnston LA, O'Brien SJ, Wildt DE.** In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Research*, v.24, p.343-356, 1989.
- Martín-Coello J, Gonzalez R, Crespo C, Gomendio M, Roldan ER.** Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology*, v.70, p.1004-1013, 2008.
- Oliveira TG, Almeida LB, Beisiegel BM.** Avaliação do risco de extinção do Gato-do-mato *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) no Brasil. Avaliação do Estado de Conservação dos Carnívoros. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. *Biodiversidade Brasileira*, v.3, p.56-65, 2013.
- Oliveira TG, Eizirik E, Schipper J, Valderrama C, Leite-Pitman R, Payan E.** *Leopardus tigrinus*. IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010. 4.
- Paz RCR, Adania CH, Barnabé VH, Barnabé RC.** Análise citogenética de oócitos de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) coletados após estimulação ovariana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.46, p.309-316, 2009.