

Uso do FGF em sistemas organotípico e tridimensional para o cultivo *in vitro* de fragmentos testiculares de catetos pré-púberes – resultados preliminares

Andreia Maria da Silva¹, Ana Glória Pereira¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Nayra Rachel Nascimento Luz¹, Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Alexsandra Fernandes Pereira², Alexandre Rodrigues Silva¹.

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Mossoró, RN, Brasil;

²Laboratório de Biotecnologia Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil
e-mail: alexrs@ufersa.edu.br

Uma vez que as populações de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) têm sido ameaçadas pela devastação antrópica nos biomas Caatinga e Mata Atlântica, estudos voltados para a conservação de seu germoplasma são fundamentais para proteger a espécie da extinção. Nesse sentido, o cultivo *in vitro* de fragmentos testiculares é uma biotecnologia essencial para a produção de gametas a partir de tecidos gonadais armazenados em bancos de germoplasma, especialmente de indivíduos pré-púberes. O objetivo do estudo foi avaliar diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (CIV) e a influência do fator de crescimento fibroblástico (FGF) durante o cultivo longo de tecidos testiculares de catetos pré-púberes. Para tanto, testículos de dois indivíduos pré-púberes foram coletados no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres/UFERSA (Aprovação no comitê de ética da UFERSA: n° 23091.004271/2014e71; SISBIO: n° 72170/1). De cada indivíduo, quatro fragmentos de tecido (1x1x1 mm) foram utilizados como controles frescos, enquanto 48 fragmentos foram cultivados por dois sistemas durante 28 dias a 34 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ em ar. No sistema organotípico (ORG), os fragmentos de tecido foram cultivados na superfície plana de gel de agarose 0,75% (p/v) previamente submerso no meio de cultura (2 fragmentos de tecido por gel). No sistema tridimensional (3D), dois fragmentos foram inseridos em um gel de agarose 0,30% (p/v), e este foi sobreposto a uma outra placa de gel de agarose 0,75% (p/v) previamente submersa no meio de cultura. Em ambos os sistemas, utilizou-se como meio base, o meio essencial mínimo modificado por Dubelco, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25 mM HEPES, 2 µL/mL insulina–transferrina–selênio, 1% solução de aminoácidos não essenciais, 1% solução de vitamina, 0,2% albumina sérica bovina, 1% de solução de antibiótico-antimicótico, 10 ng/mL LH/FSH, 20 ng/mL fator de crescimento epidérmico de camundongo (mEGF), e 10 ng/mL fator neurotrófico derivado da Glia (GDNF). Foram testados meios acrescidos ou não de FGF (10 ng/mL), totalizando quatro tratamentos, com troca do meio realizada a cada 72 horas. Os fragmentos em cultivo foram avaliados a cada 14 dias sob microscopia de fluorescência quanto à viabilidade, utilizando-se as sondas iodeto de propídio e Hoechst 33342, e quanto à apoptose utilizando as sondas laranja de acridina e brometo de etídeo. Na histologia, foram avaliados critérios de vacuolização das células tubulares, perda de células tubulares, ruptura da membrana basal, separação da membrana basal e estrutura tubular de acordo com pontuações (3 – adequado; 2 – regular; 1 – ruim). Os dados foram expressos como média ± erro padrão e analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey para viabilidade e apoptose, e pelo teste Kruskal-Wallis para parâmetros morfológicos (P<0,05). Após 14 dias de CIV, todos os tratamentos resultaram em redução da viabilidade, quando comparada com o controle não cultivado (85,0±3,0%), porém não diferiram entre si. Após 28 dias, foi verificada viabilidade celular semelhante (~45%) para todos os tratamentos (P>0,05). Em relação a apoptose, não foi observada diferença até os 28 dias de cultivo (>0,05). Quanto à morfologia tecidual, aos 14 dias de CIV, o tratamento ORG adicionado de FGF proporcionou a conservação similar ao controle não cultivado para os critérios de vacuolização das células tubulares (2,35 ± 0,06 não-cultivado vs 2,23 ± 0,05 CIV), ruptura da membrana basal (2,69 ± 0,05 vs 2,48 ± 0,05), separação da membrana basal (2,72 ± 0,05 vs 2,71 ± 0,05). Aos 28 dias, houve redução significativa para todos os parâmetros (P<0,05). No entanto o sistema organotípico adicionado de FGF permaneceu com os maiores escores para todos os critérios morfológicos (P < 0,05). Esses resultados preliminares sugerem que o sistema organotípico adicionado de FGF parece ser o mais adequado para o CIV por longo prazo do tecido testicular de catetos pré-púberes, especialmente por proporcionar a manutenção da morfologia dos túbulos seminíferos.

Palavras-chave: Germoplasma, Vida Selvagem, Biobanco, Tayassuídeo

Apoio financeiro: FAPERN e CNPq

Use of FGF in organotypic and three-dimensional systems for the *in vitro* cultivation of testicular fragments from pre-pubertal collared peccary – preliminary results

Andreia Maria da Silva¹, Ana Glória Pereira¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Nayra Rachel Nascimento Luz¹, Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Alexsandra Fernandes Pereira², Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation, Federal University of Semi-arid Region - UFERSA, Mossoró, RN, Brasil

²Laboratory of Animal Biotechnology, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil
 e-mail: alexrs@ufersa.edu.br

Since populations of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) have been threatened by human devastation in the Caatinga and Atlantic Forest biomes, studies aimed at conserving their germplasm are essential to protect the species from extinction. In this sense, the *in vitro* culture of testicular fragments is an essential biotechnology for the production of gametes from gonadal tissues stored in germplasm banks, especially from pre-pubertal individuals. The objective of the study was to evaluate different *in vitro* culture systems (IVC) and the influence of fibroblast growth factor (FGF) during long-term culture of testicular tissues from pre-pubertal peccary. To this end, testicles from two pre-pubertal individuals were collected at the Wild Animal Multiplication Center/UFERSA (Approval by the UFERSA ethics committee: n° 23091.004271/2014e71; SISBIO: n° 72170/1). From each individual, four tissue fragments (1x1x1 mm) were used as fresh controls, while 48 fragments were cultured by two systems for 28 days at 34 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. In the organotypic system (ORG), tissue fragments were cultured on the flat surface of a 0.75% (w/v) agarose gel previously submerged in the culture medium (2 tissue fragments per gel). In the three-dimensional (3D) system, two fragments were inserted into a 0.30% (w/v) agarose gel, and this was superimposed on another plate of 0.75% (w/v) agarose gel previously submerged in the culture medium. In both systems, the minimum essential medium modified by Dubelco was used as base medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 25 mM HEPES, 2 µL/mL insulin–transferrin–selenium, 1% non-essential amino acid solution, 1% vitamin solution, 0.2% bovine serum albumin, 1% antibiotic-antimycotic solution, 10 ng/mL LH/FSH, 20 ng/mL mouse epidermal growth factor (mEGF), and 10 ng/mL Glial-derived neurotrophic factor (GDNF). Media with or without FGF (10 ng/mL) were tested, totaling four treatments, with media exchange performed every 72 hours. The fragments in culture were evaluated every 14 days under fluorescence microscopy for viability, using the propidium iodide and Hoechst 33342 probes, and for apoptosis using the acridine orange and ethidium bromide probes. In histology, criteria of vacuolation of tubular cells, loss of tubular cells, rupture of the basement membrane, separation of the basement membrane and tubular structure were evaluated according to scores (3 – adequate; 2 – fair; 1 – poor). Data were expressed as mean ± standard error and analyzed by ANOVA followed by the Tukey test for viability and apoptosis, and the Kruskal-Wallis test for morphological parameters (P<0.05). After 14 days of IVC, all treatments resulted in a reduction in viability when compared to the uncultured control (85.0±3.0%), but did not differ from each other. After 28 days, similar cell viability (~45%) was observed for all treatments (P>0.05). Regarding apoptosis, no difference was observed until 28 days of culture (>0.05). Regarding tissue morphology, at 14 days of CIV, the ORG treatment added with FGF provided conservation similar to the non-cultured control for the vacuolation criteria of tubular cells (2.35 ± 0.06 non-cultured vs 2.23 ± 0.05 GIC), basement membrane rupture (2.69 ± 0.05 vs 2.48 ± 0.05), basement membrane separation (2.72 ± 0.05 vs 2.71 ± 0.05). At 28 days, there was a significant reduction for all parameters (P<0.05). However, the organotypic system added with FGF remained with the highest scores for all morphological criteria (P < 0.05). These preliminary results suggest that the organotypic system added with FGF appears to be the most suitable for long-term GIC of testicular tissue from pre-pubertal peccary, especially as it provides maintenance of the morphology of the seminiferous tubules.

Keyword: Germplasm, Wildlife, Biobank, Tayassuid

Financial support: FAPERN and CNPq

Estudo comparativo da morfometria e morfologia espermática entre canídeos selvagens (*Cerdocyon thous*, Linnaeus 1766) e domésticos (*Canis lupus familiaris*)

Teresinha Inês de Assumpção¹, Gabrielle Ferreira Berquó²

¹Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, ²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil
*e-mail: teassumpcao@ufu.br

Os canídeos selvagens são mamíferos com grande diversidade, sendo que o principal obstáculo para o sucesso de sua reprodução são os conhecimentos ainda limitados sobre o comportamento e a fisiologia das espécies como o cachorro-do-mato. Já os canídeos domésticos possuem uma grande distribuição natural entre os mamíferos terrestres e apresenta uma grande variabilidade genética. O objetivo desta pesquisa foi realizar um estudo comparativo da morfometria e morfologia espermática normal e suas anormalidades entre os dois canídeos, o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*). Foram utilizadas amostras de sêmen coletadas anteriormente em outras pesquisas e que se encontravam no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG/Brasil. Foram 10 amostras de cão selvagem e 35 amostras de cão doméstico, coletados respectivamente por eletroejaculação sob anestesia química e por estimulação manual. Foram analisadas as dimensões do espermatozoide por fotomicrografias avaliadas no *software* “open source” Image J, para obter informações relativas a dimensões de comprimento total, de cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozoides. A morfologia espermática foi avaliada pelo método de preparação em câmara úmida sob microscopia óptica de contraste de fase e por esfregaços do sêmen corados pelo Vermelho Congo. Os dados foram apresentados de forma descritiva em média e desvio padrão e a comparação entre as células das duas espécies pelo teste t de Student. As dimensões espermáticas foram semelhantes entre o cachorro-do-mato e do cão doméstico, sendo o comprimento total de 62,22 μm e 55,98 μm , sendo o comprimento da cabeça 4,70 \pm 0,34 μm e 5,82 \pm 0,19 μm , largura da cabeça 3,36 \pm 0,45 μm e 3,72 \pm 0,18 μm , comprimento da peça intermediária 10,14 \pm 1,02 μm e 10,15 \pm 0,29 μm e comprimento da cauda 47,38 \pm 4,52 μm e 40,01 \pm 1,12 μm , respectivamente. A característica morfológica dos espermatozoides das duas espécies também foi semelhante, porém foi observado uma elevada quantidade de anormalidades espermáticas nos cachorro-do-mato em comparação com o cão doméstico, sendo 53,2% e 35,5%, respectivamente. As anormalidades mais observadas no cachorro-do-mato foram cauda fortemente dobrada ou enrolada (16,0 \pm 6,65 %), gota citoplasmática proximal (11,0 \pm 5,35%), contorno anormal (8,0 \pm 3,84 %) e no cão doméstico cauda fortemente dobrada ou enrolada (11,4 \pm 0,92 %), cauda dobrada (7,7 \pm 0,16 %), cabeça isolada normal (6,3 \pm 0,15 %), respectivamente. Os resultados desse estudo podem complementar o conhecimento sobre avaliação andrológica de canídeos selvagens e domésticos, podendo contribuir na reprodução assistida destas espécies.

Palavras-chave: Reprodução, canídeos, espermatozoides, morfologia.

Comparative study of sperm morphometry and morphology between wild canids (*Cerdocyon thous*, Linnaeus 1766) and domestic canids (*Canis lupus familiaris*)

Teresinha Inês de Assumpção^{1*}, Gabrielle Ferreira Berquó²

¹Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, ²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil
*e-mail: teassumpcao@ufu.br

Wild canids are mammals with great diversity, and the main obstacle to the success of their reproduction is the still limited knowledge about the behavior and physiology of species such as the crab-eating fox. Domestic canids, on the other hand, have a wide natural distribution among terrestrial mammals and exhibit a high genetic variability. The objective of this research was to carry out a comparative study of normal sperm morphometry and morphology and its abnormalities between the two canids, the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and the domestic dog (*Canis lupus familiaris*). Semen samples collected previously in other research and stored in the Animal Reproduction Laboratory of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia/MG/Brasil were used. There were 10 samples from wild dogs and 35 samples from domestic dogs, collected respectively by electroejaculation under chemical anesthesia and by manual stimulation. The sperm dimensions were analyzed through photomicrographs evaluated using the open-source software "Image J" to obtain information regarding the total length, head, midpiece, and tail dimensions of the sperm. Sperm morphology was assessed using the wet-mount preparation method under phase-contrast optical microscopy and semen smears stained with Congo Red. The data were presented descriptively in terms of mean and standard deviation, and the comparison between the cells of the two species was made using the Student's test. Sperm dimensions were similar between the crab-eating fox and the domestic dog, with total lengths of 62.22 μm and 55.98 μm , respectively, being the head length 4.70 \pm 0.34 μm and 5.82 \pm 0.19 μm , head width 3.36 \pm 0.45 μm and 3.72 \pm 0.18 μm , intermediate piece length 10, 14 \pm 1.02 μm and 10.15 \pm 0.29 μm and tail length 47.38 \pm 4.52 μm and 40.01 \pm 1.12 μm , respectively. The morphological characteristic of sperm of both species was also similar, although a high quantity of sperm abnormalities was observed in the crab-eating fox compared to the domestic dog, with rates of 53.2% and 35.5%, respectively. The most common sperm abnormalities observed in crab-eating fox were strongly folded and curled tail (16.0 \pm 6.65 %), proximal cytoplasmic droplet (11.0 \pm 5.35%), abnormal contour (8.0 \pm 3.84 %) and the domestic dog were strongly folded and curled tail (11.4 \pm 0.92 %), bent tail (7.7 \pm 0.16 %), free normal heads (6.3 \pm 0.15 %), respectively. The results of this study can contribute to enhancing our understanding of the andrological evaluation of wild and domestic canids, potentially aiding in assisted reproduction efforts for these species.

Key-words: Reproduction, canids, sperm, morphology.

Integridade funcional da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de rato-do-nariz-vermelho (*Wiedomys pyrrhorhinus*) em diferentes soluções hiposmóticas e correlações com outros parâmetros funcionais– resultados preliminares

Yuri Gonçalves Matos¹, Ana Glória Pereira¹, Romário Parente dos Santos¹, Alexandre Rodrigues Silva^{1*}.

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Mossoró, RN, Brasil
*E-mail: alexrs@ufersa.edu.br

Em consequência da degradação acelerada pelas ações antrópicas ecologicamente insustentáveis, a mastofauna da Caatinga sofre constantes ameaças. Somado a isso, a região é notadamente negligenciada cientificamente, resultando em lacunas no conhecimento sobre sua biodiversidade. Entre os pequenos roedores da Caatinga, o rato-do-nariz-vermelho (*Wiedomys pyrrhorhinus*) se encaixa nesse contexto pela escassez de informações consistentes sobre a sua fisiologia, que seria fundamental para o estabelecimento de políticas conservacionistas. O objetivo deste estudo foi avaliar a integridade funcional da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de *W. pyrrhorhinus* em diferentes soluções hiposmóticas, e suas correlações com outros parâmetros funcionais. Para tanto, cinco animais maduros, de $6,2 \pm 0,8$ meses de idade, pesando $37,30 \pm 4,13$ g, foram eutanasiados pela técnica de deslocamento cervical para exposição e retirada dos complexos testículo-epidídimo. Os espermatozoides da cauda dos epidídimos foram recuperados pela técnica de flutuação, e os padrões cinéticos foram avaliados utilizando sistema de análise de espermatozoides auxiliado por computador (CASA). A viabilidade espermática foi avaliada pela integridade estrutural da membrana plasmática utilizando a associação de sondas fluorescentes Hoechst33342 e Iodeto de Propídio. A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo teste de resistência em meio hiposmótico, onde as amostras (10 μ L) foram incubadas em diferentes soluções hiposmóticas de água destilada (0 mOsm/L) e duas soluções a base de frutose (50mOsm/L e 100 mOsm/L) (90 μ L) por 40 minutos a 37°C. Após a incubação, foram preparadas lâminas para avaliação em microscopia de contraste de fase sob aumento de 1000 \times . Foram contabilizados 200 espermatozoides para estimar a porcentagem de células com membrana plasmática funcional, ou seja, reativas ao teste hiposmótico que apresentaram caudas enroladas; e afuncionais, que não reagiram ao meio hiposmótico e mantiveram a cauda reta. A porcentagem de espermatozoides com defeito morfológico de cauda enrolada, avaliada sob coloração em rosa bengala, foi subtraída do resultado obtido no teste hiposmótico. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn para comparar as médias entre as diferentes soluções hiposmóticas de 0, 50 e 100 mOsm/L ($P < 0,05$). A correlação entre as diferentes osmolaridades e os parâmetros de motilidade e viabilidade espermática foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. As amostras submetidas a incubação em solução de água destilada (0 mOsm/L) apresentaram $38 \pm 6,6\%$ de espermatozoides funcionais, enquanto os grupos incubados em solução de frutose a 50 mOsm/L apresentaram $49 \pm 9,8\%$, e aquelas amostras incubadas a 100 mOsm/L, $57 \pm 2,5\%$ de funcionalidade. No entanto, nenhuma diferença estatística entre os grupos foi apontada. Além disso, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi evidenciada entre os grupos incubados em diferentes soluções hiposmóticas e os parâmetros de motilidade ($57 \pm 2,5\%$) e viabilidade espermáticas ($60 \pm 14,6\%$). A partir destes resultados preliminares, infere-se que os espermatozoides epididimários de *W. pyrrhorhinus* podem ser submetidos a ampla faixa de osmolaridade no teste hiposmótico. Assim, a água destilada pode ser utilizada como uma solução hiposmótica eficiente, de baixo custo e fácil aplicabilidade, que não afeta a confiabilidade da avaliação. No entanto, sugerimos o desenvolvimento do estudo com maior número amostral, para resultados ainda mais fidedignos.

Palavras-chave: Cricetideo, rato-de-fava, HOST, epidídimo.

Apoio financeiro: CAPES

Functional integrity of the plasma membrane of epididymal spermatozoa of red-nosed mouse (*Wiedomys pyrrhorhinus*) in different hypoosmotic solutions and correlations with other functional parameters – preliminary results

Yuri Gonçalves Matos¹, Ana Glória Pereira¹, Romário Parente dos Santos¹, Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Animal Germplasm Conservation Laboratory, Federal Rural University of the Semi-Arid - Ufersa,
Mossoró, RN, Brazil

*Email: alexrs@ufersa.edu.br

As a consequence of degradation accelerated due to ecologically unsustainable anthropogenic actions, the mammals of the Caatinga undergoes constant threats. Additionally, the region is notoriously scientifically neglected, resulting in gaps in knowledge about its biodiversity. Among the small rodents of the Caatinga, the red-nosed mouse (*Wiedomys pyrrhorhinus*) fits into this context due to the scarcity of consistent information about its physiology, which would be fundamental for the establishment of conservation policies. The aim of this study was to evaluate the functional integrity of the plasma membrane of epididymal spermatozoa of *W. pyrrhorhinus* in different hypoosmotic solutions and their correlations with other functional parameters. For this purpose, five mature animals, aged 6.2 ± 0.8 months, weighing 37.30 ± 4.13 g, were euthanized by the cervical dislocation technique to expose and remove the testicle-epididymis complexes. Spermatozoa from the epididymal tail were recovered by the flotation technique, and kinetic patterns were evaluated using a computer-assisted sperm analysis system (CASA). Sperm viability was assessed by the structural integrity of the plasma membrane using the association of fluorescent probes Hoechst33342 and propidium iodide. Functional integrity of the plasma membrane was evaluated by the hypoosmotic swelling test, where samples (10 μ L) were incubated in different hypoosmotic solutions of distilled water (0 mOsm/L) and two fructose-based solutions (50mOsm/L and 100 mOsm/L) (90 μ L) for 40 minutes at 37°C. After incubation, slides were prepared for evaluation under phase-contrast microscopy at 1000 \times magnification. A total of 200 spermatozoa were counted to estimate the percentage of cells with functional plasma membranes, i.e., reactive to the hypoosmotic test showing coiled tails; and non-functional, which did not react to the hypoosmotic medium and maintained straight tails. The percentage of spermatozoa with morphological defect of coiled tail, assessed under Rose Bengal staining, was subtracted from the result obtained in the hypoosmotic test. Data were expressed as mean \pm standard error and analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test to compare means among different hypoosmotic solutions of 0, 50 and 100 mOsm/L ($P < 0.05$). The correlation between each osmolarities and the parameters of sperm motility and viability were evaluated by Spearman's correlation test. Samples incubated in distilled water solution (0 mOsm/L) showed $38 \pm 6.57\%$ functional spermatozoa, while groups incubated in 50 mOsm/L fructose solution showed $49 \pm 9.85\%$, and those samples incubated in 100 mOsm/L, $57 \pm 2.51\%$ functionality. However, no statistical difference between groups was noted. Additionally, no statistically significant correlation was evidenced between the groups incubated in different hypoosmotic solutions and the parameters of sperm motility ($57 \pm 2,5\%$) and viability ($60 \pm 14,6\%$). From these preliminary results, it is inferred that the epididymal spermatozoa of *W. pyrrhorhinus* can be subjected to a wide range of osmolarity in hypoosmotic test. Thus, distilled water can be used as an efficient, low-cost and easy applicability hypoosmotic solution that does not affect the reliability of the evaluation. However, we suggest the development of the study with a larger sample size, for even more reliable results.

Keywords: Cricetid, rato-de-fava, HOST, epididymis.

Financial support: CAPES

Descrição morfológica de espermatozoides recuperados do epidídimo de Preguiça de Garganta Marrom (*Bradypus variegatus* Schinz, 1825)

Gustavo de Oliveira Alves Pinto¹; José Henrique Alves Nascimento e Silva¹; Giovanna Isabella de Souza Couto³; Lucas Facundo Moura Tobal¹; Fabricio Bezerra de Sá²; Maria Madalena Pessoa Guerra¹; Gilcifran Prestes de Andrade²; Gustavo Ferrer Carneiro^{1*}

¹Laboratório de Andrologia Animal – Androlab, UFRPE, Recife – Brasil;

²Departamento de Morfologia e Anatomia Animal - DMFA, UFRPE, Recife – Brasil

³Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, Recife - Brasil

*E-mail: gustavo.ferrer@ufrpe.br

A preguiça de garganta marrom (*Bradypus variegatus* Schinz, 1825) é um mamífero placentário pertencente à superordem Xenarthra e à ordem Pilosa, estando distribuída em florestas neotropicais, incluindo alguns países da América Central e do Sul, contemplando o Brasil, na Mata Atlântica. Os machos possuem testículos pequenos e arredondados com localização intracavitária, entre o reto e a bexiga. Essa característica está relacionada diretamente com possíveis diferenciações da espermatogênese, ocorrendo na mesma temperatura corporal, que, por sua vez, é mais baixa comparado aos outros animais, por volta dos 30 °C. O sucesso reprodutivo na maioria das espécies é dependente da temperatura devido a sensibilidade das células da linhagem germinativa à ação do calor. Os danos ocasionados pela elevação da temperatura testicular são severos e de recuperação lenta, cujo principal indutor é o estresse oxidativo, já que altas temperaturas podem gerar produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A necessidade de conhecermos as características dos gametas desses animais está intimamente relacionada a formas de preservação e conservação. As patologias espermáticas estão intimamente associadas a questões que afetam o sistema reprodutor masculino. Sendo assim, altos índices patológicos estão relacionados com baixa taxa de concepção, visto que, dependendo da patologia, maiores ou menores, esses gametas não são aptos à fecundação. Portanto, considerando a escassez de informações sobre os gametas masculinos de *B. variegatus*, objetivou-se com esse estudo, observar características de morfologia espermática de espermatozoides de bichos preguiça de garganta marrom, assim como classificar as patologias observadas nos gametas recuperados. A pesquisa foi realizada no Setor de Anatomia Animal do Departamento de Morfologia e Anatomia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Andrologia Animal (Androlab) no Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. Um animal, com características de macho adulto, foi doado como objeto de pesquisa pelo Centro de Triagem e Reabilitação Animal do Estado de Pernambuco (CETRAS – PE), sob registros Sisbio - 83751-1 e Sisgen - AED216F, após eutanásia. As coletas dos materiais biológicos foram realizadas não perfazendo 2 horas post-mortem. Os gametas foram recuperados do epidídimo pelo método de fatiamento, utilizando Tris gema de ovo a 30°C. Para análise das patologias espermáticas, foi utilizado eosina negrosina (Botuvital®, São Paulo, Brasil). Foram aliqüotados 10 µL da amostra e 15 µL do corante, homogeneizados, depositado na lâmina e, posteriormente realizado o estiraço. A avaliação foi realizada em microscópio de contraste de fase (OLYMPUS BX41), na objetiva de 100x, onde foram avaliadas um total de 100 gametas. Os gametas apresentaram características semelhantes as espécies domésticas, apesar de leve estreitamento da porção intermediária que antecede a cauda, semelhante ao que foi observado em *Bradypus torquatus*. Quanto a avaliação da patologia espermática, a amostra apresentou 81% de células normais e 19% de células com alguma alteração patológica, sendo estas cabeça isolada (6%), cauda fortemente enrolada (5%), cabeça achatada (1%), gota protoplasmática distal (2%), cabeça subdesenvolvida (1%), cabeça lanciforme (1%), edema de peça intermediária (1%), inserção retroaxial (1%) e paraxial (1%). Embora os resultados aqui demonstrados tenham indicado uma certa eficiência da metodologia empregada, futuros estudos devem ser realizados, com um maior número de indivíduos, com o intuito de comprovar esses resultados promissores. Sendo assim, essa técnica de recuperação de espermatozoides pode possivelmente ser replicada no futuro para a criopreservação de sêmen de animais do gênero *Bradypus*, contribuindo assim para a conservação das espécies.

Palavras-chave: Conservação, Morfologia espermática, Bicho Preguiça

Morphological description of spermatozoa recovered from the epididymis of Brown-throated Sloths (*Bradypus variegatus*, Schinz 1825)

Gustavo de Oliveira Alves Pinto¹; José Henrique Alves Nascimento e Silva¹; Giovanna Isabella de Souza Couto³; Lucas Facundo Moura Tobal¹; Fabricio Bezerra de Sá²; Maria Madalena Pessoa Guerra¹; Gilcifran Prestes de Andrade²; Gustavo Ferrer Carneiro^{1*}

¹Laboratório de Andrologia Animal – Androlab, UFRPE, Recife – Brasil;

²Departamento de Morfologia e Anatomia Animal - DMFA, UFRPE, Recife – Brasil

³Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, Recife - Brasil

*E-mail: gustavo.ferrer@ufrpe.br

The brown-throated sloth (*Bradypus variegatus* Schinz, 1825) is a placental mammal belonging to the superorder Xenarthra and the order Pilosa, distributed in neotropical forests in some countries in Central and South America, including Brazil, in the Atlantic rain forest. Males have small, rounded testicles located intracavitary, between the rectum and the bladder. This characteristic is directly related to possible differentiations in spermatogenesis, occurring at the same body temperature, which, in turn, is lower compared to other animals, around 30 °C. Reproductive success in most species is temperature dependent, due to the sensitivity of germline cells to the action of heat stress. The damage caused by elevated testicular temperature is severe and slow to recover, the main inducer of which is oxidative stress, as high temperatures can generate the production of reactive oxygen species (ROS). The need to know the characteristics of the gametes of these animals is closely related to forms of preservation and conservation. Sperm pathologies are closely associated with issues that affect the male reproductive system. High pathological rates are related to a low conception rate, since, depending on the pathology, whether larger or smaller, these gametes are not suitable for fertilization. Therefore, considering the ecological problems, the difficulty of ex situ reproduction and the low genetic diversity among populations of *B. variegatus*, the aim of this study was to observe sperm morphology characteristics of sperm from sloths that died, such as future conservation strategy. The research was carried out in the Animal Anatomy Sector of the Department of Morphology and Animal Anatomy (DMFA) at the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) and in the Animal Andrology Laboratory (Androlab) in the Department of Veterinary Medicine at UFRPE. An animal, with characteristics of an adult male, was donated as a research object by the Animal Screening and Rehabilitation Center of the State of Pernambuco (CETRAS – PE), under registrations Sisbio - 83751-1 and Sisgen - AED216F, after euthanasia. The collection of biological materials was carried out within 2 hours post-mortem. Gametes were recovered from the epididymis by the slicing method, using TRIS egg yolk at 30°C. To analyze sperm pathologies, Eosin Negrosin (Botuvital®, São Paulo, Brazil) was used. Ten µL of the sample and 15 µL of the dye were aliquoted, homogenized, deposited on the slide and subsequently drawn. The evaluation was carried out using a phase contrast microscope (OLYMPUS BX41), using a 100x objective, where a total of 100 gametes were evaluated. The gametes presented characteristics similar to domestic species, despite a slight narrowing of the intermediate portion preceding the tail, similar to what was observed in *Bradypus torquatus*. Regarding the evaluation of sperm pathology, the sample presented 81% of normal cells and 19% of cells with some pathological alteration, these being isolated head (6%), strongly curled tail (5%), flat head (1%), distal protoplasmic droplet (2%), underdeveloped head (1%), lance-shaped head (1%), midpiece edema (1%), retroaxial (1%) and paraxial insertion (1%). Although the results demonstrated here indicated a certain efficiency of the methodology used, future studies should be carried out, with a greater number of individuals, in order to prove these promising results. Therefore, this sperm recovery technique can possibly be replicated in the future for the cryopreservation of semen from animals of the genus *Bradypus*, thus contributing to the conservation of the species.

Keywords: Conservation, Sperm morphology, sloth

Cinética computadorizada de espermatozoides de Gato Maracajá e Gato- Mourisco criopreservados em diferentes diluidores

Isabella de Matos Brandão Carneiro^{2*}, Mônica Madrugal-Valverde⁶, Eduardo de Oliveira Costa², Miguel Ferreira Bomfim Baptista², Luiza Figueiredo Barbosa¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves³, Marcus Vinicius Galvão Loiola⁴, Carmo Emanuel Almeida Biscarde⁷, Gleice Mendes Xavier⁸, Mateus Martins Rodrigues dos Santos⁵; Rodrigo Freitas Bittencout⁴

¹Graduando do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; ²Pós-Graduando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; ³Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; ⁴Professores do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; ⁵Programa de residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; ⁶Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica; ⁷IFBaiano, Senhor do Bonfim, BA; ⁸Postgraduate in Veterinary Medicine, UNESP, Botucatu, SP
*e-mail: isabella.brandao.c@hotmail.com

As espécies de felídeos com incidência no Brasil, encontram-se em perigo de extinção ou potencialmente em perigo e as biotecnologias reprodutivas, em especial a criopreservação seminal, surgem como ferramentas que auxiliam na preservação destas espécies. No entanto, para garantir a viabilidade das células preservadas frente ao processo de criopreservação, é necessário analisar e padronizar as características espermáticas espécie-específicas. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar amostras de sêmen de felídeos silvestres pós-descongelamento por meio da microscopia automatizada. Foram utilizados dois machos adultos das seguintes espécies: um gato maracajá (*Leopardus wiedii*, Schinz, 1821) e um gato- mourisco (*Puma yagouaroundi*- Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) criados em recintos para conservação *ex situ*, dos quais foram colhidas amostras seminais através da cateterização uretral após aplicação de agonista alfa-2 adrenérgico (cloridrato de medetomidina (0,1 mg/kg) associada a cetamina (5 mg/kg). Imediatamente após a colheita, o sêmen foi avaliado para posterior diluição em diferentes crioprotetores experimentais contendo o Tris-gema de ovo como meio base para a congelamento das amostras: G1 (GLI -controle) contendo 6% de glicerol (Cromaline química fina, São Paulo, Brasil); G2 (DMF) com 3% de Dimetilformamida (Cromaline química fina, São Paulo, Brasil) e G3 (DMA) com 3% de N-N. Dimetilacetamida (DMA) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A descongelamento do sêmen ocorreu a 37°C, por 30 segundos. Os parâmetros espermáticos pós descongelamento foram avaliados por meio da análise computadorizada (CASA), sistema SCA[®] (Microoptics, Barcelona, ESP), levando em consideração os seguintes dados: velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade de trajeto (VAP), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), linearidade (LIN, %) e retilinearidade (STR, %) e WOB:VAP/VCL. Foi utilizado o programa estatístico (SPSS), versão 21.0 para Windows e através do teste não paramétrico Kruskal Wallis foi possível comparar os grupos de diferentes crioprotetores. Os valores das medianas dos parâmetros seminais obtidos pelo SCA[®] para *Leopardus wiedii* / *Puma yagouaroundi* foram: VCL (µm/s) 38,57 29,99; VSL (µm/s) 16,72 10,05; VAP(µm/s) 23,46 14,48; ALH (µm) 1,94 1,91; BCF (Hz) 4,30 1,80; LIN (%) 36,36 34,67; STR (%) 59,44 58,28; WOB 55,98 54,14. Tais achados indicaram que a comparação dos parâmetros seminais por grupos de crioprotetores não apresentaram diferenças estatística (P>0,05), demonstrando que tanto o glicerol como os crioprotetores penetrantes com base em amidas, preservam de igual maneira os espermatozoides de felinos silvestres. Na literatura consultada não existem dados quanto a avaliação de parâmetros seminais desses felídeos silvestres em sistema de análise computadorizado (CASA), demonstrando a necessidade de avançar em pesquisas similares.

Palavras-chave: CASA, criopreservação, *Leopardus wiedii*, *Puma yagouaroundi*.

Computerized kinetics of sperm of Gato Maracajá and Gato-Morisco cryopreserved in different extenders

Isabella de Matos Brandão Carneiro^{2*}, Mónica Madrigal-Valverde⁶, Eduardo de Oliveira Costa², Miguel Ferreira Bomfim Baptista², Luiza Figueiredo Barbosa¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves³, Marcus Vinicius Galvão Loiola⁴, Carmo Emanuel Almeida Biscarde⁷, Gleice Mendes Xavier⁸, Mateus Martins Rodrigues dos Santos⁵; Rodrigo Freitas Bittencout⁴

¹Graduating from the Veterinary Medicine course of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; ²Postgraduate of the Postgraduate Program in Animal Science in the Tropics of EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; ³Veterinary Doctor of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; ⁴Teachers of the course of Veterinary Medicine of EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; ⁵Residency Program in Reproduction and Veterinary Obstetrics of EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; ⁶Technological Institute of Costa Rica, San Carlos, Costa Rica; ⁷IFBaiano, Senhor do Bomfim, BA; ⁸Postgraduate in Veterinary Medicine, UNESP, Botucatu, SP
*E-mail: isabella.brandao.c@hotmail.com

Felid species with incidence in Brazil are in danger of extinction or potentially in danger. Reproductive biotechnologies, especially seminal cryopreservation, emerge as tools that help preserve these species. However, to ensure the viability of preserved cells in the face of the cryopreservation process, it is necessary to analyze and standardize the species-specific sperm characteristics. Thus, the present study aimed to evaluate semen samples from wild felids after thawing using automated microscopy. Two adult males of the following species were used: a maracajá cat (*Leopardus wiedii*, Schinz, 1821) and a Moorish cat (*Puma yagouaroundi*- Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) bred in enclosures for ex-situ conservation, from which seminal samples were collected through urethral catheterization after application of alpha-2 adrenergic agonist (medetomidine hydrochloride (0.1 mg/kg) associated with ketamine (5 mg/kg). Immediately after collection, semen was evaluated for further dilution in different experimental extenders containing the egg tris-gem as a base medium for the freezing of the samples: G1 (GLI -control) containing 6% glycerol (Fine Chemical Cromaline, São Paulo, Brazil); G2 (DMF) with 3% Dimethylformamide (Fine Chemical Cromaline, São Paulo, Brazil) and G3 (DMA) with 3% N-N-Dimethylacetamide (DMA) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil). The defrosting of the semen occurred at 37°C for 30 seconds. The post-thawing sperm parameters were evaluated using computerized analysis, SCA[®] system (Microoptics, Barcelona, ESP), taking into account the following data: progressive velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), path velocity (VAP), lateral head displacement (ALH), flagellar beat frequency (BCF, Hz), linearity (LIN, %) and rectilinearity (STR, %) and WOB:VAP/VCL. The statistical program (SPSS), version 21.0 for Windows was used and through the non-parametric Kruskal Wallis test it was possible to compare the groups of different cryoprotectors. The values of the medians of the seminal parameters obtained by SCA[®] for *Leopardus wiedii* / *Puma yagouaroundi* were: VCL (µm/s) 38.57 29.99; VSL (µm/s) 16.72 10.05; VAP(µm/s) 23.46 14.48; ALH (µm) 1.94 1.91; BCF (Hz) 4.30 1.80; LIN (%) 36.36 34.67; STR (%) 59.44 58.28; WOB 55.98 54.14. These findings indicated that comparing seminal parameters by groups of cryoprotectors showed no statistical differences (P>0.05), demonstrating that both glycerol and penetrating cryoprotectors based on amides, also preserve the sperm of wild cats. In the literature there are no data on the evaluation of seminal parameters of these wild felids in a computerized analysis system, demonstrating the need to advance in similar research.

Keywords: CASA, cryopreservation, *Leopardus wiedii*, *Puma yagouaroundi*.

Citometria de fluxo para avaliação da integridade de espermatozoides de felídeos neotropicais criopreservados com uso de diferentes crioprotetores

Luiza Figueiredo Barbosa^{1*}, Isabella de Matos Brandão Carneiro², Mônica Madrigal-Valverde⁵, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Natalia Borges Miranda¹, Mariana Fernandes Souza¹, Gleisiele Batista de Oliveira¹, Satilly de Oliveira Moura Silva¹, Miguel Ferreira Bomfim Baptista², Eduardo de Oliveira Costa², Maria Clara Costa Freire do Nascimento⁴, Esther Kayla dos Santos Matos⁴, Mateus Martins Rodrigues dos Santos⁴, Murilo Falchetti⁴, Rodrigo Freitas Bittencourt³

¹Graduandos do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos – UFBA, Salvador, BA, Brasil

³Professores do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil;

⁴Programa de residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil

⁵Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica

*e-mail: luizafbarbosa.vet@gmail.com

A citometria de fluxo é uma técnica direcionada ao estudo de diversas características celulares através da detecção de substâncias fluorescentes presentes nas células, e tornou-se presente na análise seminal de felídeos silvestres que se encontram em perigo de extinção, ao possibilitar, com alta precisão, o estudo de parâmetros como os níveis de danos na membrana plasmática e membrana acrossomais, sendo uma ferramenta que pode contribuir para a preservação destas espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides através da citometria de fluxo após o processo de congelamento-descongelamento. Foram utilizados dois machos adultos das seguintes espécies: um gato maracajá (*Leopardus wiedii*), um gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) em cativeiro no Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, Salvador, Bahia, Brasil. Foi utilizado como protocolo anestésico a associação de cloridrato de medetomidina (0,1 mg/kg) e cetamina (5 mg/kg). Em cada animal foi coletada uma amostra de sêmen por cateterização uretral que posteriormente foram divididas em três grupos experimentais para criopreservação. Imediatamente após a colheita, o sêmen foi avaliado e a seguir diluído e congelado empregando diferentes diluidores a base de Tris-gema de ovo: G1 (GLI -controle) contendo 6% de glicerol (Cromaline química fina, São Paulo, Brasil); G2 (DMF) com 3% de Dimetilformamida (Cromaline química fina, São Paulo, Brasil) e G3 (DMA) com 3% de N-N-Dimetilacetamida (DMA) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A descongelamento seminal foi realizada a 37°C/30 segundos. A avaliação da integridade de membrana plasmática foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Foram utilizadas duas sondas fluorescentes: o diacetato de carboxifluoresceína (DIC; n. 21879, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) que fluoresce em verde e iodeto de propídeo (IP; n. P4170, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) que fluoresce em vermelho, presentes em uma solução de trabalho (PBS+DIC 20,0µM + IP 15µM) (Harrison & Vickers 1990; Mendoza et al., 2012). Foi adicionado a cada amostra de 20µl de sêmen diluído em 150µl de PBS (Buffer salino fosfato) a uma concentração mínima de 0,25x10⁶ espermatozoides/mL em cada tubo criogênico: 5µL de IP e 5µL de DIC. Os espermatozoides foram classificados como apresentando membrana íntegra (DIC+/IP-) ou lesada (DIC-/IP+). As amostras foram analisadas em Citômetro de Fluxo (BD LDRFortessa, BD Bioscience, EUA), com espectro entre 250-850nm. As imagens foram analisadas com software FlowJo® (FlowJo LLC, EUA). Para estimar o tamanho celular foi utilizada a morfometria espermática para gato doméstico (Gutierrez-Reinoso e García-Herreros, 2016). Os parâmetros de microscopia convencional no pré e pós-congelamento foram comparados às características de integridade de membranas estruturais e funcionais e a porcentagem de anormalidades morfológicas pelo teste de Wilcoxon para diferenças entre pares ordenadas. Não houve efeito de diluidor na integridade de membrana plasmática pós-descongelamento das células espermáticas nas espécies estudadas (P>0,05). As medidas dos parâmetros de integridade de membrana plasmática das células espermáticas felinas, avaliados após a congelamento em meios diluidores (GLI, DMA, DMF) para *Leopardus wiedii*/ *Puma yagouaroundi* foram: DCI+ 91,4 e 91,78; IP+ 61,06 e 88,84; DIC- 8,62 e 8,22; IP- 38,96 e 11,60; membrana íntegra (DIC+IP-) 31,4 e 7,88; membrana lesada (DIC-IP+) 1,06 e 4,15; Esp. Memb. Íntegra 31,4 e 15,18; Esp. Memb. Lesada 8,62 e 8,22. Ao se tratar das análises por meio da citometria de fluxo do sêmen de felídeos silvestres, existe uma carência de literatura publicada, dificultando a discussão de maneira minuciosa, havendo apenas dados relacionados a felinos domésticos, o que torna o presente estudo essencial para dar seguimento ao avanço em pesquisas semelhantes.

Palavras-chaves: Membrana plasmática, membrana acrossomal, *Leopardus wiedii*, *Puma yagouaroundi*, espermas.

Flow cytometry to evaluate the integrity of neotropical felid sperms cryopreserved using different cryoprotectants

Luiza Figueiredo Barbosa^{1*}, Isabella de Matos Brandão Carneiro², Mônica Madrugal-Valverde⁵, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Natalia Borges Miranda¹, Mariana Fernandes Souza¹, Gleisiele Batista de Oliveira¹, Satilly de Oliveira Moura Silva¹, Miguel Ferreira Bomfim Baptista², Eduardo de Oliveira Costa², Maria Clara Costa Freire do Nascimento⁴, Esther Kayla dos Santos Matos⁴, Mateus Martins Rodrigues dos Santos⁴, Murilo Falchetti⁴, Rodrigo Freitas Bittencourt³

¹Undergraduates of the Veterinary Medicine course, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil

²Postgraduate Program in Animal Science in Topics – UFBA, Salvador, BA, Brazil

³Professors of the Veterinary Medicine course at EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil;

⁴Residency program in Reproduction and Veterinary Obstetrics at EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil

⁵ Technological Institute from Costa Rica, San Carlos, Costa Rica

*email: luizafbarbosa.vet@gmail.com

Flow cytometry is a technique to study various cellular characteristics by detecting fluorescent substances in cells. It has become present in the seminal analysis of wild felids that are in danger of extinction by enabling, with high precision, the study of parameters such as levels of damage to the plasma membrane and acrosomal membrane, being a tool that can contribute to the preservation of these species. The objective of this study was to evaluate the integrity of sperm plasma membranes through flow cytometry after the freezing-thawing process. Two adult males of the following species were used: a Margay cat (*Leopardus wiedii*) and a Moorish cat (*Puma yagouaroundi*) in captivity at the Getúlio Vargas Zoobotanical Park, Salvador, Bahia, Brazil. The combination of medetomidine hydrochloride (0.1 mg/kg) and ketamine (5 mg/kg) was used as the anesthetic protocol. A semen sample was collected from each animal by urethral catheterization and divided into three experimental groups for cryopreservation. Immediately after collection, the semen was evaluated and then diluted and frozen using different extenders based on Tris-egg yolk: G1 (GLI - control) containing 6% glycerol (Cromaline fine chemistry, São Paulo, Brazil); G2 (DMF) with 3% Dimethylformamide (Chromaline fine chemistry, São Paulo, Brazil) and G3 (DMA) with 3% N-N-Dimethylacetamide (DMA) (Sigma-Aldrich et al., Brazil). Seminal thawing was performed at 37°C/30 seconds. The assessment of plasma membrane integrity was carried out at the Molecular Biology Laboratory of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz). Two fluorescent probes were used: carboxyfluorescein diacetate (DIC; no. 21879, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, United States) which fluoresces green and propidium iodide (IP; no. P4170, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, United States) that fluoresces red, present in a working solution (PBS+DIC 20.0µM + IP 15µM) (Harrison & Vickers, 1990; Mendoza et al., 2012). 20µl of semen diluted in 150µl of PBS (phosphate buffer saline) was added to each sample at a minimum concentration of 0.25x10⁶ sperm/mL in each cryogenic tube: 5µL of IP and 5µL of DIC. Sperm were classified as having an intact (DIC+/IP-) or damaged (DIC-/IP+) membrane. The samples were analyzed in a Flow Cytometer (BD et al., USA) with a 250-850nm spectrum. The images were analyzed using FlowJo® software (FlowJo LLC, USA). To estimate cell size, sperm morphometry for domestic cats was used (Gutierrez-Reinoso & García-Herreros, 2016). Conventional microscopy parameters at pre- and post-freezing were compared to structural and functional membrane integrity characteristics and the percentage of morphological abnormalities using the Wilcoxon test for differences between ordered pairs. There was no effect of extender on the integrity of the post-thawing plasma membrane of sperm cells in the species studied (P>0.05). Measurements of plasma membrane integrity parameters of feline sperm cells, evaluated after freezing in diluting media (GLI, DMA, DMF) for *Leopardus wiedii*/ *Puma yagouaroundi* were: DCI+ 91.4 and 91.78; IP+ 61.06 and 88.84; DIC- 8.62 and 8.22; IP- 38.96 and 11.60; integral membrane (DIC+IP-) 31.4 and 7.88; damaged membrane (DIC-IP+) 1.06 and 4.15; Esp. Member. Integrates 31.4 and 15.18; Esp. Member. They were injured 8.62 and 8.22. When dealing with analyses using flow cytometry of the semen of wild felids, there is a lack of published literature, making it difficult to discuss in detail, with only data related to domestic felines, which makes the present study essential to continue the advancement in similar research.

Keywords: Plasma membrane, acrosomal membrane, *Leopardus wiedii*, *Puma yagouaroundi*, sperm.