



Avaliação histológica de fragmentos testiculares criopreservados obtidos de gatos domésticos

Hystological evaluation of cryopreserved testicular tissue obtained from domestic cats

Bruno P. Sousa¹, Beatrice I. Macente², Gilson H Toniollo², Maricy Apparicio^{1*}, Cleber F.M. Mansano², Hélder E. Thomé³, Carolina L. Canella³, Maria E.G. Tozato², Raquel R. Gutierrez²

¹Programa de Mestrado em Ciência Animal, UNIFRAN, Franca, SP, Brasil; ²DMVPRA, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil;

³CDVE - Centro de Diagnóstico Veterinário Especializado, São João da Boa Vista, SP, Brazil.

*E-mail: maricyap@hotmail.com

A dificuldade de se estabelecer um protocolo eficiente de criopreservação de tecido testicular é um dos entraves para o desenvolvimento desta técnica em felinos. Visando incrementar pesquisas nesta área, este estudo teve como objetivo avaliar histologicamente a ação de dois crioprotetores (propanediol 3% ou Glicerol 3%) sobre fragmentos de tecido testicular de gatos. Os testículos foram obtidos de 8 gatos domésticos, de diferentes raças, com idades entre 1 e 5 anos. O material foi transportado ao laboratório em tubos falcon contendo NaCl 0.9% acondicionado em caixa térmica (18°C) em no máximo 2 h. Após dissecação dos vasos, túnica albugínea e epidídimos, o tecido foi lavado três vezes em solução salina suplementada com antibióticos e mensurado com um paquímetro digital para que fosse seccionado em fragmentos de 0,3 cm³. Os fragmentos frescos foram corados com HE e avaliados histologicamente, sendo as lesões classificadas em: (I) desprendimento da membrana basal, score 0 se não há desprendimento, 1 <75% da circunferência estiver desprendida e 2 > 75% da circunferência estiver desprendida, (II) retração da membrana basal (0 se não há retração; 1 se há ligeira retração e 2 se a retração é óbvia). A integridade do núcleo das espermatogônias e células de Sertoli serão classificadas por (III) distinção entre espermatogônia e células de Sertoli (0 se facilmente distinguível; 1 se difícil a distinção e 2 se impossível a distinção); (IV) visibilidade do núcleo (0 se observado facilmente (>40% visível) e 1 se indistinguível do fundo citoplasmático) e (V) condensação nuclear (0 se células picnóticas estão ausentes, 1 se há <40% de células picnóticas e 2 se há mais que >40% de células picnóticas). Estes graus serão combinados em uma graduação final classificada de 0 a 5 (0 = saudável; 5= completa degeneração). Os demais fragmentos foram acondicionados em criotubo contendo 1mL de diluidor Tris Equex STM gema de ovo contendo 3% de glicerol ou 3% propanediol por 10 minutos em temperatura ambiente e então foram mantidos a 4°C por 30 minutos até que fossem colocados em uma rack disposta 4 cm acima do vapor de nitrogênio líquido por 10 min. Ato contínuo, as amostras foram mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido. Para o aquecimento, as amostras foram expostas em ar por 10 segundos e submersas em banho maria a 37°C por 30 segundos. Os fragmentos foram então colocados em diluidor a 37°C por 5 min e avaliados histologicamente. A análise estatística consistiu de análise de variância ANOVA com Student–Newmann–Keuls post hoc test para avaliar a interação do tecido fresco e congelado, com nível de significância < 0.05. O tecido fresco e o criopreservado apresentaram morfologia semelhante em relação ao desprendimento da membrana basal (I) e observação do núcleo (score 0). A principal alteração observada foi picnose (score 2) em aproximadamente 50% dos fragmentos criopreservados em propanediol e 53% em glicerol, e diferiu estatisticamente do tecido fresco (15%). Em relação a classificação III, os fragmentos congelados em propanediol apresentaram maior lesão, sendo a maioria classificada como score 1. Concluímos com os dados até o presente que o propanediol apresentou mais efeitos tóxicos ao tecido comparado ao glicerol, na concentração empregada neste estudo.

Palavras-chave: crioprotetores, fast-freezing, felinos, tecido testicular.

Keywords: *cryoprotectants, fast freezing, feline, testicular tissue.*



Citologia testicular com agulha fina em gatos domésticos

Testicular fine needle cytology in tom-cats

Denise Pereira Leme^{1*}, Erika Visacre de Carvalho², Vanessa B Castro³, Maria Denise Lopes⁴

¹Docente do Depto de Zootecnia e Des. Rural, CCA, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil; ²Veterinária do HV da Universidade Paulista (UNIP), Bauru, SP, Brasil; ³Docente do CCA, Ambientais e Biológicas, UFRB, Cruz das Almas, BA, Brasil;

⁴Docente do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

*E-mail: denise.leme@ufsc.br

A citologia testicular por agulha fina para avaliação funcional da espermatogênese tem sido descrita em cães, cavalos, ruminantes e felinos. Entretanto, podem existir dúvidas quanto à obtenção de amostras suficientes de gatos domésticos. Este estudo avaliou resultados citológicos de testículos de gatos de diferentes idades, submetidos a punções testiculares com agulhas de diferentes calibres: 22G x 1/4" (30x7mm) e 29G x 1/2" ("de insulina"). Foram utilizados 34 gatos (1,5 a 6,0 kg) trazidos ao Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, para castração eletiva; selecionados após terem seus estados de saúde confirmados por exames pré-operatórios, e então separados em três grupos: 10 gatos abaixo de seis meses (6m), 14 gatos com idade entre 6m e um ano (1a) e 10 gatos acima de 1a. Sob anestesia geral, após preparação do campo cirúrgico, foram realizadas punções sem aspiração com agulha 22G x 1/4" no testículo direito e com agulha 29G x 1/2" no testículo esquerdo, orquiectomia bilateral e secção longitudinal dos testículos para "imprint" dos parênquimas de ambos os testículos. Com o material das punções foram realizados esfregaços. Os esfregaços e os "imprints" foram secos ao ar ambiente, corados com Panótico, para análise por microscopia de luz. Foram contadas 200 células germinativas consecutivas, identificadas separadamente. As células de Sertoli foram quantificadas a parte à medida que eram identificadas entre as 200 células germinativas. Foram estabelecidos os Índices de célula de Sertoli (SEI-células de Sertoli/100 células germinativas) e Índices Espermáticos (SI-espermatozoides/100 células germinativas), que estimam os potenciais da espermatogênese e da produção de espermatozoides, respectivamente. A média foi usada como medida de tendência central e o desvio padrão como medida de variabilidade para a quantificação das células testiculares. Foi utilizado o teste de comparação múltipla ($P < 0,05$) por GLM (SAS) para comparar a celularidade e os SEI/SI entre as técnicas. Espermatogônias, espermátocitos primários e secundários, espermátides iniciais e finais, espermatozoides, células de Sertoli e de Leydig foram identificados nos esfregaços e "imprints" de gatos acima de 6m. Não houve comparação entre as técnicas nos gatos abaixo de 6m, pois a espermatogênese em todos eles estava incompleta; mas estava completa em 64% dos gatos entre 6 m e 1a e em todos acima de 1a. Os testículos esquerdos e direitos foram semelhantes ($P > 0,18$) quanto à celularidade, nos gatos acima de 6m; o que permitiu comparar o uso das agulhas. Não houve diferenças com relação aos SEI ($5,9 \pm 3,4$ a $10,6 \pm 10,2$, $P > 0,18$) e SI ($11,5 \pm 8,6$ a $14,2 \pm 12,6$, $P > 0,32$) quando comparadas as técnicas de "imprint" e de punções (independente da agulha), nos gatos de 6m a 1a. Também, não houve diferenças com relação aos SEI ($3,4 \pm 1,9$ a $8,7 \pm 5,1$, $p > 0,08$) e SI ($10,0 \pm 6,7$ a $16,0 \pm 7,0$, $P > 0,07$) quando comparadas as técnicas de "imprint" e de punções (independente da agulha), nos gatos acima de 1a. Não se recomenda punções para avaliação da espermatogênese em gatos abaixo de 6m de idade, pois a espermatogênese não estava completa. Para gatos acima de 6m, as punções testiculares (com as duas agulhas finas) foram consideradas igualmente eficientes para avaliação da espermatogênese. Embora estudos anteriores tenham descrito que lesões hemorrágicas decorrentes de punções testiculares em gatos domésticos foram resolvidas em sete dias, futuros estudos devem ser realizados para observar se as lesões após as punções podem influenciar a produção futura de espermatozoides.

Palavras-chave: felinos, testículos, espermatogênese, diagnóstico.

Keywords: *feline, testis, spermatogenesis, diagnostic.*



Comparação entre os crioprotetores extracelulares sacarose e trealose na vitrificação de parênquima testicular de gato doméstico

Comparison between sucrose and trehalose extracellular cryoprotectants in the vitrification of domestic cat testicular parenchyma

Julvne Vivian Guimarães de Carvalho^{1,4,*}, Sheyla Farhayldes Souza Domingues^{2,4}, Cleideanny Cancela Galvão^{1,4}, Juliana Gonçalves Lima^{1,4}, Gabriela Jaques Rodrigues^{1,4}, Silmara Letícia Gonçalves Lima^{1,4}, Regiane Rodrigues dos Santos^{3,4}

¹Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA, Brasil; ²Professora na Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA, Brasil; ³Professora na Universidade de Utrecht, Holanda; ⁴Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia, Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA, Brasil.

*E-mail: julynecarvalho18@gmail.com

A vitrificação de tecidos gonadais, visando a formação de bancos de germoplasma animal, pode ser uma importante ferramenta para conservação ex-situ (cativeiro) de animais silvestres ameaçados de extinção. O desenvolvimento de protocolos com vitrificação em tecido testicular parenquimatoso pode prover o acesso a todos os estágios do ciclo espermático. A associação de açúcares como crioprotetores extracelulares na solução de vitrificação é uma alternativa para diminuir a citotoxicidade e otimizar a preservação morfológica das células. Utilizando como modelo experimental o gato doméstico (*Felis catus*), esse estudo foi submetido e aceito pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 2890040516 e propôs comparar o efeito da trealose e sacarose na vitrificação de tecido testicular parenquimatoso. Foram submetidos à orquiectomia cinco gatos saudáveis e obteve-se fragmentos do parênquima testicular. Foram fixadas para histologia amostras componentes do grupo controle e as demais foram vitrificadas, testando as associações do crioprotetor Etilenoglicol (EG) com sacarose (Sac) ou trealose (Tre). Os fragmentos foram divididos entre dois tratamentos: T1 (RPMI + EG + 0,1M Sac) e T2 (RPMI + EG + 0,1M Tre). Após a devitrificação, as amostras foram avaliadas histologicamente, analisando o percentual de células intratubulares (espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e células de Sertoli) morfológicamente normais e as condições da membrana basal dos túbulos seminíferos. No grupo controle foi observada integridade morfológica de 94% de espermatogônias e espermatócitos, 95% de espermatídes e 100% células de Sertoli. T1 mostrou integridade em 88% de espermatogônias, 70% espermatócitos, 89% espermatídes e 69% de células de Sertoli, enquanto T2 apresentou 88% de espermatogônias, 75% de espermatócitos, 90% de espermatídes e 60% de células de Sertoli. Ambos os tratamentos evidenciaram resultados inferiores ao controle, entretanto não diferiram estatisticamente entre si. A membrana basal dos túbulos seminíferos apresentaram desprendimento moderado nos tratamentos analisados. Apesar disso, as células germinativas foram morfológicamente viáveis. Sendo assim, concluiu-se que a associação de ambos os crioprotetores extracelulares na solução de vitrificação foram igualmente eficientes para protocolos de vitrificação em tecido testicular de gato doméstico, apresentando boa preservação morfológica das células germinativas e integridade dos túbulos seminíferos.

Palavras-chave: criopreservação, tecido testicular, crioprotetores, açúcares.

Keywords: *cryopreservation, testis tissue, cryoprotectant, sugars.*



Criopreservação de espermatozoides epididimários de *Felis catus* com dois diluidores comerciais

Cryopreservation of Felis catus epididymal spermatozoa with two commercial diluent

Helena Drielli Crispim^{1*}, Rafael Alonso Salvador², David Til², Silas Maurício Cuneo Amaral³, Vera Lucia Lângaro Amaral²

¹Graduanda de Biomedicina; ²Universidade do Vale do Itajaí-Univali, Itajaí, SC, Brasil, Professores do Curso de Biomedicina, Universidade do Vale do Itajaí-Univali, Itajaí, SC, Brasil; ³Médico Veterinário do Centro Clínico Veterinário-CCV, Itajaí, SC, Brasil.

*E-mail: helenacrispim@yahoo.com

Atualmente, o gato doméstico (*Felis catus*) é a única espécie não ameaçada de extinção dentre os felídeos existentes, o que o torna um ótimo modelo experimental na área de reprodução assistida. A padronização de técnicas como a criopreservação de gametas e a fertilização *in vitro* podem se tornar ferramentas fundamentais para a preservação de espécies felinas ameaçadas. A criopreservação de sêmen de felinos ainda não possui protocolos estabelecidos, visto que a fertilização *in vitro* com espermatozoides congelados ainda apresenta baixas taxas de fertilização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da criopreservação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos como modelo experimental, realizada com meios diluidores distintos. Foram utilizados 11 gatos adultos, orquiectomizados por castração eletiva. Os epidídimos foram dissecados e os espermatozoides dispersos em meio Human Tubal Fluid modificado (HTF-Irvine Scientific®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 30 minutos a 37°C. A motilidade espermática inicial foi avaliada de modo subjetivo (móveis e imóveis) e vitalidade através do corante eosina, a amostra foi dividida e criopreservada com dois meios diluidores comerciais, o Tris-gema (Dilutris®) utilizado para bovinos e o meio TYB (Test Yolk Buffer Irvine®), utilizado para espermatozoides humanos. O meio diluidor mais a amostra (1:1) foram envasados em palhetas de 0,5mL e resfriadas por 30 minutos (4 à 8°C) e posteriormente mantidas em vapor de nitrogênio líquido por 10 minutos, finalizando com a imersão em nitrogênio líquido (-196°C). O aquecimento foi realizado a 37°C por 30 minutos e as amostras dispersas em meio HTF modificado, suplementado com 10% de SFB (1:2), centrifugadas por 6 minutos a 800G. Foram analisados os parâmetros espermáticos (motilidade e vitalidade) logo após a centrifugação e os mesmos parâmetros após 24h mantidos a 37°C, sendo este o Teste de Termoresistência (TTR). As análises resultaram numa taxa de recuperação após a descongelação, de 77,21% ($\pm 5,6$) e 84,01% ($\pm 3,5$) para motilidade e vitalidade, respectivamente. Quanto as taxas de motilidade e vitalidade no TTR, apresentaram 50,22% ($\pm 7,08$) e 64,81% ($\pm 5,41$) respectivamente, quando utilizado o diluidor Tris-gema. A taxa de recuperação quando utilizado o meio TYB, mostrou 72,13% ($\pm 4,52$) quanto a motilidade e 75,27% ($\pm 4,62$) para a vitalidade. As taxas após o TTR mostraram 39,03% ($\pm 8,51$) e 51,5% ($\pm 3,73$) para a motilidade e vitalidade, respectivamente. A taxa de recuperação dos parâmetros espermáticos apresentaram bons resultados para ambos os meios testados, ainda que o meio diluidor Tris-gema apresente resultados superiores ao TYB, com uma diferença significativa ($p=0,008$) quanto ao TTR após o descongelamento. Os protocolos utilizados podem apresentar resultados igualmente satisfatórios em animais da mesma família que se encontram ameaçados de extinção, possibilitando a construção de um banco de gametas para a preservação de tais espécies.

Palavras-chave: criopreservação, espermatozoides, felinos.

Keywords: cryopreservation, spermatozoa, felines.

Efeito da refrigeração a -1°C sobre a qualidade espermática de felinos domésticos

Effect of cooling a -1°C on sperm domestic feline quality

Anne Kemmer Souza, Josiana de Fatima Schnitzer, Luiz Guilherme Corsi Trautwein, Juliana Barroso Aguiar, Guilherme Schiess Cardoso, Maria Isabel Mello Martins*

Laboratório de Biotécnicas da Reprodução (REPROA), Departamento de Clínicas Veterinárias. Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

*E-mail: imartins@uel.br

Poucos estudos têm sido realizados avaliando a resposta das células espermáticas de felinos em diferentes temperaturas de refrigeração, principalmente abaixo de 4°C. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da refrigeração a -1°C na qualidade espermática de felinos domésticos, por 24 e 48 horas. Foram utilizados 29 gatos adultos (2 a 6 Kg), os quais foram submetidos a eletroejaculação (EEJ), após 48 horas foram castrados, e imediatamente após foi realizada a recuperação espermática da cauda do epidídimo (EPD). As amostras foram diluídas em meio ACP - 117® e a avaliação das características dos espermatozoides foram realizadas em três momentos: fresco (F) e após 24 e 48 horas de refrigeração. O experimento foi realizado em duas etapas: no grupo A foram utilizados 14 gatos, e a refrigeração das amostras foram a -1°C e no grupo B foram utilizados 15 gatos, e os espermatozoides foram refrigerados a 4°C. A cinética espermática foi avaliada pela análise computadorizada (sistema CASA), a morfologia espermática pela coloração Karras modificado e a integridade de membrana pela eosina nigrosina. Os resultados foram tabulados, as medianas (min-max) calculadas e as análises estatísticas realizadas pelo Software R 3.2.5 utilizando o teste Mann Whitney para as variáveis com distribuição anormal e considerado nível de significância de 5%. Nas amostras dos ejaculados foram identificados menores defeitos totais após 24 (42 [16-71]) e 48 horas (41 [35-80]) de refrigeração a -1°C ($p < 0,022$) em comparação com a refrigeração a 4°C após 24 (73,5 [63-87]) e 48 (72 [64-93]) horas. Para evidenciar a queda na qualidade espermática, foi realizado o cálculo da redução dos parâmetros entre os momentos (F-24h; F-48h; 24h-48h). Nas amostras do EPD foram detectadas menores reduções da qualidade espermática após 24 horas de refrigeração a -1°C, tanto na motilidade total (MT) (26,5 [-1 - 59]), motilidade progressiva (MP) (7 [-16 - 38]), velocidade média (VAP) (-1,1 [-30,9 - 44,3]), e índices de movimento (SMI) (17,1 [-44,2 - 63,9]) e de velocidade (SVI) (-0,9 [-87,1 - 122,3]) quando comparada à refrigeração a 4°C, onde foram obtidos MT (51 [-20 - 68]), MP (33 [-12 - 52]), VAP (56,6 [-32,2 - 108,7]), SMI (36,6 [-84,4 - 138,1]) e SVI (154,4 [-57,2 - 251,9]). Baseado nos resultados pode-se concluir que a refrigeração espermática a -1°C por até 48 horas foi eficiente, podendo ser uma alternativa de temperatura à refrigeração de espermatozoides de felinos domésticos.

Palavras-chave: criopreservação, gatos, Sistema CASA, eletroejaculação, epidídimo.

Keywords: cryopreservation, cat, CASA System, electroejaculation, epididymis.



Efeitos do ácido docosahexaenoico na motilidade, integridade de acrossoma e membrana espermática em sêmen refrigerado de felinos domésticos: Resultados parciais

Effect of docosahexaenoic acid on motility, acrosomal and sperm membrane integrity in domestic cat cooled semen: Preliminary results

Juliana de Almeida Silveira^{1,2,*}, Laiza Sartori de Camargo¹, Camila de Paula Freitas Dellaqua¹, Maria Denise Lopes^{1,3}, Camila Louise Ackermann¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil; ²Graduanda do 5º ano de Medicina Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, Brasil; ³Professora do curso de Medicina Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, Brasil.

*E-mail: ju_almeida93@hotmail.com

Em gatos, o uso de sêmen criopreservado é destacado por ser mais prático em questão de tempo e custo, já que não é necessário transportar os animais. Dentre as biotécnicas de reprodução tem-se a refrigeração espermática, que submete o espermatozoide a um estresse térmico, conservando os mesmos por um maior período de tempo. As espécies reativas de oxigênio (ROS), como H₂O₂ e O₂⁻, são formadas a partir do processo de criopreservação e podem ser responsáveis pela diminuição da motilidade, danos na integridade do acrossomo e membrana plasmática e, conseqüente queda na fertilidade. Isso ocorre devido à sensibilidade dos espermatozoides à peroxidação lipídica (reação entre as espécies reativas de oxigênio e ácidos poli-insaturados), ficando incapazes de sintetizar novamente seus componentes de membrana danificados. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a motilidade, integridade da membrana espermática e acrossomal no sêmen fresco e refrigerado de felinos domésticos acrescidos ou não de agente antioxidante (ácido docosahexaenoico – DHA, Sigma, St Luis, EUA) no meio diluente. Seis amostras de sêmen felino foram coletadas (três amostras do Gato A, duas do Gato B e uma do Gato C), utilizando a técnica de vagina artificial. Cada amostra foi diluída com: BB: Botubov® (Botupharma, Botucatu, Brazil) e BB4: Botubov® acrescido de DHA (0.04mg); obteve-se concentração final de 40 x 10⁶ spz/mL refrigerado a 5°C por 48 horas. A motilidade foi avaliada por meio de análise computadorizada – CASA (Computer Assisted Semen Analysis), utilizando o sistema HTR-IVOS-10, previamente ajustado para o sêmen de gato. Para avaliação de integridade de membrana e acrossomo foi utilizada a associação de iodeto de propídio (PI; P4170, Sigma Aldrich), FITC-PSA (L0770, Sigma Aldrich) e Hoechst 33342 (14533, Sigma Aldrich); a avaliação foi feita por meio de citometria de fluxo, utilizando a probe C11- BODYPY (D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA). A avaliação da normalidade foi realizada pelo teste Kolmogorov-Smirnov (K-S), ANOVA seguida de Tukey pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0. A motilidade espermática média no sêmen fresco foram de 75 ± 5,56 % e estão de acordo com os valores normais para a espécie. Após refrigeração os valores médios de motilidade foram: 70% ± 5,63 (24 horas sem DHA), 63,2% ± 4,2 (24 horas com DHA), 65,67% ± 6,29 (48 horas sem DHA) e 56,5% ± 6,56 (48 horas com DHA). Não houve diferença estatística entre o percentual de MPLAI[‡] (5,3 ± 0,55 e 12,3 ± 1,68) e MPAI^{‡‡} (92,62 ± 0,70 e 86,21 ± 1,53) entre o sêmen fresco e refrigerado por até 48 horas com adição de DHA ao meio. No entanto, houve aumento de MPLAI quando não adicionado DHA, com 48 horas de refrigeração: 12,3 ± 1,68 e 42,39 ± 29,38, com e sem antioxidante, respectivamente. O estresse oxidativo contribui para danificar a membrana da célula espermática, justificando os resultados de lesão de membrana plasmática na célula espermática após a descongelação. Lesões em membrana plasmática diminuem a qualidade do sêmen e interferem diretamente na fecundação do oócito. O sêmen diluído em Botubov® e acrescido de DHA, após a refrigeração, apresentou qualidade cinética semelhante ao sêmen sem adição de DHA, porém a adição do antioxidante conferiu proteção à membrana plasmática e acrossomo.

[‡]MPLAI: Membrana Plasmática Lesada e Acrossoma Íntegro.

^{‡‡}MPAI: Membrana Plasmática e Acrossoma Íntegros.

Palavras-chave: felinos, criopreservação de sêmen, antioxidante.

Keywords: *feline, cryopreservation, antioxidant.*



Estereologia do metanefro de embriões e fetos de gatos domésticos *Felis catus* (Linnaeus, 1798)

Stereology of metanephros embryos and fetuses of domestic cats Felis catus (Linnaeus, 1798)

Barbara Fidalgo Paretsis^{1,2,*}, Lara Carolina Mario¹, Tais Harumi de Castro Sasahara¹, Liege Cristina Garcia da Silva², José Manoel dos Santos², Gabriela Martino Manzatti², Rafael Magdanelo Leandro^{1,2}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Butantã, São Paulo, SP, Brasil; ²Universidade Anhembi Morumbi, Parque da Mooca, São Paulo, SP, Brasil.

*E-mail: barbaraftparetsis@gmail.com

O metanefro é o terceiro conjunto de rins a ser formado no período embrionário e torna-se os rins permanentes. Além dos gatos domésticos serem muito suscetíveis a doenças renais, de acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o Brasil classifica-se em segundo lugar com a maior população de gatos domésticos. A técnica estereológica pode determinar a tridimensão de componentes teciduais sendo um recurso essencial para compreensão da formação e morfologia de estruturas. As amostras foram coletadas de campanhas de castração na cidade de São Paulo e foram utilizados 6 embriões/fetos de gatos domésticos reunidos em dois grupos conforme o período gestacional: grupo 1 (três animais com 26 a 29 dias) e grupo 2 (três animais com 30 a 45 dias). O comitê de ética da Universidade de São Paulo está de acordo com a pesquisa (Nº 8928240316). Após a determinação das idades gestacionais por meio da medida “crown-rump” (comprimento crânio-caudal/CCC) padronizada para a espécie (EVANS e SACK, 1973. *Anatom Histol Embryol*, 02:11-45), os animais foram pesados e os metanefros dissecados. As análises macroscópicas dos metanefros consistiram em peso, largura, comprimento e espessura. Para análise histológica os fragmentos dos metanefros passaram por técnicas rotineiras de desidratação, inclusão, microtomia e coloração de tecido com Hematoxilina e Eosina. Para análise estereológica foi estimado o volume total do metanefro dividindo-se o peso seco do órgão, em gramas, pela densidade média do tecido de 1,19g/cm³ (Scherle, W. 1970. *Mikroskopie*. 26:57-60), realizada amostragem metanéfrica a partir do “smooth fractionator” (Gundersen, H.J.G. 2002. *J. Microsc*, 207:191-210) e utilizado o princípio “fractionator físico” para estimar o número de corpúsculos renais (Gundersen, H.J.G. 1986. *J. Microsc*, 143:3-45). Os valores das análises macroscópicas e dos volumes do metanefro possuíram médias de: 0,004g de peso, 0,13cm de largura, 0,20cm de comprimento, 0,08cm de espessura e 0,003cm³ de volume para o grupo 1; 0,08g de peso, 0,33cm de largura, 0,63cm de comprimento, 0,36cm de espessura e 0,072cm³ de volume para o grupo 2. Em relação ao número de corpúsculos renais, o grupo 1 obteve em média 478 e o grupo 2 obteve em dois de cinco fragmentos do metanefro média de 12.613. Considera-se que em rins de gatos adultos o comprimento pode ter 4,4cm, a largura 3,1cm, a espessura 2,5cm, peso 30g (Ellenport, C.R. 1986. *Anatomia dos Anim Dom*. 02:2481-1489) e os animais da pesquisa apresentaram valores menores para as mesmas medidas do metanefro. Quanto ao volume total e estimativa do número de corpúsculos renais, a literatura é escassa para possível comparação. Portanto, de acordo com a macroscopia, histologia e estereologia, os parâmetros biométricos e quantia de corpúsculos renais do metanefro aumentaram progressivamente conforme as idades gestacionais.

Palavras-chave: embriologia, rim, glomérulos, doenças renais, quantificação.

Keywords: *embryology, kidney, glomerulus, kidney diseases, quantification.*

Fibroadenomatose mamária felina: Relato de caso

Feline mammary hypertrophy fibroadenoma: Case report

Patrícia de Faria Lainetti*, Antonio Fernando Leis Filho, Roberto Rodrigues da Rosa Filho, Marina Andrade Cyrino, Felipe Erison Medrado Rocha de Sousa, Lucas Emanuel Ferreira Canuto, Lucas Troncarelli Rodrigues, Fabiana Ferreira de Souza

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

*E-mail: patylainetti@hotmail.com

A fibroadenomatose, hiperplasia fibroepitelial mamária ou fibroadenomatose é uma alteração benigna, não neoplásica que ocorre nos ductos mamários e no tecido conjuntivo periductal de cadelas e gatas, geralmente jovens. Essa alteração é estimulada pelas secreções de progesterona, podendo ser endógena ou exógena, em animais no início da gestação ou durante o ciclo estral normal. Em machos já foram descritos alguns casos da alteração, porém são mais raros quando comparados às fêmeas. Por ser uma lesão hormônio-dependente, o principal tratamento é a retirada do estímulo hormonal, seja pela realização da ovariário-histerectomia (OHE) ou pela suspensão do uso de progestágenos. Pode afetar uma mama, várias ou a cadeia mamária inteira. Geralmente após o início do tratamento, as mamas regredem em até 3 meses e em casos mais graves, deve ser indicada a remoção cirúrgica do tecido mamário. O prognóstico depende da condição clínica da fêmea no momento do atendimento e do aspecto das lesões. Em vista da sua semelhança com neoplasias mamárias, as quais são graves em felinos, este estudo objetivou relatar um caso de fibroadenomatose. Foi atendida no Hospital Veterinário da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP uma gata, de 12 meses de idade, 3,5 kg, sem raça definida, com queixa de aumento das glândulas mamárias. O proprietário relatou estro há 10 dias e não soube informar a respeito de acasalamentos, mas durante o período teve acesso à rua. Relata nunca ter usado progestágenos. Animal estava em bom estado geral e condição corpórea adequada para a espécie. Ao exame físico foi observado crescimento mamário bilateral, com consistência firme, em forma de placa, sem ulcerações e não aderidos. Como tratamento inicial, foi prescrito aglepristone na dose de 20 mg/kg administrado, por via subcutânea, uma vez por semana, durante 4 semanas. Após 10 dias do início do tratamento, a fêmea abortou 3 fetos íntegros e nas 2 semanas seguintes, não foi observada melhora do quadro clínico de hiperplasia fibroepitelial mamária. Optou-se por realizar a OHE e o acompanhamento da fêmea. Sete dias após o procedimento cirúrgico, a gata retornou para atendimento e retirada dos pontos de pele. Nesta consulta, as mamas haviam aumentado de tamanho, porém não estavam mais flácidas. Então, foi receitada metergolina (0,5 mg/kg, 2 vezes/dia, durante 5 dias, por via oral). Em torno de 1,5 mês após a realização da OHE houve regressão das mamas. Os casos de fibroadenomatose mamária não são relatados com frequência e o tratamento específico ainda não foi estabelecido, uma vez que os animais podem responder de diferentes formas ao tratamento farmacológico. O diagnóstico normalmente ocorre clinicamente pela anamnese e exame físico, sendo que a biópsia é o método de diagnóstico definitivo. O tratamento cirúrgico ainda é a forma mais eficiente de tratar essa condição e evitar possíveis complicações. Nesta situação, optou-se pelo uso do aglepristone a fim de reduzir o volume mamário e facilitar a OHE. O risco do abortamento foi mencionado durante a consulta inicial, já que não foi possível o diagnóstico naquele período gestacional.

Palavras-chave: gata, hiperplasia fibroepitelial, glândula mamária.

Keywords: cat, fibroepithelial hyperplasia, mammary gland.



Funcionalidade e perfil oxidativo de espermatozoides epididimários de gatos submetidos a diferentes tempos de refrigeração (24, 48 e 72 horas)

Functionality and oxidative profile of the cat epididymal spermatozoa submitted to different cooling times (24, 48 and 72 hours)

Natália S. Resende^{1*}, Ken K. Nagai², Daniel de S.R. Angrimani², João Diego A. Losano², Bruno R. Rui², Luana de C. Bicudo², Giulia K.V. Kawai², Maria Claudia P. Francischini², Marcilio Nichi²

¹Centro Universitário Monte Serrat; Santos, São Paulo, Brasil; ²Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*E-mail: nataliaresende86@icloud.com

Atualmente diversas espécies de felinos estão em perigo de extinção devido à caça ilegal e fragmentação de habitat. Assim, é evidente a necessidade de incremento em alternativas reprodutivas para a preservação genética desses animais. Entretanto, o uso de felinos selvagens para estudos se torna difícil devido ao manejo e número de indivíduos. Desta forma, o uso do gato doméstico assume importante papel como modelo biológico de estudos reprodutivos. Entre as diversas técnicas reprodutivas, a coleta de espermatozoides epididimários destaca-se, por possibilitar o uso de material biológico *post mortem*. Contudo, a manutenção da viabilidade espermática, assim como o estabelecimento do perfil oxidativo nestas amostras ainda não foi totalmente elucidado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil espermático e oxidativo de amostras provenientes da cauda de epidídimo de gatos, mantidas em refrigeração (5°C) durante 24, 48 e 72 horas. Para tal, foram utilizados nove gatos em idade reprodutiva (1-6 anos) de diversos pesos e raças, submetidos à orquiectomia bilateral eletiva. Dezoito testículos e epidídimos foram coletados e armazenados em geladeira (5°C) e as avaliações ocorreram após 24, 48 e 72 horas. Em cada avaliação seis epidídimos foram avaliados, a escolha de cada um foi de maneira aleatória, após randomização realizada através do sistema *PROC PLAN* (seed: 3859012) no programa SAS System for Windows. Os espermatozoides foram coletados através de incisões (<1mm) na cauda do epidídimo, aspirados e mantidos em 300 µl PBS. As amostras espermáticas foram avaliadas pela análise computadorizada da motilidade (CASA), integridade da membrana plasmática (coloração de eosina/nigrosina), integridade acrossomal (fast green/rosa bengala), atividade mitocondrial (coloração 3,3'diaminobenzidina - DAB), integridade do DNA espermático (coloração de azul de toluidina) e morfologia espermática. Ademais, foram realizadas avaliações da peroxidação lipídica (concentração de TBARS) e atividade das enzimas antioxidantes: glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD). Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste LSD ($p < 0.05$). Foi possível observar, redução da motilidade total entre 48 ($39,6 \pm 11,1\%$) e 72 horas ($10 \pm 3,3\%$), assim como motilidade progressiva (48 horas: $10,4 \pm 5,2\%$; 72 horas: $1,4 \pm 0,8\%$). Ademais, a alta atividade mitocondrial (DAB – Classe 1) reduziu entre 48 ($77,2 \pm 1,9\%$) e 72 horas ($16,6 \pm 2,2\%$), assim como, a integridade de membrana plasmática (48 horas: $92,2 \pm 2,4\%$; 72 horas: $69,7 \pm 10\%$). Por outro lado, a ausência de atividade mitocondrial (DAB – Classe 4) aumentou entre 48 ($2,8 \pm 1,3\%$) e 72 horas ($7,2 \pm 2,3\%$). Não foram observadas quaisquer alterações no perfil oxidativo das amostras analisadas. Portanto, com os resultados obtidos neste estudo é possível afirmar que a viabilidade dos espermatozoides epididimários (provenientes da cauda) de felinos são semelhantes entre 24 e 48 horas de refrigeração, ocorrendo alterações significativas nos parâmetros espermáticos após 72 horas de armazenamento. Tais alterações espermáticas (ex: motilidade) não parecem estar envolvidas com o status oxidativo, mas sim, com alterações mitocondriais possivelmente relacionadas com esgotamento mitocondrial, como foi possível atestar através dos resultados da coloração 3,3'diaminobenzidina. Desta forma, recomenda-se a refrigeração epididimária por no máximo 48 horas para felinos, o que viabiliza o transporte de amostras até centros de pesquisa para manipulação dos gametas e aplicação em biotecnologias, como criopreservação espermática e inseminação artificial. Ressalta-se que um período de 72 horas promove alterações significativas na qualidade espermática, o que pode implicar no uso de biotécnicas reprodutivas.

Palavras-chave: antioxidantes, estresse oxidativo, epidídimos, felinos.

Keywords: *antioxidants, stress, oxidative, epididymal, feline.*



Importância da avaliação ultrassonográfica fetal na avaliação gestacional felina: Relato de caso

Importance of fetal ultrasound evaluation in feline gestational evaluation: Case report

Karina Fernanda Zortéa, Andreza de Fátima Trindade Cordeiro, Thabata Laccort Bortolato, Bernardo dos Anjos Borba, João Filipi Scheffer Pereira, Carlos Henrique do Amaral*

Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

*E-mail: carlosamaralvet@gmail.com

O exame ultrassonográfico em felinas gestantes é uma importante ferramenta para acompanhamento e determinação de idade e sofrimento fetal. A gestação distócica em felinos pode ocorrer devido ao mau posicionamento, desenvolvimento e tamanho anormal dos fetos, estreitamento do canal pélvico da fêmea, inércia uterina e putrefação fetal. Nesses casos é indicado a cesariana. A ecografia em felinos pode ser realizada 10 a 11 dias após a cópula ou 26 dias para verificação morfológica. Um felino fêmea, sem raça definida com três anos, pesando 4,360Kg foi atendido com intuito de fazer avaliação gestacional. Foi realizado exame físico, no qual constatou-se na palpação a presença de estruturas compatíveis com fetos. Os parâmetros fisiológicos e exames laboratoriais apresentaram-se dentro da normalidade. O animal foi então submetido ao exame ecográfico para avaliação dos fetos, sendo então observado a presença de quatro fetos, sendo dois fetos viáveis e dois com ausência de batimentos cardíacos. Os fetos viáveis apresentaram frequência cardíaca (FC) oscilando entre 136bpm e 260bpm sendo possível diferenciação das quatro câmaras cardíacas. Foram realizadas três avaliações em cada feto. Esses dois fetos apresentaram diferenciação entre fígado e pulmão, possível visualização do estômago, rins (diferença corticomedular e pelve sem pielectasia), alças intestinais bem formadas com presença de motilidade segmentar. Estes apresentaram medida do diâmetro biparietal com média de 1,61cm e diâmetro torácico médio de 1,99cm. Os dois fetos com ausência de batimentos cardíacos, apresentaram sobreposição óssea das estruturas torácicas e calota craniana colapsada. Os fetos sem batimentos não se apresentavam em formato linear e havia sombreamento acústico, com ausência de gás. Órgãos abdominais desses fetos estavam mal formados (não evidentes). Por meio do exame ecográfico a idade gestacional estimada foi de 43 dias. A organogênese inicia com aproximadamente 16 dias de gestação, com 47 dias completa a calcificação do esqueleto, 53 dias órgãos viscerais se tornam distintos como estômago e duodeno. Com 58 dias o intestino começa a se movimentar, com base nesses dados os fetos estariam com aproximadamente 58 dias. Foi indicado a cesariana para não comprometer a saúde da mãe, retirando os fetos sem batimentos cardíacos. Apesar da visualização na ecografia de quatro fetos, foram encontrados cinco fetos na cesariana, sendo três fetos sem vida, dois fetos com vida. Um dos fetos viáveis foi constatado óbito duas horas após o procedimento e um feto com vida que apresentou prognóstico favorável. Foi detectado a morte fetal pela ausência de batimentos cardíacos e movimento fetal, postura anormal do feto, volume reduzido e desintegração fetal. A medida em que o parto se aproxima a frequência cardíaca dos fetos tende a ter alta variação e a temperatura da mãe tende a diminuir. O exame ecográfico permite diagnóstico precoce, planejamento de manejos clínicos e cirúrgicos, é um método não invasivo que permite observar o desenvolvimento do tecido e órgãos fetais, mal formações e determinar a idade gestacional. Não permite analisar corretamente o número de fetos, principalmente se for superior a quatro.

Palavras-chave: cesariana, avaliação fetal, sofrimento fetal.

Keywords: *Cesarean section, fetal evaluation, fetal distress.*



Influência da temperatura de refrigeração sob as subpopulações espermáticas de felinos domésticos

Influence of cooling temperature in sperm subpopulations of domestic cats

Anne Kemmer Souza, Luiz Guilherme Corsi Trautwein, Josiana de Fatima Schnitzer, Leticia Amanda dos Santos Correia, Guilherme Schiess Cardoso, Maria Isabel Mello Martins*

Laboratório de Biotécnicas da Reprodução (REPROA), Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

*E-mail: imartins@uel.br

O ejaculado é composto por grupos heterogêneos de espermatozoides, denominados subpopulações espermáticas, que possuem movimentos cinéticos específicos e têm sido estudadas pelo *software EDITY/SORT* do sistema computadorizado de análise espermática, o sistema CASA. O aprimoramento do conhecimento das características cinéticas espermáticas, e as alterações dos padrões de movimento, quando submetidas a alterações de temperatura, pode permitir melhorar os índices de fertilidade. O objetivo deste estudo foi identificar e comparar as subpopulações espermáticas dos felinos domésticos, refrigerados a -1°C por 24 e 48 horas, assim como analisar a frequência de espermatozoides nas diferentes subpopulações. Foram utilizados 10 gatos adultos (2 a 6 Kg). A colheita do sêmen foi realizada pela eletroejaculação (EEJ) e o meio de refrigeração foi o ACP - 117®. A cinética espermática foi avaliada por sistema computadorizado (CASA) em três momentos: fresco, 24 e 48 horas após a refrigeração. Os ejaculados foram divididos em dois grupos: refrigeração a -1°C ($n=5$) e refrigeração a 4°C ($n=5$). Foram analisados individualmente 1560 espermatozoides pelo *software EDITY/SORT* do HTM-IVOS e para identificar as subpopulações espermáticas foi realizada a estatística multivariada. A comparação entre os Grupos -1°C e 4°C foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney utilizando o software SPSS 20.0 e as diferenças consideradas significativas para $p<0,05$. O tamanho do efeito de significância foi avaliado pelo d_z de Conhen. Foram definidas três subpopulações espermáticas pela análise prévia do dendograma hierárquico. A análise dos componentes principais (CP) identificou a existência de três grupos com maior iteração nos três momentos: CP1 (VAP, VCL, VSL, ALH, SVI), CP2 (STR, LIN, WOB e SMI) e o CP3 (BCF), e identificou três subpopulações espermáticas. Houve uma tendência na diminuição da velocidade média (VAP) espermática na maioria das subpopulações após 24 e 48 horas refrigeração. A subpopulação 1 após 48 horas de refrigeração a -1°C (VAP - 79,8 [63,4-103,4]; SMI - 226,2 [193,7-264,7]; SVI - 255,1 [222,2-321,2]), e a subpopulação 3 após 24 horas de refrigeração a 4°C (VAP - 64,7 [12,4-82,1]; SMI - 254,4 [163,1-319,1]; SVI - 170,1 [47,8-235,8]) mantiveram a qualidade espermática, podendo caracterizar grupos de espermatozoides resistentes à criopreservação. A comparação dos valores da subpopulação 1 no momento das 48 horas entre os grupos -1°C (VAP - 79,8 [63,4-103,4]) e 4°C (VAP - 22,1 [11,9-57,7]) apresentaram efeito de significância médio ($d_z > 0,4$), com melhores resultados no grupo -1°C . Os valores da distribuição das proporções dos espermatozoides em cada subpopulação se mostraram similares entre as temperaturas de refrigeração. O presente estudo identificou três subpopulações de espermatozoides do ejaculado, com distribuições proporcionais entre os grupos de temperatura e a presença de subpopulações mais resistentes a refrigeração a -1°C e a 4°C .

Palavras-chave: criopreservação, gatos, subpopulação espermática, estatística multivariada, cinética espermática.

Keywords: cryopreservation, cats, spermatic subpopulation, multivariate statistics, spermatic kinetics.



Prolapso uterino bilateral em gata: Relato de caso

Prolapso uterino bilateral em gata: Relato de caso

Tiago Oliveira Brandão, Rodrigo Freitas Bittencourt*, Marcos Chalhoub Coelho Lima, Endrigo Adonis Braga de Araújo, Mariana Alves de Andrade Silva, Luiz Di Paolo Maggitti Junior, Larissa Rodrigues Santana, Morgana Duarte Felix, Adrielle da Silva Lima, Marcus Vinícius Galvão Loiola, Carmo Emanuel Almeida Biscarde

Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

*E-mail: rfb@ufba.br

O prolapso uterino é um distúrbio obstétrico raro em animais de companhia, sobretudo em felinos. A baixa frequência desta patologia pode ser explicada pelo posicionamento e morfologia do sistema genital dos caninos e felinos, os quais apresentam uma disposição em formato de Y associada a conexões laterais e dorsais na cavidade pélvica, estabelecidas pelo ligamento largo e suspensor do ovário, respectivamente. Contudo, apesar da baixa frequência da patologia, o Médico Veterinário deve estar preparado para realizar avaliação e abordagem rápida e correta as quais são fundamentais para proporcionar adequada recuperação materna e dos recém-nascidos. Tendo em vista a importância clínica propõe-se relatar um prolapso uterino completo e bilateral em uma gata. A fêmea, uma SRD de um ano e 11 dias, pesando 2,8 Kg, múltipara foi atendida no Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária do Hospital Veterinário Renato Rodenburg de Medeiros Neto – UFBA. Segundo a proprietária, o felino pariu três filhotes e três dias após expulsou um último filhote, todos mortos. Após a expulsão do último filhote, os proprietários observaram a presença de duas massas tubulares avermelhadas, apresentando perda de tecido e com odor desagradável, sendo conduzido imediatamente após a protrusão ao atendimento no Hospital Veterinário. Ao exame clínico, o animal apresentava-se ativo, nutrido, tempo de perfusão capilar normal 3” temperatura retal (39,3°C), mucosas hipocoradas, linfonodos palpáveis mais não reativos, a palpação abdominal o mesmo apresentava-se relaxado, a auscultação cardiopulmonar limpa, animal apresentava taquicardia e frequência respiratória em torno de 54 movimentos por minuto (mpm), pulso forte e sincrônico. Ao exame clínico específico foi observado prolapso total do útero. Realizou-se coleta de sangue para hemograma e bioquímico, sendo que os resultados foram normais para a espécie. O animal foi encaminhado ao centro cirúrgico para redução do prolapso e posterior realização de ovariosalpingohisterectomia (OSH). Após a limpeza com solução fisiológica, foi utilizado solução hiperosmótica, açúcar e compressa de gelo para redução do edema e reposicionamento do útero. A seguir, foi realizada a redução manual do prolapso uterino seguido por laparotomia e ovariosalpingohisterectomia (OSH) por técnica tradicional. Após o término da cirurgia o animal foi medicado com amoxicilina 10mg/kg durante 10 dias, maxican 0,1mg/kg por três dias, cloridrato de tramadol 2mg/kg durante três dias. Ao retorno 10 dias depois do procedimento cirúrgico foi realizado uma nova consulta com retirada dos pontos na qual o animal apresentava-se clinicamente bem com a saúde restabelecida. Deste modo, conclui-se que a redução do prolapso, seguida da laparotomia e ovariosalpingohisterectomia constitui o tratamento interessante nos casos de indícios de comprometimento da mucosa uterina e em animais sem fins reprodutivos.

Palavras-chave: ovariosalpingohisterectomia, útero, felino.

Keywords: ovariosalpingohisterectomy, uterus, feline.



Quantificação da produção de H_2O_2 e O_2^- no sêmen fresco e refrigerado de gatos domésticos: Resultados parciais

Quantification of H_2O_2 and O_2^- production in fresh and chilled semen of domestic cats: Preliminary results

Camila Louise Ackermann^{1,*}, Juliana de Almeida Silveira^{1,2}, Camila de Paula Freitas Dell'aqua¹, Laíza Sartori de Camargo¹, Edjalma Rodrigues da Siva-Junior¹, Maria Denise Lopes^{1,3}

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/ UNESP, Botucatu, SP, Brasil; ²Graduanda do 5º ano de Medicina Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, Brasil; ³Professora do curso de Medicina Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, Brasil.

*E-mail: camilalouise@hotmail.com

A criopreservação de sêmen em felinos ainda é um desafio, devido à fragilidade da célula espermática frente ao estresse térmico. É necessário conhecer os diferentes tipos de resposta que a célula espermática pode apresentar quando submetida à refrigeração para estimar os danos e suas consequências, assim como métodos de evitá-los. Objetivou-se quantificar as espécies reativas ao oxigênio H_2O_2 e O_2^- no sêmen fresco e refrigerado de felinos domésticos acrescidos ou não de agente anti-oxidante (ácido docosahexanoico – DHA, Sigma, St Luis, EUA) no meio diluente. Seis amostras de sêmen felino foram coletadas (três amostras do Gato A, duas do Gato B e uma do Gato C), utilizando a técnica de vagina artificial. Cada amostra foi diluída com: BB: Botubov® (Botupharma, Botucatu, Brazil) e BB4: Botubov® acrescido de DHA (0.04mg); a concentração final foi de 25×10^6 spz/mL e as amostras foram refrigeradas a 5°C por 48 horas. Para as análises de citometria de fluxo foi utilizado o equipamento LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW, vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 m.W Após a análise, os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1. A produção de superóxido mitocondrial foi avaliada através de citometria de fluxo, com uso da probe MitoSox Red associada a Sytox G Green como marcador de viabilidade, assim em 500µL da solução de sêmen foi adicionado 2µM de MitoSox, 0,005µM de Sytox G e a incubação foi realizada por 15min a 37°C ao abrigo da luz. Para a produção de peróxido de hidrogênio intracelular foi utilizado a associação das CM- H_2 DCFDA e iodeto de propídio, assim em 500µL da solução de sêmen foi adicionado 10µM de CM- H_2 DCFDA e 1,5µM de iodeto de propídio, a incubação foi em temperatura ambiente por 60 minutos ao abrigo da luz. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's, através do Programa GraphPad Prism versão 6.0. Obteve-se as seguintes médias na quantificação de H_2O_2 : 97,77 ± 0,46 (sêmen fresco); 86,85 ± 3,56 (24 horas - BB) 83,17 ± 3,48 (24 horas - BB4); 82,86 ± 1,80(48 horas - BB); 78,57 ± 2,40 (48 horas BB4). Por sua vez, a quantificação de superóxido teve os seguintes resultados: 17,13 ± 4,30 (no sêmen fresco); 13,92 ± 1,62 (24 horas - BB); 11,42 ± 1,36 (24 horas - BB4); 11,14 ± 0,71 (48 horas - BB); 12,59 ± 1,57 (48 horas - BB4). Após as análises, foi observada diferença estatística apenas na quantificação de H_2O_2 , que diminuiu após a refrigeração por 24hs com adição de DHA, porém, não houve diferença estatística entre os meios acrescidos ou não de antioxidante após 48hs. Além disso, não houve diferença estatística na quantificação de superóxido (O_2^-) entre os meios com e sem adição de antioxidante. Os resultados preliminares, até o momento, sugerem que a refrigeração do sêmen felino promove uma diminuição na produção de H_2O_2 em sêmen refrigerado por 24hs diluído em Botubov® acrescido de DHA. Esse resultado será confirmado após a realização de mais coletas e análises seminais, aumentando o número de amostras.

Palavras-chave: felinos domésticos, espécies reativas ao oxigênio, refrigeração de sêmen, estresse oxidativo.

Keywords: domestic cat, reactive oxygen species, cooled semen, oxidative stress.



Uso do meio DC-R[®] na refrigeração de espermatozoides epididimários de felinos domésticos

Extender DC-R[®] to cooled epididymis sperm of domestic felines

Letícia A. dos Santos Correia, Anne Kemmer Souza, Carolina B. de M. Lopes Felipe, Luiz Guilherme C. Trautwein, Caio V.da S.Bordo, Guilherme Schiess Cardoso, Maria Isabel Mello Martins*

Laboratório de Biotécnicas da Reprodução (REPROA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

*E-mail: imartins@uel.br

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do meio DC-R[®] na refrigeração por até 48 horas de espermatozoides epididimários de felinos domésticos. Foram utilizados 12 gatos adultos (1,5 a 6 anos, SRD) submetidos a orquiectomia eletiva. Imediatamente após a cirurgia foi realizada a recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo. As avaliações espermáticas foram realizadas a fresco, após 24 e 48 horas de refrigeração a 4°C, sendo a cinética espermática analisada pelo sistema computadorizado (sistema CASA), a concentração realizada em câmara de Neubauer e a morfologia espermática em esfregaços corados com Karras modificado. Após as avaliações a fresco, as amostras foram alíquotadas e alocadas em um recipiente com 200mL de água em refrigerador a 4°C. Os dados foram tabulados e submetidos ao programa Bioestat 5.2, avaliados pelo teste ANOVA Kruskal-Wallis, os casos significativos foram submetidos ao teste de média Duncan com 5% de probabilidade. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na motilidade total (MT) a fresco, 24 e 48 horas ($49\%^A$ versus $38\%^A$ versus $26\%^A$), porém na motilidade progressiva (MP) houve diferença ($p < 0,05$) entre fresco e após 48 horas de refrigeração ($30\%^A$ versus $20\%^{AB}$ versus $12\%^B$). Essa queda na motilidade era esperada devido ao estresse do processo de criopreservação. Quanto a cinética espermática, ao serem calculados os índices de movimentação (SMI), embora tenha havido diminuição durante o período de refrigeração, a queda foi significativa somente após 48 horas de refrigeração (148^A versus 127^{AB} versus 113^B), também houve diferença quanto ao índice de oscilação (WOB) entre fresco e após 24 e 48 (81^A , 66^B e 62^B) de refrigeração. Não foram detectadas diferenças entre os resultados de alterações morfológicas espermáticas durante o período de refrigeração. Com base nos resultados obtidos nesse estudo, foi possível concluir que o diluente DC-R[®] foi eficiente para preservar as características dos espermatozoides epididimários de gatos domésticos durante a refrigeração a 4°C por até 48 horas, podendo ser uma alternativa disponível comercialmente preservar do material genético dessa espécie.

Palavras-chaves: gato, diluente, criopreservação, epidídimo.

Keywords: *cat, extender, Cryopreservation, Epididymis.*



Vitrificação de complexos *cumulus*-oócitos de gata doméstica (*Felis catus*) utilizando as concentrações 0,1M e 0,5M de sacarose

Vitrification of cumulus-oocyte complexes of domestic cat (Felis catus) using 0.1M and 0.5M sucrose concentrations

Juliana Gonçalves Lima^{1,6,*}, Cinthia Távora de Albuquerque Lopes^{2,6}, Cleideanny Cancela Galvão^{1,6}, Julyne Vivian Guimarães de Carvalho^{1,6}, Gabriela Jaques Rodrigues^{1,6}, Silmara Letícia Gonçalves Lima^{1,6}, Danielle Cristina Calado de Brito^{5,6}, Sheyla Farhayldes Souza Domingues^{3,6}, Regiane Rodrigues dos Santos^{4,6}

¹Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Castanhal, PA, Brasil; ²Doutoranda na Faculdade de Medicina Veterinária, UFPA, Castanhal, PA, Brasil; ³Professora do curso de Medicina Veterinária, UFPA, Castanhal, PA, Brasil; ⁴Professora na Universidade De Utrecht, Holanda; ⁵Pós-doutoranda na Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil; ⁶Laboratório de biotecnologia e medicina da reprodução de animais silvestres da Amazônia, UFPA, Castanhal, PA, Brasil.

*E-mail: julianaglvet@gmail.com

A vitrificação de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) é uma biotécnica que objetiva a preservação de oócitos que quando maturados *in vitro* podem ser utilizados na produção *in vitro* de embriões. Devido fácil aplicabilidade a campo, essa técnica pode ser utilizada também na formação de banco de germoplasma de animais. Esse material pode ser recuperado inclusive após o óbito do animal, representando um importante avanço para a conservação de espécies em ameaça de extinção. No entanto, para desenvolver a vitrificação, é necessário compor uma solução crioprotetora (crioprotetor intra e extracelular) eficiente para CCOs da espécie em questão. Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar duas concentrações de Sacarose (SAC - crioprotetor extracelular) na vitrificação utilizando ponteiras na preservação de CCOs de gata doméstica. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados na avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA-UFPA/Nº de registro: 1418060516). Cinco gatas (n=5) foram submetidas à ovariectomia de rotina e seus ovários excisados tiveram seus folículos antrais puncionados para obtenção dos CCOs, os quais foram avaliados quanto sua morfologia para posterior utilização nos tratamentos de vitrificação. Os CCOs selecionados (n=34) foram divididos em dois tratamentos que utilizaram uma Solução Base (SB: meio-base RPMI + crioprotetor intracelular etilenoglicol EG40%). Os CCOs foram inicialmente expostos em uma Solução de Equilíbrio que contém metade da concentração de etilenoglicol (SE: RPMI + EG20%) durante 3-5 min, e em seguida nos tratamentos (T1: SB + SAC 0,1M e T2: SB + SAC 0,5M) durante 40-60s. Após isso, as soluções contidas de CCOs (10µl) foram pipetadas e as ponteiras colocadas dentro de criotubos foram mergulhadas em nitrogênio líquido. A eficiência dos tratamentos foi analisada por marcadores fluorescentes (Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio) que permitiram avaliação da viabilidade e integridade de membrana dos CCOs vitrificados. Não houve diferença estatística entre os dois tratamentos. O T2 e T1 apresentaram 48±8% e 33±9% de CCOs viáveis, respectivamente. O T2 apresentou resultados semelhantes quando comparados aos de outros autores que vitrificaram CCOs da mesma espécie, empregando o dispositivo cryotop (40% de viabilidade) na mesma concentração de sacarose (0,5M) do presente trabalho (Alves A.E. et al. 2012. *Reprod Dom Anim.* Vol. 47, p. 1003–1008), assim como, empregando open pulled straws (OPS) (45,3% de viabilidade) utilizando 1M de sacarose (Cocchia N. et al. 2010. *Cryobiology.* Vol. 60, p. 229-234). O presente trabalho obteve resultados promissores, devido à toxicidade química ter sido reduzida pelo uso do crioprotetor intracelular com a sacarose, e o tempo de exposição diminuído por meio do pequeno diâmetro da ponteira e do volume da solução. Desse modo, a vitrificação em ponteiras, utilizando as duas concentrações de sacarose, permitiu a preservação dos complexos-*cumulus* oócitos da gata doméstica.

Palavras-chave: criopreservação, oócito, ponteira, felino.

Keywords: *criopreservation, oocyte, tip, feline.*