



**Ultraestrutura testicular durante diferenciação gonadal da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae)**

*Testicular ultrastructure during gonadal differentiation of the Amazonian turtle, Podocnemis expansa (Testudines: Podocnemididae)*

**Marcela dos Santos Magalhães<sup>1,2,\*</sup>, Lucas Castanhola Dias<sup>3</sup>, Richard Carl Vogt<sup>4</sup>,  
Moacir Franco de Oliveira<sup>5</sup>, Carlos Eduardo Bezerra de Moura<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; <sup>2</sup>Professora Credenciada no Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório Temático de Microscopia ótica e eletrônica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil; <sup>4</sup>Centro de estudos de Quelônios da Amazônia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus AM, Brasil; <sup>5</sup>Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: marcelasmbio@gmail.com

*Podocnemis expansa*, conhecida como tartaruga-da-amazônia, apresenta o sexo determinado pela temperatura de incubação. O sexo é determinado durante o período termosensível que corresponde aos primeiros estágios da diferenciação gonadal. Sendo assim, este estudo teve como objetivo caracterizar a ultraestrutura do testículo durante a diferenciação gonadal de *P. expansa* em ambiente natural. O estudo foi realizado entre setembro e dezembro de 2014, em uma praia do Centro de Pesquisa e Preservação de Quelônios Aquáticos do rio Uatumã, Balbina, Amazonas (01° 54'56,9"S, 059° 28' 18"W) (SISBIO / IBAMA 39472 -4; CEUA/INPA 025/2013). Gônadas foram coletadas durante período de diferenciação gonadal (41° – 57° dias de incubação) e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. No laboratório foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato durante 2h, seguida por 3 lavagens no mesmo tampão, por desidratação em séries crescente de etanol e incluídas em resina Durcupan-ACM Fluka©. Secções ultrafinas de 70 nm foram preparadas no Ultramicrotomo Reichert OM U3, contrastadas com 5% de acetato de uranila seguido por citrato de chumbo a 0,5%. Imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de Transmissão 109 Zeiss EM operando em uma tensão de aceleração de 80 kV. O epitélio germinativo apresentou-se formado por uma camada de células cúbicas. No início da diferenciação, os cordões medulares se organizaram em uma disposição tubular, sem a presença da lâmina basal revestindo externamente. Após 47 dias do desenvolvimento, os cordões sexuais se diferenciaram em túbulos seminíferos, revestidos por uma fina lâmina basal com células mióides em associação. Nas células germinativas, associadas aos túbulos seminíferos, foi observada a presença de complexo de golgi com vesículas se desprendendo de sua membrana, retículo endoplasmático rugoso e grande quantidade de ribossomos. As demais células dos túbulos possuíam núcleo ovóide ocupando quase que totalidade da célula. No espaço intersticial identificamos três tipos de células, classificadas em: tipo 1, caracterizada pela presença de um núcleo grande e claro com mitocôndrias no citoplasma; tipo 2, com núcleo cubóide ocupando quase que totalidade da célula, com pouco citoplasma e sendo menor que a tipo 1; e tipo 3, caracterizado por apresentar núcleo claro e irregular, com nucléolo evidente e seu citoplasma constituído de vesículas lipídicas de diferentes eletrodensidades, sendo observadas próximas dos vasos sanguíneos, essas características são indicativas de atividade esteroidogênica, importante nessa fase de diferenciação. Nossos achados sobre a ultraestrutura das células testiculares confirmam que a diferenciação se estabelece logo após o período termosensível. Essas informações certamente contribuirão na compreensão do gonadogênese de espécies com determinação sexual pela temperatura.

**Palavras-chave:** desenvolvimento gonadal, microscopia eletrônica de transmissão, quelônio.

**Keywords:** gonadal development, transmission electronic microscopy, turtle.



**Avaliação histológica testicular de *Rusa timorensis* submetidos a aplicação de Anti- GnRH**  
*Testicular histological evaluation of *Rusa timorensis* submitted to castration with anti- GnRH*

**Anna Raquel Grimas Almeida<sup>1,\*</sup>, Rodrigo Neca Ribeiro<sup>1</sup>, Felipe Azzolin<sup>2</sup>, Juliane Patrícia Sipp<sup>2</sup>,  
Nei Moreira<sup>3</sup>, Antonio Campanha Martinez<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável Animal da Universidade Estadual de Maringá; <sup>2</sup>Zoológico UNISEP; <sup>3</sup>Docente UFPR – Setor Palotina, <sup>4</sup>Professor Adjunto na Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil.

\*E-mail: annagrimasa@gmail.com

O cervo da espécie *Rusa timorensis* é uma espécie tropical, originada da Ásia, frequentemente encontrada em parques e zoológicos de todo o mundo. É comum em espécies criadas em cativeiros a ocorrência de endogamia. O uso de imun contraceptivos para obter o controle de fertilidade impediria a aplicação de procedimento cirúrgico, e seria uma alternativa reversível. O sistema reprodutivo dos mamíferos é controlado pelo sistema neuroendócrino que é composto por hormônios secretados pelo hipotálamo, hipófise e gônadas. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é produzido e secretado pelo hipotálamo, ele estimula a hipófise anterior que incitará a liberação de gonadotrofinas hipofisárias: Hormônio Luteinizante (LH) e Hormônio Folículo Estimulante (FSH). O LH se liga aos receptores de membrana das células de Leydig responsáveis pela produção dos hormônios esteroides. Enquanto o FSH em sinergismo com a testosterona atua nos túbulos seminíferos compostos pelas células de Sertoli para iniciar e manter a espermatogênese. A testosterona por sua vez é essencial para o desenvolvimento e comportamento das características sexuais do macho. Consequentemente a supressão do GnRH inibe este processo reprodutivo. Este experimento teve aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNISEP (Protocolo 010/2018). Para execução deste ensaio foram selecionados quatro cervos machos com idade de 34 ( $\pm 4$ ) meses, que foram separados em dois grupos. No grupo 1, o controle, contou com animal que não recebeu a aplicação de anti-GnRh (Bopriva®). No grupo 2 três animais receberam, pela via subcutânea, o uma dose de 1 ml (400  $\mu$ g) de vacina. Nestes indivíduos foram realizadas duas aplicações com intervalo de 45 dias. Após 15 dias da última aplicação realizou-se histologia testicular dos 4 animais. As lâminas foram coradas com Tricrômio de Masson. Para avaliação das lâminas utilizou-se um Microscópio Eclipse-200, e no animal controle foi possível observar os túbulos seminíferos que continham células da linhagem espermatogênica em diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo espermatogônias, espermatócitos primários, espermátides e espermatozoides no tecido intersticiais. Já as lâminas de testículos dos animais tratados, tiveram uma grande redução do diâmetro do túbulo seminífero, poucas espermatogônias, apresentava degeneração dos tecidos intersticiais, além de poucas células de Leydig e de Sertoli. Foi possível concluir que a aplicação de imun contraceptivos pode ser eficaz pois através de achados histológicos houve uma alteração na espermatogênese.

**Palavras-chave:** imun contraceptivos, testosterona, espermatogênese.

**Keywords:** *immunoconceptive, testosterone, spermatogenesis.*

## **Adição de gentamicina ao diluente reduz a carga bacteriana e não afeta a qualidade do sêmen refrigerado de catetos (*Pecari tajacu*)**

*Addition of gentamicin to the extender decrease the bacterial load and does not affect the quality of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen*

**Caio Sérgio Santos, Maiko Roberto Tavares Dantas\*, Marina Crisley Gondim Rebouças, Andréia Maria da Silva, Érica Camila Gurgel Praxedes, Lívia Batista Campos, Moacir Franco Oliveira, Alexandre Rodrigues Silva**

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal - LCGA, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: mk\_ufersa@hotmail.com

Apesar da necessidade de inclusão de agentes antimicrobianos nos diluentes para sêmen com o intuito de controlar a proliferação de microrganismos, é do conhecimento científico que tal procedimento pode resultar tanto em efeitos benéficos como tóxicos. Visando a conservação de germoplasma de animais silvestres, o desenvolvimento de biobancos para tais espécies tem sido constantemente fomentado. Neste sentido, este trabalho objetivou avaliar o efeito da inclusão da gentamicina no diluente para o sêmen de catetos sobre a carga bacteriana e os parâmetros espermáticos das amostras submetidas a refrigeração. Para tanto, foram utilizados cinco animais adultos mantidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). As coletas ocorreram de maio a junho de 2018, sendo os animais submetidos à anestesia com propofol (5mg/Kg) por via intravenosa em bolus e eletroejaculação. O sêmen coletado foi diluído em Tris-frutose-ácido cítrico acrescido de 20% de gema de ovo, dividido em três alíquotas, sendo a primeira referente ao controle sem antibiótico e duas acrescidas de gentamicina (30µg/mL - G30 ou 70µg/mL - G70). As amostras foram mantidas refrigeradas a 5°C por até 36 horas, sendo avaliadas imediatamente após a diluição e depois a cada 12 horas (0, 12, 24 e 36h). Em cada tempo, foram realizadas avaliações da motilidade total (MT) por análise computadorizada (Sistema IVOS, Hamilton-Thorne, Estados Unidos), e da integridade da membrana (IM) por meio de sondas fluorescentes (Hoescht, Iodeto de Propídio). Paralelamente, foi realizada a quantificação de bactérias mesófilas (UFC/mL) por meio da técnica de contagem em placas. As médias dos resultados foram analisadas pelo teste t ( $P < 0,05$ ). Em cada período de refrigeração, os percentuais médios de motilidade total e integridade de membrana não diferiram ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com gentamicina e o controle. Os valores médios e erros padrão para motilidade após 36 horas foram de  $19,6 \pm 9,5\%$ ,  $27,8 \pm 9,4\%$ , e  $27 \pm 10,2\%$  para os tratamentos G70, G30 e controle, respectivamente. Já os percentuais médios de espermatozoides com membranas integras após 36 horas foram de  $59 \pm 3,8\%$ ,  $62,2 \pm 3,5\%$  e  $62,4 \pm 4,4\%$  para os tratamentos G70, G30 e controle, respectivamente. As amostras de sêmen diluídas com a maior concentração de gentamicina (G70) apresentaram menor carga bacteriana ( $P < 0,05$ ) do que o controle logo após a diluição (0h), bem como após 12 e 36 horas de refrigeração. As contagens médias, em UFC/mL, foram de  $2,2 \pm 1 \times 10^4$ ,  $3,9 \pm 2,3 \times 10^4$  e  $1,3 \pm 0,78 \times 10^4$  para o tratamento G70 às 0, 12 e 36 horas, respectivamente. As contagens médias para o tratamento controle, nos mesmos tempos de refrigeração, foram de  $2,4 \pm 0,82 \times 10^5$ ,  $4,6 \pm 1,5 \times 10^5$  e  $2,3 \pm 0,91 \times 10^5$  UFC/mL, respectivamente. Conclui-se que a adição de gentamicina na concentração de 70µg/mL possibilita o controle bacteriano na amostra, bem como não apresenta efeito tóxico sobre a qualidade do sêmen refrigerado de catetos mantido por até 36 horas.

**Palavras-chave:** biobanco, espermatozoide, *Tayassu tajacu*.

**Keywords:** biobank, sperm, *Tayassu tajacu*.



## **Influência dos crioprotetores intracelulares sobre a conservação de tecido testicular de cutias (*Dasyprocta leporina*)**

*Influence of intracellular cryoprotectants on the conservation of testicular tissue derived from agouti (*Dasyprocta leporina*) using different cryoprotectants*

**Andréia Maria Silva\***, **Luana Grasielle Pereira Bezerra**, **Erica Camila Gurgel Praxedes**,  
**Samara Sandy Jerônimo Moreira**, **Caio Sergio Santos**, **Moacir Oliveira Franco**,  
**Alexsandra Fernandes Pereira**, **Alexandre Rodrigues Silva**

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: andreia.m.silva@hotmail.com

A criopreservação de tecido testicular representa uma ferramenta promissora para a conservação de mamíferos silvestres, como as cutias. Essa tecnologia permite a maximização de material biológico masculino derivado de indivíduos *post-mortem*, possibilitando o armazenamento de fragmentos contendo um grande número de espermatogônias, as quais servirão como fonte de espermatozoides para uso em tecnologias de reprodução assistida. Neste sentido, o objetivo foi avaliar a influência de diferentes crioprotetores intracelulares [dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG) e a sua associação] sobre a criopreservação de tecido testicular de cutias. Para tanto, testículos derivados de três cutias adultas *post-mortem* foram recuperados e transportados ao laboratório em solução fisiológica a 27°C dentro de 30 min. No laboratório, fragmentos testiculares (~9,0 mm<sup>3</sup>) foram criopreservados por congelamento lento usando o sistema Mr. Frosty Freezing Container<sup>®</sup> a 1°C/min, em meio essencial mínimo acrescido de 10% de soro fetal bovino e 0,2 M de sacarose, contendo os seguintes crioprotetores intracelulares: DMSO 1,5 M, EG 1,5 M ou EG 0,75 M + DMSO 0,75 M. Fragmentos não criopreservados foram considerados grupo controle. Após duas semanas, fragmentos não criopreservados e criopreservados/aquecidos foram submetidos a digestão enzimática (DNase, Hialuronidase e Colagenase IV) e avaliados para viabilidade usando Hoechst e iodeto de propídeo, e atividade mitocondrial usando a MitoTracker Red. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão e analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey (P < 0,05). Assim, foi observada uma viabilidade de 81,0% ± 0,6 no grupo controle superior em relação aos tratamentos (P < 0,05), os quais não diferiram entre si (P > 0,05), observando-se os valores de 38,7% ± 14,0 para DMSO, 33,3% ± 0,9 para EG, e 33,0% ± 5,2 para a associação. No tocante à atividade mitocondrial, houve diferença entre o controle fresco (1,0 ± 0) e os grupos tratados (P < 0,05), sendo que entre estes, o EG (0,6 ± 0,1) foi superior (P < 0,05) ao DMSO (0,5 ± 0,05) e à associação (0,5 ± 0,05). Com base na atividade mitocondrial, sugere-se que o etilenoglicol seja o crioprotetor intracelular mais adequado a ser utilizado na criopreservação de tecido testicular de cutias.

**Palavras-chave:** biobanco, vida selvagem, roedor, tecido gonadal.

**Keywords:** *biobank, wildlife, rodent, gonadal tissue.*



## **Qual a melhor solução hiposmótica e osmolaridade para o teste hiposmótico do sêmen de *Tayassu pecari*?**

*What is the best hyposmotic solution and osmolarity for the hyposmotic swelling test of the *Tayassu pecari* semen?*

**Celso Henrique Souza Costa Barros\***, William Morais Machado, Renan Luiz Albuquerque Vieira, **Maíra Guimarães Kersul**, Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho, Paola Pereira das Neves Snoeck

Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil.

\*E-mail: celso\_barrosmv@hotmail.com

Os aspectos da biologia e fisiologia reprodutiva do queixada (*Tayassu pecari*) são pouco descritos na literatura e existe grande preocupação sobre a conservação desta espécie, classificada como vulnerável à extinção. É sabido que as características espermáticas normalmente avaliadas no exame andrológico: concentração, motilidade e morfologia são frequentemente insuficientes, por si só, para o diagnóstico de fertilidade/infertilidade do macho, a não ser que individualmente apresentem valores muito diferentes do esperado e descrito como dentro da normalidade para a espécie. A integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides, avaliada pelo teste hiposmótico, é uma importante ferramenta complementar para prever a capacidade de fertilização de uma amostra de sêmen. Dessa forma, objetivou-se identificar o melhor protocolo de teste hiposmótico (HOST) para avaliar a integridade funcional dos espermatozoides de queixada. O sêmen de quatro machos adultos foi coletado com auxílio de eletroejaculador após jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 6 horas, seguido de contenção física e protocolo de sedação e anestesia. O protocolo de eletroestimulação utilizado foi semelhante ao descrito em cateto. O sêmen coletado foi avaliado quanto às características macro e microscópicas e diluído (10 $\mu$ L:90 $\mu$ L, v:v) nas seguintes soluções hiposmóticas: água destilada (0 mOsm/L), sacarose (50, 100, 150 mOsm/L) e frutose (50, 100, 150 mOsm/L). Cada amostra foi incubada em banho seco a 37°C por 40 minutos. A leitura dos espermatozoides reativos ao teste foi realizada em microscópio óptico comum (1000X), em preparação úmida entre lâmina e lamínula depois de corada com rosa de bengala a 3%. Um total de 200 espermatozoides foram avaliados e classificados em reativos ou não reativos ao HOST. O percentual de espermatozoides funcionalmente íntegros foi determinado pela subtração do percentual de espermatozoides com defeitos na cauda antes do HOST, depois da avaliação das alterações morfológicas encontradas no sêmen fresco. Foi aplicada ANOVA para testar a diferença entre as soluções. O percentual de espermatozoides funcionalmente íntegros encontrados foi de 30,0 $\pm$ 22,4; 36,1 $\pm$ 19,6; 37,0 $\pm$ 26,9; 21,7 $\pm$ 4,5; 24,2 $\pm$ 15,6; 28,6 $\pm$ 18,6 e 27,8 $\pm$ 22,4 respectivamente para as amostras incubadas em água destilada, solução de sacarose 50, 100, 150 mOsm/L e frutose 50, 100 e 150 mOsm/L, respectivamente (P>0,05). Dessa forma, pode-se empregar qualquer uma das soluções e osmolaridades testadas para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides de queixada, sendo a água destilada a mais indicada pela praticidade na rotina laboratorial.

**Palavras-chave:** integridade, funcionalidade, membrana plasmática, reprodução assistida.

**Keywords:** integrity, functionality, plasma membrane, assisted reproduction.



## Pharmacological semen collection of Brazilian wild felids

*Coleta farmacológica de sêmen em felídeos silvestres brasileiros*

**Pedro Nacib Jorge Neto<sup>1,4</sup>, Gediendson Ribeiro de Araújo<sup>1,2,\*</sup>, Thyara de Deco-Souza<sup>1,3</sup>,  
Rodrigo F. Bittencourt<sup>5</sup>, Antônio Carlos Csermak Jr<sup>1,3</sup>, Cristiane S. Pizzutto<sup>1,4</sup>,  
Maitê C Coelho da Silva<sup>1,3</sup>, Jorge A. Salomão Jr<sup>1,4</sup>, Mônica Madrigal-Valverde<sup>5</sup>, Vitor P. Curvelo<sup>6</sup>,  
Marta C. Gomes<sup>6</sup>, Tarcízio A. R. de Paula<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>REPROCON; <sup>2</sup>INBIO/UFMS; <sup>3</sup>FAMEZ/UFMS; <sup>4</sup>FMVZ/USP; <sup>5</sup>EMEVZ/UFBA; <sup>6</sup>Zoo de Salvador; <sup>7</sup>DVT/UFV,  
Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: gediendson@gmail.com

The use of reproductive biotechnologies in wild cats are an important tool for the conservation of populations with low genetic variability. The initial difficulty in developing such technologies is to obtain representative samples of semen, which is not yet feasible through techniques routinely used in domestic animals. Thus, the aim of the present study was to use the methodology of pharmacological semen collection with urethral catheterization of six Brazilian wild felids. Semen was collected from eleven Jaguar males (*Panthera onca*), four Cougars (*Puma concolor*), one Ocelot (*Leopardus pardalis*), one Jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*), one Margay (*L. wiedii*) and one Southern Tiger Cat (*L. guttulus*). The anesthetic protocol used was the association of Medetomidine (0.08-0.1 mg / kg) and ketamine (5 mg / kg) applied through an anesthetic dart. After 15 to 20 min of anesthetic induction, the urethra of each male was carefully catheterized with a sterile Tomcat urethral catheter without side opening. In the large and medium-sized felids, 14 cm of the urethral catheter was inserted, whereas in the small cats it was inserted between 7 and 9 cm. Each animal was catheterized twice: the first catheterization was performed using only the inserted catheter; the second one was performed after prostate massage with an anal probe for jaguars and cougars and with the finger in the other species. Through the pharmacological technique it was possible to catheterize and collect semen from all animals. For jaguars, an average of  $347,2 \pm 295,6$   $\mu\text{L}$  of semen was collected per ejaculate with a concentration (conc) of  $2635,2 \pm 1598,1 \times 10^6$  spz / mL,  $3,75 \pm 0,5$  of vigor and  $77\% \pm 11,4$  percentage points motility.; For cougars, 205  $\pm$  198,2  $\mu\text{L}$  of semen was collected with a conc. of  $749,4 \pm 184,5 \times 10^6$  spz / mL,  $3,25 \pm 0,5$  of vigor and  $72,5\% \pm 5$  percentage points motility ; For the oncelot 27  $\mu\text{L}$  of ejaculate was collected with a conc of  $1670 \times 10^6$  spz / mL, 5 of vigor and 90% motility ; For the Jaguarundi, 20  $\mu\text{L}$  of ejaculate was collected with  $570 \times 10^6$  spz / mL conc, 3 of vigor and 60% motility; For the margay, the numbers were 20  $\mu\text{L}$  of ejaculate,  $120 \times 10^6$  spz / mL conc, 4 of vigor and 90% motility. Finally, for the southern tiger cat, 23  $\mu\text{L}$  of ejaculate was collected with a conc of  $1720 \times 10^6$  spz / mL, 4 of vigor and 80% motility. The tomcat catheter, due to its small diameter, allowed a safe catheterization in the urethra and facilitated the collection of the semen by capillarity. In addition, as the catheters were sized in length according to the size of each animal, the collection of semen was possible without reaching the urinary vesicle and potentially contaminate the semen with urine. Massaging the prostate trans-rectally stimulates the gland assisting in the release of the spermatozoa in the urethra, increasing the volume of the ejaculate. Although the second ejaculate was more diluted than the first one, this practice made it possible to collect more spermatozoa without compromising sperm quality (vigor and motility) and semen processing for cryopreservation. In this way, the second ejaculate of all collections was added to the first (pooled) for evaluation and processing. The evaluations of vigor and sperm motility showed that the technique does not affect semen quality in relation to the other methodologies used in felines. Although the seminal volume in the species of the present study was lower than that reported by other researchers using electroejaculation, the conc and total sperm number were mostly superior and never less, indicating an absence or minimal presence of seminal fluid. The fact that the samples are very conc and practically without seminal plasma, facilitate the manipulation in the field, eliminating the need to centrifuge samples. The proposed methodology is a more practical and efficient technique for collecting semen while keeping good semen quality. Furthermore, this methodology allows to collect semen of felines kept in both captivity and in nature, making possible the development of technologies of assisted reproduction in these species.

**Keywords:** Medetomidine, semen collection, urethral catheterization, animal welfare.

**Palavras-chave:** Medetomidina, coleta de sêmen, cateterismo uretral, bem-estar animal.



**Pharmacological semen collection and cryopreservation of the Giant Anteater  
(*Myrmecophaga tridactyla*) in the wild**

*Coleta farmacológica e criopreservação de sêmen em tamanduá-bandeira (Myrmecophaga tridactyla) de vida livre*

**Maitê Cardoso Coelho da Silva<sup>1,2,\*</sup>, Gediendson Ribeiro de Araujo<sup>1,3</sup>, Maíra Guimarães Kersul<sup>4</sup>,  
Pedro Nacib Jorge Neto<sup>1,5</sup>, Amanda Carolina Barbosa de Aguiar<sup>6</sup>, Flávia Regina Miranda<sup>7</sup>,  
Thyara de Deco-Souza<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>REPROCON; <sup>2</sup>FAMEZ/UFMS; <sup>3</sup>INBIO/UFMS; <sup>4</sup>DCAA/UESC; <sup>5</sup>FMVZ/USP; <sup>6</sup>UNIR; <sup>7</sup>IPCTB.

\*E-mail: maitecoelhocardoso@gmail.com

Threats such as habitat loss, wildfire, car collisions among others, put the Giant Anteater as threatened of extinction. Assisted reproduction is an important tool in species conservation in so far as it helps maintain the genetic variability of populations. The aim of this case report is to describe the collection, evaluation and freezing of semen from a wild giant anteater in the Pantanal (Mato Grosso do Sul, Brazil). Capture was performed by active search; the animal restraint was performed with a catcher pole and the anesthetic protocol used was the association of Medetomidine (0.08mg / kg) and Ketamine (5mg / kg) applied intramuscularly. After 15 to 20 min of anesthetic induction, the urethra was carefully catheterized with a sterile urethral probe for cats, coupled to a 1mL syringe, to collect semen. Subsequently, the semen was placed in a tube at 37 °C, and evaluated for volume, vigor, motility, concentration and morphology (fixing method with 4% formaldehyde in DMPBS). For freezing, semen was diluted to a concentration of 50 x 10<sup>6</sup> spz / mL in OptiXcell (IMV Technologies) media, packaged in mini straws (IMV Technologies) and equilibrated for four hours at 5 °C. Subsequently the straws were frozen on liquid nitrogen (LN2) vapor for 10 min and then plunged in LN2 for storage. A total of 0.2 mL of semen was collected at a total concentration of 126 x 10<sup>6</sup> spz (or 630 x 10<sup>6</sup> spz/mL). Sperm vigor and motility were, respectively, 4 and 70% for fresh semen and 3 and 30% after thawing. Total normal spermatozoa were 54% in fresh semen and 47,5% in thawed semen. Major and minor sperm defects were, respectively, 32% and 14% for fresh and 39% and 13,5% for thawed. Although the seminal volume obtained by pharmacological semen collection was lower than that reported by other researchers using electroejaculation in this species, the concentration, motility and vigor was superior. To the best of our knowledge, we are hereby reporting for the first time both pharmacological semen collection and cryopreservation in live, free-ranging giant anteater. Even though the study covers a sole animal, the proposed methodology demonstrates that medetomidine is a safe and efficient technique for collecting semen while keeping good semen quality and that the semen cryopreservation protocol using OptiXcell may be an option for giant anteater.

**Acknowledgment:** IMV Technologies Brazil and CAPES.

**Keywords:** Medetomidine, semen collection, conservation, animal welfare.

**Palavras-chave:** Medetomidina, coleta de sêmen, conservação, bem-estar animal.



## Comparação de diferentes técnicas de vitrificação para a conservação do tecido gonadal masculino usando a Cutia como modelo

*Comparison of different vitrification techniques for the conservation of male gonadal tissue using the Agouti as a model*

Andréia Maria da Silva\*, Luana Grasielle Pereira Bezerra, Maiko Roberto Tavares Dantas, Ana Glória Pereira, Paula Luiza Clemente de Lima, Marina Crisley Gondim Rebouças, Andreza Vieira Brasil, Moacir Franco Oliveira, Alexandra Fernandes Pereira, Alexandre Rodrigues Silva

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: andrea.m.silva@hotmail.com

Nos últimos anos, tem-se enaltecido a conservação de tecido gonadal masculino como uma possível fonte para obtenção de espermatozoides visando a formação de bancos de germoplasma. Neste sentido, o sucesso de tais bancos depende, de sobremaneira, da escolha de técnicas de criopreservação adequadas para a manutenção da viabilidade do tecido pós-aquecimento. Portanto, o objetivo do presente estudo foi comparar a eficiência de duas técnicas de vitrificação [superfície sólida (VSS) ou convencional (VC)] para a conservação do tecido gonadal de cutias (*Dasyprocta leporina*), as quais representam um modelo interessante para extrapolação para outras espécies. Para tanto, fragmentos (9 mm<sup>3</sup>) de tecido testicular foram coletados de cutias adultas post mortem e criopreservados utilizando as diferentes técnicas de vitrificação. Para ambas as técnicas, a solução de vitrificação consistiu de Meio Essencial Mínimo (MEM) com 10% de soro fetal bovino, 0,25 M de sacarose, e 1.5 M dimetilsulfóxido (DMSO). Fragmentos não criopreservados foram considerados como controle. Após duas semanas, fragmentos criopreservados/aquecidos e não criopreservados foram fixados em solução de Bouin por 12 h e processados histologicamente visando a avaliação morfológica, levando-se em conta os parâmetros de separação da membrana, vacuolização, integridade estrutural, perda de células, ruptura e separação de membrana. Tais parâmetros foram categorizados em escores variando de 1 (degenerado) a 3 (conservado). Os dados foram expressos em média e erro padrão, e os tratamentos foram comparados por ANOVA seguida do teste Tukey (P < 0,05). No tecido fresco, observaram-se os seguintes escores: 3,0 ± 0,02 para vacuolização, 2,3 ± 0,1 para integridade estrutural, 3,0 ± 0 para perda celular, 3,0 ± 0 para ruptura e 2,9 ± 0,1 para separação da membrana. Após o aquecimento das amostras, verificou-se que ambas as técnicas foram eficientes em conservar todos os parâmetros de modo similar ao controle, obtendo-se os seguintes escores: 2,8 ± 0,5 e 2,8 ± 0,5 para a vacuolização, 2,0 ± 0,3 e 2,1 ± 0,4 para integridade estrutural, 2,9 ± 0,3 e 2,9 ± 0,4 para perda celular, 2,9 ± 0,4 e 2,9 ± 0,4 para ruptura, e 2,7 ± 0,6 e 2,9 ± 0,4 para separação de membrana, utilizando-se a VSS e VC, respectivamente. De acordo com os resultados apresentados, ambas as técnicas poderiam ser utilizadas para a conservação da arquitetura histológica do tecido testicular no modelo experimental Cutia.

**Palavras-chave:** bancos de recursos biológicos, vida selvagem, criopreservação, testículo.

**Keywords:** biological resource banks, wildlife, cryopreservation, testis.

## Coleta de células espermáticas do epidídimo de Cervo Dama (*Dama dama*): relato de caso *Epididymal sperm cells collection in fallow deer (Dama dama): case report*

**Antonio Henrique Kuczarski<sup>1,\*</sup>, Carolina Fontana<sup>2</sup>, Luiz Felipe Souza Lima<sup>1</sup>,  
Tathiana Ferguson Motheo<sup>3</sup>, Heitor José Bento<sup>1</sup>, Marisol Alves de Barros<sup>2</sup>,  
Matias Bassinello Stocco<sup>1</sup>, Fernanda Silva Pereira<sup>2</sup>, Fabio Dumit Pizzinatto<sup>2</sup>,  
Thais Oliveira Morgado<sup>4</sup>, Regina Célia Rodrigues da Paz<sup>3</sup>, Roberto Lopes de Souza<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil;

<sup>2</sup>Programa de residência multiprofissional, Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Professor do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>4</sup> Responsável Chefe do Setor de Animais Selvagens, Hospital Veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

\*E-mail: ah.kucz@gmail.com

O cervo dama (*Dama dama*) é uma espécie de cervídeo originada da região mediterrânea, a qual é utilizada para produção animal e caça. É uma espécie com fotoperíodo negativo, tendo seu ciclo reprodutivo concentrado durante as estações de outono e inverno. Apesar da eletroejaculação ser o método mais empregado para a obtenção de amostras seminais de cervídeos, a recuperação de células espermáticas da cauda do epidídimo permite a obtenção de material genético de machos reprodutores em caso de óbito ou impossibilidade de cópula. Dessa forma, o objetivo do presente relato foi descrever a recuperação de células espermáticas de um cervo dama após orquiectomia. Foi encaminhado ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, um macho jovem de cervo Dama de aproximadamente 110 kg e com histórico de claudicação no membro pélvico direito. Foi realizada radiografia do membro e constatou-se fratura completa da tíbia. Sendo assim, optou-se pela colocação de fixadores externos e tala para estabilização da fratura. Porém, após dois dias notou-se sangramento e mobilidade da mesma. Sendo assim, o animal foi submetido à amputação do membro pélvico direito e em seguida optou-se pela realização de orquiectomia devido ao temperamento agressivo do animal durante a estação reprodutiva. Após o procedimento cirúrgico, os testículos foram coletados em recipiente plástico estéril contendo solução de 0,9% NaCl e e levados para o laboratório. Ato contínuo, procedeu-se a dissecação de vasos e tecidos e isolamento da cauda do epidídimo e ducto deferente de ambos os testículos. A recuperação das células espermáticas foi realizada por meio de compressão da cauda do epidídimo (Savi *et al.* 2015. *Investigação*, 14(1):18-22). Foi obtido 0,23 mL de recuperado epididimário, o qual por meio de análise subjetiva apresentou 70% de motilidade (0 -100%), 3 de vigor (escore de 1 – 5) e concentração de  $18,25 \times 10^6$  spz/mL. A morfologia espermática foi avaliada em câmara úmida por meio de microscópio de contraste de fase (40x), contando-se 200 células. Dessa forma, constatou-se a presença de 11 espermatozoides com defeitos de cabeça, sendo estes exclusivamente de cabeça lanciforme; 28 células com defeitos de peça intermediária, sendo a gota proximal o defeito mais observado (n=12) e 23 espermatozoides com defeitos de cauda, com maior prevalência de cauda fortemente dobrada. Foram confeccionadas lâminas para avaliação das membranas plasmática e acrossomal por meio das colorações de Eosina Nigrosina e Fast-green/Rosa Bengala, respectivamente. Por lâmina foram contadas 200 células, onde constatou-se 24% espermatozoides com membrana plasmática lesionada (n=48) e 29,5% com lesão na membrana acrossomal (n=59). Ainda, com auxílio de um paquímetro eletrônico foi determinado o volume testicular utilizando a altura e largura de ambos os testículos. Sendo assim, verificou-se que o testículo direito possuía  $359,19 \text{ mm}^3$  e o testículo esquerdo  $291,67 \text{ mm}^3$ . Com isso, podemos concluir que apesar de ser uma espécie com fotoperíodo negativo e residir em uma cidade com clima tropical e úmido, registrando altas temperaturas diariamente ( $>37^\circ\text{C}$ ), é possível obter-se células espermáticas de boa qualidade. Ademais, este fato viabiliza a utilização de biotecnologias reprodutivas, que por sua vez, promovem melhorias no sistema produtivo desta espécie em território nacional.

**Palavras-chave:** epidídimo, cervídeo, sêmen.

**Keywords:** *epididymis, cervid, semen.*



## **Efeito da inclusão de penicilina-estreptomicina no diluente para refrigeração do sêmen de catetos (*Pecari tajacu*)**

*Effect of the penicillin-streptomycin inclusion on the extender for collared peccary (*Pecari tajacu*) semen cooling*

**Caio Sérgio Santos, Maiko Roberto Tavares Dantas\*, Marina Crisley Gondim Rebouças, Andréia Maria da Silva, Érica Camila Gurgel Praxedes, Livia Batista Campos, Moacir Franco Oliveira, Alexandre Rodrigues Silva**

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: mk\_ufersa@hotmail.com

Apesar de necessária sua inclusão nos diluentes de sêmen, alguns antibacterianos, como a associação penicilina-estreptomicina, podem apresentar efeitos tóxicos a depender de sua concentração. Assim, esse trabalho objetivou avaliar o efeito da inclusão de penicilina-estreptomicina sobre a carga bacteriana, motilidade e integridade de membrana de espermatozoides de catetos (*Pecari tajacu*) durante a refrigeração de sêmen. Foram utilizados cinco animais mantidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). As coletas ocorreram de maio a junho de 2018, sendo os animais submetidos à anestesia e eletroejaculação. O sêmen coletado foi diluído em Tris-citrato-frutose + 20% de gema de ovo, dividido em três alíquotas, sendo uma controle e duas acrescidas de penicilina-estreptomicina (2000 UI e 2mg/mL - P+E 2000/2 e 1000 UI e 1 mg/mL - P+E 1000/1). As amostras foram mantidas refrigeradas a 5°C por até 36 horas, sendo avaliadas imediatamente após a diluição e depois a cada 12 horas (0, 12, 24 e 36h). Em cada tempo, foram realizadas avaliações da motilidade total (MT), por análise computadorizada (sistema IVOS), da integridade da membrana (IM) por meio de sondas fluorescentes (Hoescht/ Iodeto de propídio), bem como a quantificação de bactérias mesófilas (UFC/mL) por meio da técnica de contagem em placas. As médias dos resultados foram analisadas pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ). Os percentuais médios de motilidade total e integridade de membrana não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos com P+E e o controle durante cada período de refrigeração. Os valores médios ( $\pm EP$ ) para motilidade após 36 horas foram de  $9,6 \pm 3,0$ ,  $22,8 \pm 8,5$ ,  $27 \pm 10,2$  para os tratamentos P+E 2000/2, P+E 1000/1 e controle, respectivamente. Já os percentuais médios de espermatozoides com membranas integras após 36 horas foram de  $48,8 \pm 6,7$ ,  $62,2 \pm 4,34$  e  $62,4 \pm 4,4$  para os mesmos tratamentos, respectivamente. As amostras de sêmen diluídas com penicilina e estreptomicina apresentaram menor carga bacteriana ( $P < 0,05$ ) do que o controle logo após a diluição (0h), bem como com 12 e 36 horas de refrigeração. As contagens médias, em UFC/mL, foram de  $1,1 \pm 0,7 \times 10^3$ ,  $2,0 \pm 1,2 \times 10^3$  e  $3,2 \pm 3,0 \times 10^3$  para o tratamento P+E 2000/2 às 0, 12 e 36 horas respectivamente. As contagens médias, em UFC/mL, foram de  $1,5 \pm 1,1 \times 10^4$ ,  $2,7 \pm 2,5 \times 10^4$  e  $1,2 \pm 0,8 \times 10^4$  para o tratamento P+E 1000/1 às 0, 12 e 36 horas, respectivamente. E as contagens médias para o tratamento controle, nos mesmos tempos de refrigeração, foram de  $2,4 \pm 0,8 \times 10^5$ ,  $4,6 \pm 1,5 \times 10^5$  e  $2,3 \pm 0,9 \times 10^5$  UFC/mL, respectivamente. Conclui-se que, a associação penicilina-estreptomicina, em qualquer das concentrações testadas, pode ser eficientemente utilizada na refrigeração do sêmen de catetos, haja vista não apresentar toxicidade sobre os parâmetros testados e ser capaz de controlar a carga bacteriana nas amostras.

**Palavras-chave:** antimicrobiano, biobanco, animal selvagem.

**Keywords:** antimicrobial, biobank, wild animal.

## **Avaliação do desenvolvimento ósseo intrauterino de caititu (*Pecari tajacu*) por meio da ultrassonografia**

*Evaluation of intrauterine bone development of collared peccary (*Pecari tajacu*) by ultrasonography*

**Thyago Habner de Souza Pereira<sup>1,\*</sup>, Frederico Ozanan Barros Monteiro<sup>1</sup>, Gessiane Pereira da Silva<sup>1</sup>, Sandy Estefany Rodrigues de Matos<sup>2</sup>, Leandro Nassar Coutinho<sup>1</sup>, Rafael dos Santos de Andrade<sup>1</sup>, Hani Rocha El Bizri<sup>3</sup>, Pedro Mayor<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação de Saúde e Produção Animal da Amazônia (PPGSPAA), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, PA, Brasil; <sup>2</sup>Residente em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Silvestres, Universidade Federal do Pará (UFPA), Castanhal, PA, Brasil; <sup>3</sup>Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (IDSM), Tefê, AM, Brasil; <sup>4</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Autônoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Espanha.

\*E-mail: thyagohabner1@gmail.com

A ultrassonografia tem se apresentado como ferramenta útil para o diagnóstico clínico e para avaliar o período gestacional de animais selvagens e contribuir no manejo reprodutivo e aprimoramento de biotécnicas. Nesse contexto, o estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o desenvolvimento ósseo intrauterino do caititu (*Pecari tajacu*) e obter dados que auxiliem na estimativa da idade gestacional. O estudo foi realizado utilizando sete embriões e 46 fetos oriundos de caça de subsistência no Peru e Brasil. Inicialmente avaliou-se o comprimento total dorsal (TDL), o comprimento crânio-caudal (CRL) e a massa corporal. Em seguida, realizou-se o exame ultrassonográfico com transdutor multifrequencial (10-18MHz) para identificação de mineralização óssea e mensuração dos ossos do esqueleto axial e apendicular. Os dados foram analisados por meio da estatística descritiva, regressões logísticas lineares e não lineares utilizando os softwares (CurveExpert Professional 2.4 e Statística 8.0). A fórmula utilizada para cálculo da idade fetal foi  ${}^3\sqrt{W} = 0,079 (t - 27,6)$ , onde “W” representa o peso dos fetos a termo; 0,079 é a constante de crescimento fetal específica; “t” representa os dias de gestação e 27,6 equivale a 20% da duração média da gestação em caititus, que é de 138 dias. A idade fetal apresentou forte associação ao TDL ( $r^2 = 0,95$ ;  $p < 0,05$ ) e CRL ( $r^2 = 0,97$ ;  $p < 0,05$ ), com média e desvio padrão de  $14,93 \pm 8,86$  cm e  $10,75 \pm 6,32$ , respectivamente. Foi possível observar o início da mineralização dos ossos do crânio (occipitais, frontal e parietais) em fetos com TDL  $\geq 5,3$  cm (CRL  $\geq 3,2$  cm; 45,8 dias de gestação). A coluna cervical, torácica, lombar e sacral foi observada juntamente com as costelas em fetos com TDL  $\geq 5,8$  cm (CRL  $\geq 4,1$  cm; 50,7 dias) e a última estrutura a ser mineralizada foi a porção coccígea da coluna que teve início em fetos com TDL  $\geq 8,10$  (CRL  $\geq 4,9$  cm; 54,5 dias). Os primeiros ossos do esqueleto apendicular foram identificados em fetos com TDL  $\geq 5,7$  cm (CRL  $\geq 3,8$  cm; 46,0 dias de gestação), no qual foi possível observar mineralização no membro torácico (escápula e úmero) e no membro pélvico (fêmur). Posteriormente, observou-se a mineralização do rádio, ulna, ílio, ísquio, tíbia e fibula em fetos com TDL  $\geq 5,8$  cm (CRL  $\geq 4,1$  cm; 50,7 dias de gestação). O metacarpo e metatarso foram visualizados em fetos com TDL  $\geq 9,7$  cm (CRL  $\geq 7,4$  cm; 63,5 dias). As falanges proximais, médias e distais dos membros torácico e pélvico foram identificadas em fetos com TDL  $\geq 13,0$  cm (CRL  $\geq 10,2$  cm; 78,4 dias) O púbis e o calcâneo foram observados em fetos com TDL  $\geq 13,1$  cm (CRL  $\geq 10,4$  cm; 80,9 dias). Os últimos ossos a se mineralizarem foram o talus com TDL  $\geq 17,8$  cm (CRL  $\geq 14,2$  cm; 101,5 dias) e os ossos do carpo e porção distal do tarso, sendo identificados com TDL  $\geq 22,8$  cm (CRL  $\geq 16,9$  cm; 105,0 dias). Não foi observada mineralização na patela. Com bases nos resultados obtidos, o presente estudo fornece dados relacionados ao desenvolvimento ósseo intrauterino de caititu e auxilia no monitoramento da gestação e estimativa da idade gestacional.

**Palavras-chave:** biometria óssea, desenvolvimento fetal, obstetria.

**Keywords:** bone biometry, fetal development, obstetrics.



## **Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) como avaliação da capacidade reprodutiva de *Procyon cancrivorus***

*Fine needle aspiration cytology (CAAF) as reproductive evaluation of *Procyon cancrivorus**

**Georgia Vergani Battasini<sup>1,\*</sup>, Guilherme Novello<sup>2</sup>, Caroline Mazzochi Sutili<sup>3</sup>,  
Mariana Polesso Mazzuchini<sup>3</sup>, Raqueli Terezinha França<sup>4</sup>, Juliana Aquino Pletsch<sup>4</sup>,  
Fernando Paixão Lisboa<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Médica Veterinária; <sup>2</sup>Mestrando em Biotecnologia Animal - UNESP-Botucatu/SP; <sup>3</sup>Aluno de graduação da Universidade de Caxias do Sul-UCS; <sup>4</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil.

\*E-mail: georgiabattassini@hotmail.com

O *Procyon cancrivorus*, popularmente conhecido como mão-pelada, é um carnívoro silvestre que pode chegar a um metro de comprimento e pesar até 10 kg. Seu nome popular se dá devido aos seus membros torácicos serem adaptados para segurar alimentos, sendo desprovido de pêlos. Sua classificação é considerada Menos Preocupante de acordo com a IUCN (International Union for Conservation of Nature) e está presente em praticamente todo território da América do Sul. Atinge a maturidade sexual no primeiro ano de vida e em vida livre, se reproduzem durante os meses de julho, agosto e setembro. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência da citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) testicular em mão-pelada para avaliar a atividade espermatogênica e identificar células germinativas nesta espécie. Foi utilizado um espécime de mão-pelada, oriundo do Zoológico da Universidade de Caxias do Sul, macho, com idade estimada em 7 anos e peso de 6,3 kg. O animal foi contido e sedado para manejo de rotina com atropina, xilazina e zoletil, seguindo a estrapolação alométrica para estipulação de doses. A CAAF foi realizada através da punção testicular, com agulha (25x7mm) e seringa (10ml), após antissepsia local com álcool 70%. Com o material obtido, foram confeccionados esfregaços do tipo “squash” em lâminas de vidro, secos ao ar e coradas com Panótico rápido<sup>®</sup>. Foram contadas 200 células consecutivas da série espermatogênica para cada testículo e separadas em categorias. Foi possível observar todas as categorias da linhagem espermática em ambos os testículos com uma diferença numérica baixa, comprovando a eficiência produtiva dos mesmos sendo, 10 espermatogônias; 13 espermátocitos primários; 45 espermátides iniciais; 67 espermátides finais e 64 espermatozoides totalizando 199 células da linhagem identificadas para 400 contadas. Além disso, células de Sertoli também foram identificadas, se apresentando interpostas às células espermáticas e contadas separadamente verificando-se um total de 35 de células para 200 células contadas para cada testículo. Sendo assim podemos concluir que a CAAF é uma técnica segura, já que o animal não apresentou efeitos colaterais testiculares após o procedimento, e eficaz na avaliação espermatogênica já que todas as células foram identificadas incluindo espermatozoides, com exceção das células de Leydig.

**Palavras-chave:** *Procyon cancrivorus*, citologia testicular, espermatogênese.

**Keywords:** *Procyon cancrivorus*, testicular cytology, spermatogenesis.

## **Conservação da pele auricular derivada de onças-pintadas, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758) usando as técnicas de vitrificação direta em criotubos e em superfície sólida**

*Conservation of ear skin derived from jaguars, Panthera onca (Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques*

**Érika Almeida Praxedes<sup>1</sup>, Maria Bárbara Silva<sup>1</sup>, Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira<sup>1</sup>, Maria Valéria de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Alana Azevedo Borges<sup>1</sup>, Herlon Victor Rodrigues Silva<sup>2</sup>, Alexandre Rodrigues Silva<sup>1</sup>, Alexsandra Fernandes Pereira<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Pós-graduandas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil; <sup>2</sup>Pós-graduando pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil; <sup>3</sup>Docente do Centro de Ciências Agrárias (CCA), UFERSA, Mossoró, RN, Brasil; <sup>4</sup>Docente do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

O estabelecimento de bancos de pele tem sido proposto como uma ferramenta interessante para a conservação da onça-pintada, visando à obtenção de células somáticas a serem empregadas na clonagem por transferência nuclear e na produção de células induzidas à pluripotência. Nesse sentido, faz-se necessário estabelecer os protocolos de criopreservação tecidual, como a escolha da técnica mais adequada de vitrificação. Portanto, o objetivo foi avaliar os efeitos das técnicas de vitrificação da pele auricular [vitrificação direta em criotubos (VDC) e vitrificação em superfície sólida (VSS)] de cinco onças-pintadas sobre a obtenção de células após o cultivo *in vitro*. Para tanto, fragmentos de pele (9,0 mm<sup>3</sup>) foram criopreservados por VDC ou VSS, e comparados com fragmentos não criopreservados (controle). Para todas as técnicas, uma solução de criopreservação contendo DMEM acrescido de dimetilsulfóxido, sacarose e soro fetal bovino foi empregada. Posteriormente, fragmentos não criopreservados e criopreservados/aquecidos foram cultivados e células recuperadas foram avaliadas quanto à aderência tecidual, confluência celular, viabilidade celular por azul de tripan, e atividade metabólica celular pelo ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisados por ANOVA seguido de teste t não pareado ( $P < 0,05$ ). Após cinco repetições (um animal/uma repetição), nenhuma diferença foi observada entre os grupos não criopreservados e criopreservados para a capacidade de aderência tecidual e confluência celular ( $P > 0,05$ ). Além disso, apenas as células derivadas de fragmentos criopreservados por VSS apresentaram um tempo de crescimento celular circundando os fragmentos similar ( $8,0 \pm 0,3$  dias) ao controle ( $9,2 \pm 1,2$  dias). Adicionalmente, células derivadas dos fragmentos criopreservados por VDC necessitaram de um tempo maior para o crescimento celular ( $11,8 \pm 0,9$  dias), resultando em uma duração total do cultivo maior que os demais grupos (VDC:  $33,8 \pm 0,9$ , VSS:  $30,8 \pm 0,8$ , controle:  $29,2 \pm 0,3$  dias). Embora nenhuma diferença tenha sido observada nas taxas de viabilidade celular entre os grupos criopreservados e não criopreservados, apenas as células derivadas dos fragmentos criopreservados por VSS apresentaram uma taxa de atividade metabólica ( $100\% \pm 13,0$ ) similar ao controle ( $100\% \pm 16,5$ ), as quais diferiram do grupo VDC ( $80,8\% \pm 4,4$ ). Em conclusão, a VSS foi a técnica mais eficiente para a criopreservação da pele de onças-pintadas, quando comparada a VDC. Estes resultados são relevantes para a formação de bancos de recursos somáticos desta espécie, direcionados à criopreservação de amostras adequadas de diferentes indivíduos para aplicações em tecnologias de reprodução assistida.

**Palavras-chave:** bancos de recursos somáticos, criopreservação, felídeos silvestres, cultivo.

**Keywords:** somatic resource banks, cryopreservation, wild felids, culture.



**Célula esteroidogênica do mesonefro da tartaruga-da-amazonia, *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae)**

*Steroidogenic cell in the mesonephro of the Giant South American River Turtle, Podocnemis expansa (Testudine: Podocnemididae)*

**Marcela dos Santos Magalhães<sup>1,2,\*</sup>, Luã Barbalho de Macêdo<sup>3</sup>, Ryshely Sonaly de Moura Borges<sup>4</sup>, Khelven Klay de Azevedo Lemos<sup>5</sup>, Lucas Castanhola Dias<sup>6</sup>, Moacir Franco de Oliveira<sup>7</sup>, Richard Carl Vogt<sup>8</sup>, Carlos Eduardo Bezerra de Moura<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; <sup>2</sup>Professora Credenciada no Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil; <sup>3</sup>Doutorando do Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil; <sup>4</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil; <sup>5</sup>Mestrando no Pós-graduação em biologia estrutural e funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil; <sup>6</sup>Laboratório Temático de Microscopia ótica e eletrônica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil; <sup>7</sup>Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil; <sup>8</sup>Centro de estudos de Quelônios da Amazônia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil.

\*E-mail: marcelasmbio@gmail.com

A tartaruga-da-amazônica, *Podocnemis expansa*, apresenta o sexo determinado pela temperatura de incubação do ninho. Além da temperatura, a concentração de hormônios esteroides é um fator importante para a determinação sexual nessa espécie. Assim como as gônadas, o mesonefro também possui função esteroidogênica importante durante o desenvolvimento e diferenciação gonadal, no entanto ainda não foram descritas as células que desempenham essa função no mesonefro. O objetivo desse trabalho foi identificar e descrever a ultraestrutura dos tipos celulares esteroidogênicos no mesonefro. O mesonefro foi coletado de embriões de *Podocnemis expansa* no período reprodutivo de setembro e dezembro de 2014, durante a diferenciação gonadal (41 a 57 dias) (SISBIO/IBAMA 39472-4; CEUA/INPA 025/2013). As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% e submetidas a processamento histológico. As seções histológicas foram submetidas a imunohistoquímica usando anticorpo anti-aromatase (1:100, ab18995, ABCAM) e anticorpo secundário anti-coelho (1:500; ab6720, ABCAM). Fragmentos do mesonefro também foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilado para análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET). No laboratório foram pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilado durante 2h, seguido de 3 lavagens no mesmo tampão, desidratação em séries crescente de etanol e incluídas em resina Durcupan-ACM Fluka®. Seções ultrafinas de 70 nm foram preparadas no Ultramicrotomo Reichert OM U3, contrastadas com 5% de acetato de uranila seguido por citrato de chumbo a 0,5%. Imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de Transmissão 109 Zeiss EM operando em uma tensão de aceleração de 80 kV. As análises de imunohistoquímica revelaram células fortemente imunorreativas para aromatase na periferia dos túbulos renais. Por meio das análises das eletrofotomicrografias verificou-se que essas células possuíam ultraestrutura característica de atividade esteroidogênica, como núcleo grande, claro, com nucléolo evidente; citoplasma abundante marcado por vesículas lipídicas com eletrodensidades diferentes. Essas células estavam sempre próximas a capilares sanguíneos e geralmente justapostas aos túbulos proximais. A presença dessas células ainda não haviam sido descritas nesse órgão em tartarugas e esse achado confirma o papel do mesonefro na produção de esteroides, atividade importante durante o processo de diferenciação gonadal.

**Palavras chave:** quelônio, hormônio esteroide, diferenciação gonadal.

**Keywords:** turtle, steroid hormone, gonadal differentiation.

## **Desenvolvimento ósseo gestacional de paca (*Cuniculus paca*, Rodentia, Cuniculidae) por meio da ultrassonografia**

*Gestational bone development of lowland paca (*Cuniculus paca*, Rodentia, Cuniculidae) by ultrasonography*

**Gessiane Pereira da Silva<sup>1,\*</sup>, Frederico Ozanan Barros Monteiro<sup>1</sup>,  
Thyago Habner de Souza Pereira<sup>1</sup>, Sandy Estefany Rodrigues de Matos<sup>2</sup>,  
Leandro Nassar Coutinho<sup>1</sup>, Rafael dos Santos de Andrade<sup>1</sup>, Hani Rocha El Bizri<sup>3</sup>,  
João Valsecchi do Amaral<sup>3</sup>, Pedro Mayor<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação de Saúde e Produção Animal da Amazônia (PPGSPAA), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, PA, Brasil; <sup>2</sup>Residente em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Silvestres, Universidade Federal do Pará (UFPA), Castanhal, PA, Brasil; <sup>3</sup>Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (IDSM), Tefé, AM, Brasil; <sup>4</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Autônoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Espanha.

\*E-mail: gessyane05@hotmail.com

Ainda não se tem informações detalhadas sobre o desenvolvimento ósseo intrauterino por meio da ultrassonografia na paca (*Cuniculus paca*). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento do esqueleto axial e apendicular nessa espécie. Foram utilizados 102 embriões/fetos oriundos da caça de subsistência no Peru e Brasil. A pesagem e biometria externa foram feitas para obter a massa corporal, comprimento total dorsal (TDL) e comprimento crânio caudal (CRL), associando essas variáveis à idade gestacional e às avaliações ultrassonográficas dos ossos. Utilizou-se o transdutor linear multifrequencial (10-18MHz). Os dados foram analisados por meio da estatística descritiva, regressões logísticas lineares e não lineares utilizando os softwares (CurveExpert Professional 2.4 e Statistica 8.0). A fórmula para o cálculo da idade fetal foi  $\sqrt[3]{W} = 0,077 (t - 29,8)$ , onde “W” representa o peso dos fetos a termo; 0,077 é a constante de crescimento fetal específica; “t” representa os dias de gestação e 29,8 equivale a 20% da duração média da gestação em pacas, que é de 149 dias. A idade fetal foi associada ao TDL ( $r^2=0,97$ ;  $p<0,05$ ) e CRL ( $r^2=0,96$ ;  $p<0,05$ ), com média e desvio padrão de  $18,15 \pm 9,12$  cm e  $11,80 \pm 6,45$  cm, respectivamente. O início da mineralização dos ossos do crânio (occipitais, frontal e parietais), ocorreu em fetos com TDL  $\geq 4,10$  cm (CRL  $\geq 2,10$  cm; 44 dias de gestação). Todas as vértebras e costelas estavam mineralizadas com TDL de 12,80 cm (CRL = 8,60 cm; 77 dias). Fetos com TDL  $\geq 6,70$  cm (CRL  $\geq 3,10$  cm; 51 dias) apresentaram início da mineralização no membro torácico (escápula, úmero, rádio, ulna) e do membro pélvico (ílio, ísquio, fêmur, tíbia e fíbula). A clavícula foi observada em fetos com TDL  $\geq 8,50$  cm (CRL  $\geq 4,30$  cm; 53 dias). O metatarso e metacarpo foram visualizados em fetos com TDL  $\geq 11$  cm (CRL  $\geq 5,90$  cm; 64 dias). Falanges proximais dos membros torácico e pélvico foram identificadas em fetos com TDL  $\geq 14,70$  cm (CRL  $\geq 8,70$  cm; 78 dias) e TDL de 15,10 cm (CRL  $\geq 9,20$  cm; 82 dias), respectivamente. O púbis foi observado em fetos com TDL  $\geq 16$  cm (CRL  $\geq 9,60$  cm; 85 dias). Os últimos ossos a se mineralizarem foi a patela com TDL  $\geq 23$  cm (CRL  $\geq 15,90$  cm; 113 dias) e os ossos do carpo e tarso, sendo identificados com TDL  $\geq 30,80$  cm (CRL  $\geq 26,40$  cm; 140 dias). A paca demonstra desenvolvimento precoce dos ossos do esqueleto axial e apendicular, isso é importante para explicar a precocialidade e favorecer a sobrevivência pós-natal da espécie.

**Palavras-chave:** reprodução, desenvolvimento fetal, Amazônia.

**Keywords:** reproduction, fetal development, Amazônia.

## **Efeito dos diluidores ACP<sup>®</sup> e BTS na refrigeração do sêmen de queixada (*Tayassu pecari*) a 15°C por 24 horas**

*Effect of ACP<sup>®</sup> and BTS extenders on cooling white lipped peccary (*Tayassu pecari*) semen at 15°C for 24 hours*

**Paola Pereira das Neves Snoeck<sup>\*</sup>, Celso Henrique Souza Costa Barros, William Morais Machado, Renan Luiz Albuquerque Vieira, Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho<sup>1</sup>**

Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil.

<sup>\*</sup>E-mail: paolasnoeck@gmail.com

Os diluidores são importantes e indispensáveis para conservar refrigerado o sêmen de diferentes espécies domésticas e silvestres. Dentre estes, o ACP-103<sup>®</sup> e o BTS já foram descritos para refrigerar o sêmen de suíno e o ACP-116<sup>®</sup> para refrigerar o sêmen de caititu (*Pecari tajacu*). Esses diluidores, no entanto, ainda não foram testados para conservação do sêmen de queixada (*Tayassu pecari*) que é um mamífero neotropical classificado como vulnerável à extinção. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito do ACP-103<sup>®</sup>, ACP-116<sup>®</sup> e BTS nas características de movimento espermático, integridade estrutural e funcional das membranas plasmática dos espermatozoides do queixada refrigerados a 15°C por 24 horas. Foram usados cinco ejaculados de quatro queixadas machos adultos. No momento da coleta de sêmen, os animais eram contidos com auxílio de puçá de rede e submetidos ao protocolo de sedação e anestesia, com associação de acepromazina e cetamina. Como método de coleta de sêmen foi utilizado um eletroejaculador (modelo Eletrogen<sup>®</sup>) seguindo protocolo de estimulação elétrica semelhante ao descrito para caititus. Transcorrida a coleta, as amostras foram diluídas para atingir 35 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL em: ACP-103<sup>®</sup>; ACP-116<sup>®</sup> e Prolimax<sup>®</sup>BTSE (BTS). A refrigeração ocorreu com o auxílio de uma caixa térmica de transporte seminal (BotuFLEX<sup>®</sup>) preparada para garantir temperatura final de armazenamento de 15°C por 24h. As amostras de dois ejaculados que resistiram ao processo de refrigeração tiveram suas características de movimento espermático avaliadas pelo Sperm Class Analyser<sup>®</sup> (SCA<sup>®</sup>; Microptics S.L, v.5.2, Barcelona, Espanha) usando as recomendações do software para avaliar o espermatozoide suíno. Os parâmetros avaliados foram: Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Hiperativos, Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Velocidade Curvilinear (VCL), Velocidade Linear Progressiva (VSL), Velocidade Média do Trajeto (VAP), Amplitude do Descolamento Lateral da Cabeça Espermática (ALH) e Frequência do Batimento Flagelar Cruzado (BCF). A integridade estrutural foi avaliada usando a combinação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) e a integridade funcional das membranas plasmáticas foi avaliada pelo teste hiposmótico (HOST) usando água destilada. As amostras diluídas e refrigeradas em ACP-103<sup>®</sup>; ACP-116<sup>®</sup> e BTS apresentaram motilidade total média de 93,5, 78,4 e 97,0 %; motilidade progressiva média de 45,5, 34,8 e 51,6 %; hiperativos de 4,6, 3,5 e 5,3 %; a VCL de 44,0, 42,5 e 47,3 µm/s; a VSL de 14,4, 14,0 e 14,2 µm/s; a VAP de 25,8, 25,5 e 25,7µm/s; a LIN de 32,1, 32,2 e 30,2 %; a STR de 55,1, 53,9 e 55,5 %; a ALH de 2,4, 2,3 e 2,6 µm e a BCF 5,8, 5,7 e 6,1 Hz, respectivamente, sem diferença entre os diluidores (P>0,05). O percentual de espermatozoides com integridade estrutural encontrado foi de 56,0, 62,3 e 51,5% e funcionalmente íntegros de 46,5, 56,5 e 60,0 % após a refrigeração nos diluidores ACP-103<sup>®</sup>, ACP-116<sup>®</sup> e BTS, respectivamente (P>0,05). Concluiu-se que é possível utilizar os três diluidores testados para refrigerar o sêmen de queixada por um período de 24 horas na temperatura de 15°C.

**Palavras-chave:** diluidores, biobanco, animais silvestres, reprodução assistida.

**Keywords:** extenders, biobank, wildlife, assisted reproduction.



## **Circadian variation in faecal androgens metabolites of oral melatonin treated and non treated captive brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*)**

*Variação circadiana dos metabólitos de andrógenos fecais de machos de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) tratados e não tratados com melatonina oral*

**Yuki Tanaka\*, Maria Helena Mazzoni Baldini, José Maurício Barbanti Duarte**

Deer Research and Conservation Center (NUPECCE), São Paulo State University, Faculty of Agriculture and Veterinary Sciences, Department of Animal Sciences, Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP, Brasil.

\*Email: yuki.tnak@gmail.com

Melatonin plays an important role in the reproductive seasonality of deer from temperate regions. This hormone has a stimulatory effect on the secretion of GnRh and LH, and LH stimulates the secretion of testosterone by the Leydig cells in the testis. Deer from temperate regions usually experiences pronounced changes in reproductive parameters during the transition between mating and non mating period due to photoperiod variation. Such changes in deer can be observed in the antler cycle during the transition from autumn to winter season: the velvet antler shed and becomes hard antler, which indicates the maximum reproductive status and maximum testosterone production. This period, when photoperiod becomes shorter and the duration of melatonin secretion increases, deer is sexually active and is ready to the rutting period. However, deer from tropical regions is known to have an aseasonal reproductive pattern, and according to a previous study, the captive brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) does not exhibit an annual pattern in androgen secretion and lack of a pattern in the antler cycle. However, in free ranging individuals, the antler cycle is present, suggesting a possible seasonal reproduction characteristic. The objective of this study was to determine whether that *Mazama gouazoubira* bucks could respond to melatonin treatment by *enhancing* testosterone secretion. Therefore, this study has been conducted by comparing the daily faecal androgens metabolites (FAM) concentration from melatonin treated group versus non treated group. Four *M. gouazoubira* bucks were fed with 2 mg of melatonin inside of a banana for 42 days, 3 hour before dark onset and three bucks received just the banana representing the control group. 205 faecal samples were collected throughout the day from melatonin treated and non treated group, every three hours for a period of four days. The FAM concentration in samples were measured with a competitive testosterone enzyme immunoassay (EIA) (R156/7; provided by C. Munro). FAM concentration showed that there was a slight tendency to increase from the early hours of evening to last evening hours in both groups. Additionally, *there was no difference in mean FAM concentration by faecal time collection in melatonin treated versus non treated group ( $p > 0,05$ )*. This result suggest that melatonin treatment has no effect in brown brocket deer reproduction, indicating that this species is a non-seasonal breeder.

**Keywords:** hormone measurement, testosterone, ELISA, reproductive biology.

**Palavras-chaves:** dosagem hormonal, testosterona, ELISA, biologia reprodutiva.



## **Morfologia do ovário durante o desenvolvimento embrionário em espécie de quelônio com determinação sexual pela temperatura, *Podocnemis expansa***

*Ovary morphology during embryonic development in a turtle species with temperature-dependent sex determination, Podocnemis expansa*

**Marcela dos Santos Magalhães<sup>1,2,\*</sup>, Maria Fabiele Silva Oliveira<sup>3</sup>, Lucas Castanhola Dias<sup>4</sup>, Richard Carl Vogt<sup>5</sup>, Carlos Eduardo B. de Moura<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; <sup>2</sup>Professora Credenciada no Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil; <sup>3</sup>Mestranda em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil; <sup>4</sup>Laboratório Temático de Microscopia ótica e eletrônica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil; <sup>5</sup>Centro de estudos de Quelônios da Amazônia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus AM, Brazil; <sup>6</sup>Departamento de Ciências Animal, Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: marcelasmbio@gmail.com

*Podocnemis expansa*, conhecida como tartaruga-da-amazônia, é o maior quelônio de água doce da América do Sul e apresenta a determinação sexual influenciada pela temperatura de incubação (TSD). O sexo é determinado em um período denominado termosensível (TSP), que corresponde a fase de diferenciação gonadal. Esse estudo objetivou caracterizar a morfologia do ovário durante desenvolvimento de *P. expansa* em ambiente natural. O estudo foi realizado entre setembro e dezembro de 2014, em uma praia do Centro de Pesquisa e Preservação de Quelônios Aquáticos, rio Uatumã, Balbina, Amazonas (SISBIO/IBAMA 39472-4; CEUA/INPA 025/2013). Ao longo do desenvolvimento embrionário foram realizadas análises por microscopia de luz, e determinada a média da temperatura de incubação do ninho com auxílio sensor remoto de temperatura, Hobo data loggers (Onset™ Computer Corporation). O período de incubação durou entre 58 a 64 dias, com temperatura média de incubação de 30,3°C. O desenvolvimento gonadal em *P. expansa* foi agrupado em três etapas, da migração das células germinativas primordiais (CGP), estabelecimento da gônada indiferenciada e diferenciação gonadal. As CGP foram visualizadas no 5º dia de incubação no endoderma do saco vitelino, e nos dias seguintes migrando em direção a região ventromedial do mesonefro presuntivo. A partir do 14º dia a gônada indiferenciada se estabeleceu na região ventromedial do mesonefro, sendo identificadas duas regiões, o córtex constituído pelas CGP, e a região medular com os cordões sexuais primitivos. O início da diferenciação do ovário ocorreu, aproximadamente no 36º dia de incubação. Macroscopicamente a gônada é delgada, alongada de aspecto fusiforme. Microscopicamente o ovário apresenta aspecto pregueado com epitélio germinativo formado por células cúbicas a cilíndricas. Duas regiões ovarianas são definidas: o córtex que se torna espesso devido a proliferação das CGP que estão distribuídas em várias camadas; e na medula é observado que as células não estão mais organizadas em cordões. As etapas de diferenciação gonadal da *P. expansa* em ambiente natural foram semelhantes a outras espécies de quelônios com TSD descritas em condições de laboratório. Portanto, esses achados são importantes para subsidiar a elaboração de estratégias para conservação em quelônios com TSD.

**Palavras-chave:** gonadogênese, determinação sexual, tartaruga-da-amazônia.

**Keywords:** gonadogenesis, sexual determination, Giant South American River Turtle.



**Morfologia das gônadas durante o desenvolvimento embrionário de *Podocnemis unifilis*  
(Testudines: Podocnemididae)**

*Morphology of the gonads during embryonic development of *Podocnemis unifilis* (Testudines:  
Podocnemididae)*

**Maria Fabiele Silva Oliveira<sup>1</sup>, Lucas Castanhola Dias<sup>2</sup>, Carlos Eduardo B. Moura<sup>3</sup>,  
Richard C. Vogt<sup>4</sup>, Marcela dos Santos Magalhães<sup>5,\*</sup>**

<sup>1</sup>Mestranda em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil; <sup>2</sup>Técnico no Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; <sup>3</sup>Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido;

<sup>4</sup>Pesquisador Adjunto do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; <sup>5</sup>Professora do Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

\*E-mail: marcelasmbio@gmail.com

*Podocnemis unifilis*, conhecida popularmente como Tracajá, é um quelônio de água doce encontrado em todos os estados do Brasil que fazem parte da bacia Amazônica. Os filhotes dessa espécie apresentam determinação sexual dependente da temperatura do ninho durante a incubação. Os testículos ou ovários são formados a partir de uma gônada indiferenciada ou bissexual, sob influência da temperatura e de hormônios esteroides. No entanto, pouco se sabe sobre a morfologia desses órgãos durante o desenvolvimento embrionário nessa espécie. O presente trabalho objetivou descrever morfologicamente o desenvolvimento gonadal durante o desenvolvimento embrionário de *P. unifilis*. Para o experimento 100 ovos foram coletados na comunidade Granja Ceres, pertencente ao município de Barreirinha – Amazonas, e incubados artificialmente a uma temperatura e umidade média de 31,8° C e 97,1% respectivamente, no laboratório de cultivo de Plâncton do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, para o acompanhamento do desenvolvimento gonadal. O embrião foi separado das membranas extraembrionárias, eutanasiado, dissecado e imagens obtidas utilizando câmera digital Canon SX270 HS acoplada ao microscópio estereoscópio Leica EZ4 para análise, e posteriormente fixados em solução de bouin (SISBIO n° 39472-9; CEUA/INPA n° 050/2018). O período de incubação foi de 60 dias. Diariamente foi retirado de um a dois ovos da incubadora. Macroscopicamente, entre o 17° e 18° dias de incubação foi possível observar o início da formação gonadal, que possuía coloração esbranquiçada pouco perceptível, localizada aproximadamente no terço médio da região ventromedial do mesonefro (que nessa fase do desenvolvimento embrionário ocupa quase toda a extensão do embrião), porém não é possível identificar uma separação entre o mesonefro e a gônada. Ao 19° dia do desenvolvimento uma leve diferenciação entre o mesonefro e gônada já é identificada, no entanto torna-se claramente evidente no 23° dia de incubação. Quando também se observa seu formato fusiforme. Entre o 24° e 28° dia a gônada apresenta maior espessura, enquanto que o mesonefro diminui de volume em relação ao corpo do embrião. Do 32° ao 55° o mesonefro vai regredindo em volume e se tornando estreito, enquanto que, no mesmo período a gônada torna-se mais espessa e aumenta o comprimento em relação ao mesonefro, ocupando quase que totalidade do espaço que antes era apenas mesonefro. Entre o 56° e 60° dia de incubação a gônada já está completamente diferenciada e permanece localizada na região ventromedial do mesonefro ocupando um espaço desde o início ao final do comprimento do mesonefro. Macroscopicamente o ovário é alongado e delgado, e o testículo é menor que o ovário e mais largo. Durante todo o período de incubação, as gônadas se desenvolveram unidas ao mesonefro por uma serosa. Dessa forma conclui-se que a formação gonadal apresenta modificações morfológicas evidentes, e possibilita a diferenciação de testículo e ovário macroscopicamente.

**Palavras-chave:** gônadas, desenvolvimento embrionário, testudines.

**Keywords:** gonads, embryonic development, testudines.



## **Efeito da privação de soro sobre a sincronização do ciclo celular de fibroblastos derivados da pele de catetos, *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758)**

*Effect of serum starvation on cell cycle synchronization fibroblast derived from skin collared peccaries, Pecari tajacu (Linnaeus, 1758)*

**Alana Azevedo Borges<sup>1</sup>, Maria Claudia dos Santos Luciano<sup>2</sup>, Matheus Barbosa do Nascimento<sup>3</sup>,  
Gabriela Pereira de Oliveira Lira<sup>1</sup>, Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira<sup>4</sup>,  
Claudia do Ó Pessoa<sup>5</sup>, Alexsandra Fernandes Pereira<sup>6,\*</sup>**

<sup>1</sup>Pós-graduandas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil; <sup>2</sup>Doutoranda pela Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil; <sup>3</sup>Graduando do Curso de Biotecnologia, CCBS, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil;

<sup>4</sup>Pós-Doutora do Laboratório de Oncologia Experimental no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, UFC, Fortaleza, CE, Brasil; <sup>5</sup>Docente do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, Fortaleza, CE, Brasil; <sup>6</sup>Docente do Curso de Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

A clonagem por transferência nuclear de células somáticas consiste numa alternativa para a conservação de catetos, mamíferos silvestres de grande relevância por seu potencial econômico, científico e ecológico. Nesse contexto, a otimização das etapas envolvidas nessa biotécnica, como a sincronização dos carioplastos em G0/G1 do ciclo, são cruciais para o seu sucesso na espécie de interesse. Portanto, o objetivo foi avaliar o efeito da privação de soro fetal bovino (SFB) sobre a sincronização na fase G0/G1 de fibroblastos derivados de catetos. Para tanto, foram utilizados fibroblastos criopreservados da terceira passagem obtidos de fragmentos de pele de quatro catetos adultos. Após a descongelação, fibroblastos cultivados e com 70% de confluência tiveram o meio de cultivo com 10% de SFB substituído por 0,5% de SFB. Em seguida, células foram avaliadas de 24 h a 96 h de cultivo em privação de soro. Células em crescimento com 70% de confluência e não submetidas à supressão de SFB foram consideradas como grupo controle. Para análise do ciclo celular, células ao final do seu período de tratamento foram tripsinizadas, centrifugadas, fixadas em etanol e armazenadas a -4°C. Posteriormente, as células foram incubadas em solução composta por iodeto de propídio (20 µg/mL) e RNase (50 µg/mL) por 50 min. Subsequentemente, todas as células foram analisadas por citômetro de fluxo Guava EasyCyte Desktop (Guava Technologies). Para cada amostra, 15.000 eventos foram registrados, e histogramas gerados para avaliar o percentual de células em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S, G2/M) usando o software MODFIT versão 5.0. Os dados foram expressos como média ± erro padrão e analisados pelo software GraphPad ( $P < 0,05$ ). Assim, após cinco repetições (um animal/repetição), fibroblastos submetidos à privação de SFB por 96 h apresentaram um maior percentual de G0/G1 (79,0% ± 1,6), quando comparados aos fibroblastos não submetidos à sincronização (68,1% ± 8,5,  $P < 0,05$ ). Além disso, nenhuma diferença foi observada entre os fibroblastos não sincronizados e sincronizados por 24 h (78,7% ± 2,3), 48 h (78,1% ± 1,7) e 72 h (75,8% ± 2,9). Adicionalmente, nenhuma diferença foi observada entre as demais fases (S, G2/M) em nenhum dos períodos avaliados ( $P > 0,05$ ). Portanto, a privação de SFB por 96 h promoveu a sincronização de fibroblastos de catetos na fase G0/G1. Estes resultados são relevantes para o desenvolvimento da técnica de clonagem em catetos.

**Palavras-chave:** carioplasto, transferência nuclear de células somáticas, mamíferos silvestres.

**Keywords:** *karyoplast, somatic cell nuclear transfer, wild mammals.*

## **Morfologia funcional dos testículos da raia de água doce da bacia Amazônica, *Potamotrygon wallacei* (Chondrichthyes; Elasmobranchii)**

*Functional morphology of the testis of the freshwater stingray from the Amazon basin, Potamotrygon wallacei (Chondrichthyes; Elasmobranchii)*

**Rebeca Fontenele Moda<sup>1,\*</sup>, Raony Cesar Belém<sup>2</sup>, Wallice Luiz Paxiúba Duncan<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda em Zootecnia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Morfologia Funcional, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

\*E-mail: fonteneler7@gmail.com

Raias da subfamília Potamotrygoninae são os únicos condriactos verdadeiramente de água doce. Ocorrem exclusivamente nas grandes bacias hidrográficas da América do Sul, exceto no Rio São Francisco. A espécie *Potamotrygon wallacei* (localmente conhecida como raia cururu) é endêmica do Rio Negro e seus tributários (bacia Amazônica). Esta raia sofre pressão da pesca de subsistência (com finalidade ornamental). Por isso, faz-se necessário estudo sobre a biologia reprodutiva que possam subsidiar os programas de manejo e conservação da espécie. Neste estudo foram analisadas seis raias machos com tamanhos que variavam de 14,2 a 23,5 cm de largura do disco. Os tamanhos compreendem as classes de desenvolvimento classificadas como: imaturos, maduro, maduros ativos. As raias foram capturadas sob autorização do SISBIO/ICMBio n° 9324-1 no município de Barcelos (AM). Os animais foram abatidos conforme recomendação do CONCEA aprovado pelo CEUA/UFAM n° 031/2015. As gônadas e os ductos extratesticulares foram imediatamente removidos e fixados em formalina tamponada salina. Os tecidos foram desidratados e emblocados em resina histológica metacrilato e corados em azul de toluidina (0,25%). As imagens das secções foram digitalizadas e os componentes testiculares e extratesticulares foram descritos histologicamente e semiquantificados estereologicamente. Como nas demais espécies de raias marinhas ou água doce, os testículos da raia *P. wallacei* localizam-se na região anterior dorsal da cavidade abdominal. Os lobos testiculares apresentaram diferentes tamanhos conforme o estágio do animal. Possuem a forma de lobos ovais ou arredondados e de coloração amarelada, avermelhada ou hialina. Estão ainda pareados sobre o órgão epigonal e conectados cada qual a seu epidídimo correspondente. Cada lobo possui componentes celulares da espermatogênese. Microscopicamente, observou-se uma clara organização do tecido durante a espermatogênese dividindo-se em três zonas principais: papila germinal, zona germinativa e zona espermatogonial. A papila germinal localiza-se no dorso de cada lobo envolvido por uma camada de tecido conjuntivo (túnica albugínea) e não possui clara evidência de células germinativas primárias. A zona germinativa, na qual espermatogônias primárias apresentam-se organizadas em grupos formando camadas grossas de um cisto. A zona espermatogonial onde se observam espermatogônias secundárias envoltas por células de Sertoli, formando uma camada ainda mais evidente da parede de um cisto e, no entorno do tecido conjuntivo que as envolve, a presença de células de Leydig. Ao quantificar tais componentes, observou-se uma elevada proporção de espermatogônias secundárias nos machos imaturos e maduro, e grande variação nos machos maduros ativos. Isto sugere que o estágio de repouso (pós-cópula) fortemente influencia na densidade desse componente dentro da gônada. Todas estas características morfológicas são similares aos já descritos para outras espécies de raias tanto marinhas, quanto de água doce da subfamília Potamotrygoninae.

**Palavras-chave:** Potamotrygonidae, raia cururu, lobos testiculares.

**Keywords:** *Potamotrygonidae, cururu stingray, testicular lobules.*



## **Imunolocalização de receptores de estradiol no mesonefro durante o desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae)**

*Immunolocalization of estradiol receptors in the mesonephro during the embryonic development of *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae)*

**Khelven Klay de Azevedo Lemos<sup>1</sup>, Ryshely Sonaly de Moura Borges<sup>2</sup>, Luã Barbalho de Macedo<sup>3</sup>, Lucas Castanhola Dias<sup>4</sup>, Marcela dos Santos Magalhães<sup>5</sup>, Richard Carl Vogt<sup>4</sup>, Moacir Franco de Oliveira<sup>6</sup>, Carlos Eduardo Bezerra de Moura<sup>6,\*</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil; <sup>2</sup>Graduanda de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil; <sup>3</sup>Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil; <sup>4</sup>Laboratório Temático de Microscopia ótica e eletrônica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil; <sup>5</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; <sup>6</sup>Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: carlos.moura@ufersa.edu.br

*Podocnemis expansa* apresenta a determinação sexual dependente de temperatura. Durante o terço médio do período de incubação, a gônada embrionária encontra-se sensível às variações de temperatura, que influencia o ambiente endócrino, afetando diretamente a razão sexual da prole. A ação do estrógeno é mediada por receptores estrogênicos do tipo  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) e  $\beta$  (ER $\beta$ ) que são capazes de alterar a transcrição gênica desencadeando respostas biológicas fundamentais para o estabelecimento do ovário. O mesonefro é um dos órgãos responsáveis pela produção de estrógenos nessa fase, no entanto essa função ainda não foi completamente compreendida. Assim, este trabalho se propôs a avaliar a imunomarcagem de receptores estrogênicos (tipo  $\alpha$  e  $\beta$ ) no mesonefro de *P. expansa*, durante o desenvolvimento embrionário. Este estudo utilizou 50 embriões de cinco ninhos diferentes, coletados do 22° ao 60° período de incubação, em uma praia do Centro de Pesquisa e Preservação de Quelônios Aquáticos (CPPQA), Balbina, Amazonas, Brasil (01°54'56.9"S, 059°28'18"W) (SISBIO/IBAMA 39472-4, CEUA/INPA 025/2013). Após a coleta dos ovos, os embriões foram eutanasiados com sobredose de tiopental (100 mg.Kg-1) em associação com lidocaína 4 mg.Kg-1 via intraperitoneal. Estes foram dissecados e o complexo gônada/mesonefro removidos sob estereoscópico. Fragmentos do complexo foram submetidos a processamento histológico e ensaios de imunohistoquímica para os receptores de estradiol, utilizando-se os anticorpos, policlonais contra ER $\alpha$  e ER $\beta$  coelho (AB75635 e AB3577 da ABCAM, respectivamente) e o secundário coelho IgG H&L/HRP(AB205718). Foram analisadas secções semiseriadas do complexo gônada/ mesonefro em três diferentes fases do desenvolvimento: indiferenciada ou bipotencial (entre o 22° e 27° dia), termosensível ( entre o 25° e 42° dia) e gônada diferenciada ( acima do 37° dias de incubação). Em todas as fases do desenvolvimento embrionário foram observadas intensa imunomarcagem tanto para ER $\alpha$  como ER $\beta$  na região citoplasmática, das células dos túbulos contorcidos proximais como também nos túbulos contorcidos distais. Estas marcações encontradas no período embrionário neste órgão, sugerem que os compostos estrogênicos estejam envolvidos na organização, proliferação, e maturação das células do complexo gônada/mesonefro e no estabelecimento dos órgãos do aparelho urogenital embrionário de ambos os sexos, como também são tecidos sítios da esteroidogênese durante o período da determinação sexual.

**Palavras-chave:** quelônios, esteroidogênese, desenvolvimento embrionário.

**Key words:** chelonians, steroidogenesis, embryonic development.

## Colheita de sêmen por ejaculação química e avaliação seminal de Mão-Pelada (*Procyon cancrivorus*)

*Chemical semen collection and seminal evaluation in Procyon cancrivorus*

**Georgia Vergani Battasini<sup>1,\*</sup>, Guilherme Novello<sup>2</sup>, Caroline Mazzochi Sutili<sup>3</sup>,  
Mariana Polesso Mazzuchini<sup>3</sup>, Raqueli Terezinha França<sup>4</sup>, Juliana Aquino Pletsch<sup>4</sup>,  
Fernando Paixão Lisboa<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Médica Veterinária; <sup>2</sup>Mestrando em Biotecnologia Animal - UNESP-Botucatu/SP; <sup>3</sup>Aluno de graduação da Universidade de Caxias do Sul-UCS; <sup>4</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Caxias do Sul-UCS, RS, Brasil.

\*E-mail: georgiabattasini@hotmail.com

O *Procyon cancrivorus*, popularmente conhecido como mão-pelada, é um carnívoro silvestre de ampla distribuição pela América do Sul. É um animal terrestre, solitário, noturno e possui o hábito de molhar os alimentos antes de ingerir. Sua classificação é considerada Menos Preocupante de acordo com a IUCN (International Union for Conservation of Nature) e está presente em praticamente todo território da América do Sul. Por sua vez, pouco se sabe sobre suas características reprodutivas, o que pode estar diretamente relacionado com sua distribuição territorial. O objetivo deste trabalho foi testar a ejaculação química como método de colheita de sêmen de mão-pelada e ainda avaliar características espermáticas da espécie como Volume (V), Motilidade Total (MT), Concentração Espermática (CE) e Patologia Espermática (PE). Foi utilizado um espécime de mão-pelada, oriundo do Zoológico da Universidade de Caxias do Sul, macho, com idade estimada em 7 anos e peso de 6,3 kg. O animal foi contido e sedado para manejo de rotina com atropina, xilazina e zoletil, seguindo a estrapolação alométrica para estipulação de doses. Após a realização do exame clínico geral, foi administrado dexmedetomidina na dose de 0,02mg/kg intramuscular (IM). Foi realizada a lavagem do pênis com solução fisiológica e então inserido uma sonda uretral nº04 para a lavagem da bexiga, visando evitar a contaminação do ejaculado por urina. Estima-se em 20 a 30 minutos o tempo para que a medicação produza efeitos. Em função disso, a uretra foi novamente sondada até a próstata depois de transcorridos 20 minutos, acoplado-se uma seringa de 3ml para auxiliar na colheita do sêmen. O volume foi medido com auxílio de um pipetador de volume variável. A amostra foi devidamente aquecida em banho maria seco para a avaliação da MT, realizada com auxílio de lâmina e lamínula com microscópio em aumento de 160x; CE, avaliada com o uso de câmara de Neubauer®, onde o sêmen foi diluído na proporção de 1:10 em formol salina tamponada; e PE, realizada por esfregaço corado em Panótipo Rápido®, sendo contadas 200 células. O volume total do ejaculado foi de 30 µL, a MT 0% e CE  $13 \times 10^6$  espermatozoides/ml e 390.000 espermatozoides totais no ejaculado. Na avaliação da PE foi observado um total de 32% de defeitos, sendo 28% de defeitos maiores e 4% defeitos menores. Os defeitos predominantes foram os de cauda, representando 18%. A dexmedetomidina foi eficaz para induzir a ejaculação na espécie estudada, já que é agonista  $\alpha_2$  adrenérgico, a qual provoca a contração dos ductos deferentes e auxilia na liberação dos espermatozoides na uretra. A ausência de MT pode estar relacionada com o período de repouso sexual do animal, já que o mesmo é solitário há muitos anos, ou a algum detalhe do processamento que será investigado em próximos estudos. O resultado da PE demonstra a capacidade reprodutiva do indivíduo, já que há evidência de bom percentual de células integras na avaliação. A predominância de patologias de cauda também pode ser em reflexo à problemas referentes à manipulação, ou a uma característica da espécie, já que nada se sabe a respeito. Com estes resultados, podemos concluir que a técnica de ejaculação química é viável, porém outros animais serão avaliados para estimar a real capacidade reprodutiva da espécie.

**Palavras-chave:** *Procyon cancrivorus*, sêmen, ejaculação química, dexmedetomidina.

**Keywords:** *Procyon cancrivorus*, semen, chemical ejaculation, dexmedetomidine.