



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

ANA BÁRBARA ROCHA SILVA

Magnetohipertermia mediada por nanopartículas magnéticas como
potencial indutor de infertilidade em gatos machos

Brasília/DF – 2025



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

ANA BÁRBARA ROCHA SILVA

**MAGNETOHIPERTERMIA MEDIADA POR NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS COMO POTENCIAL INDUTOR DE
INFERTILIDADE EM GATOS MACHOS**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Madeira Lucci

Tese apresentada ao curso de doutorado Acadêmico do Programa de Pós- Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia

Brasília/DF – 2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e minha Nossa Senhora por me alimentar de fé e esperança durante toda a minha vida. Quando eu mesma não acreditei em mim, eles me guiaram. Agradeço a minha família por toda ajuda e força sempre. Ao meu marido Fábio que sempre me incentivou em tudo. A minha querida mãe, que me ensinou que o lugar de uma mulher é onde ela quiser. Aos meus filhos amados Isis e Caio. Amo vocês demais!

Agradeço a minha orientadora professora Dra. Carolina Madeira Lucci. Obrigada por ter insistido para que eu fizesse esse Doutorado. Por ter acreditado que eu teria capacidade de “tocar” esse projeto tão bonito e desafiador. Por toda a parceria, broncas e confiança. A nossa parceria não acaba aqui! Obrigada por acreditar em mim.

Agradeço também a toda a equipe envolvida nesse projeto enorme: Primeiramente a Dra. Juliana Brito, sem ela esse projeto não aconteceria. Obrigada Ju, por toda a ajuda em tudo, sempre. Pelas lâminas, ultrassom, MHT, segurar os gatinhos, estatística, pelas risadas e por aguentar minhas reclamações. Tenho muita admiração por você. Obrigada também a Dra. Vanessa Nicolau que colaborou muito nas lâminas e no processamento dos epididímos. Agradeço também as alunas de PIBICs: Letícia, Sara, Rafaela e Julia por toda ajuda no Gatil e com os dados do trabalho. A Médica Veterinária e amiga Fernanda Gontijo por realizar a castração dos gatos. Obrigada Fê, saudades diárias de você trabalhando comigo. Ao Médico Veterinário Wesley de Souza por realizar os ultrassons dos gatos.

Agradeço ao Biotério e ao Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia da Universidade Brasília por abrigar e disponibilizar os espaços e materiais necessários para que a pesquisa fosse realizada. Ao Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária e a professora Giane Regina Paludo pela parceria e exames realizados

As agências de fomento, FAPDF, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório de Medicina Térmica (UFG) do Professor Andris Bakuzis por disponibilizar o fluido magnético e o aparelho de Magnetohipertermia e ao Professor Paulo Souza do Instituto de Física (UnB) pela adaptação do aparelho em seu Laboratório e disponibilidade para que os procedimentos fossem realizados lá.

E por fim, obrigada a todos os gatinhos que ajudaram nesta pesquisa, e que me aproximaram ainda mais deste mundo apaixonante que é o mundo felino: Simba, Kiki,

Watson, Willow, White, Ocean, Led, Arduíno, Carlito, Frajola, Grafite, Klaus, Mingau, Spin, Zoca, Nano, Olaf, Aslan, Sketch, Bowie, Frajola 2 e Dudu.

**"Eu sou grata por todos que duvidaram de mim.
Foi isso que me fez trabalhar ainda mais."**

Michelle Obama

RESUMO

Este estudo tem como objetivo avaliar a magneto-hipertermia (MHT) mediada por nanopartículas magnéticas como possível indutor de infertilidade em gatos. Foram utilizados 20 gatos divididos em duas fases que avaliaram os efeitos a curto prazo – Fase 1 (N= 11) e a longo prazo – Fase 2 (N=9). O tratamento consistiu na injeção intratesticular de 150µL de fluido magnético composto de ferritina de manganês recoberta com citrato combinado com a MHT até os testículos atingirem a temperatura de 45°C e manutenção por 15 minutos. Os animais passaram por orquiectomia em momentos diferentes pós-MHT - Etapa 1: (Grupo D7, N=3; Grupo D24, N=4; Grupo D47, N=4; - Etapa 2: (Grupo D90, N=2), (Grupo D145, N=3) e (Grupo D180, N=4). Foram avaliados parâmetros clínicos, hematológicos e ultrassonográficos em diferentes intervalos pré e pós procedimento para avaliação da saúde e bem-estar dos animais. A MHT foi segura, bem tolerada e não houve aumento significativo da temperatura testicular, sinais clínicos significativos de dor ou comprometimento sistêmico. Notou-se que dos testículos avaliados pós-procedimento, 57,5% se apresentaram mais firmes nas primeiras 24 horas, 65% tiveram aumento da sensibilidade nas primeiras 2 horas e 85% apresentaram eritema da bolsa escrotal nas primeiras 4 horas, e a partir da avaliação de 7 dias, essas alterações não foram mais encontradas. Observou-se diferença estatística no peso absoluto testicular no D180 quando comparado ao grupo controle. O volume testicular teve um aumento significativo no 7º dia devido a inflamação peritesticular com diminuição significativa no 180º dia e observou-se azoospermia em 80% dos animais. Histologicamente foi possível identificar lesões importantes na arquitetura dos túbulos seminíferos e epidídimos dos animais tratados em ambas as fases dependendo do processo inflamatório e da presença, quantidade e proximidade com o material sugestivo de nanopartículas. A presença de nanopartículas foi associada a danos celulares, principalmente nas regiões de maior acúmulo, resultando em necrose difusa dos testículos. Os resultados indicam o potencial promissor do método apresentado como alternativa não cirúrgica na esterilização de gatos machos.

PALAVRAS- CHAVES: Hipertermia mediada por nanopartículas, castração, testículos, túbulos seminíferos, esterilização.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate magnetic hyperthermia (MHT) mediated by magnetic nanoparticles as a potential method to induce infertility in male cats. A total of 20 cats were divided into two experimental phases to assess short-term effects – Phase 1 (N = 11) and long-term effects – Phase 2 (N = 9). The treatment consisted of intratesticular injection of 150 μ L of a magnetic fluid composed of citrate-coated manganese ferrite, followed by MHT until testicular temperature reached 45°C, maintained for 15 minutes. Orchiectomy was performed at different time points post-MHT – Phase 1: (Group D7, N = 3; Group D24, N = 4; Group D47, N = 4) and Phase 2: (Group D90, N = 2; Group D145, N = 3; Group D180, N = 4). Clinical, hematological, and ultrasonographic parameters were evaluated at various pre- and post-treatment intervals to monitor animal health and welfare. MHT was found to be safe and well-tolerated, with no significant increase in testicular temperature, no marked clinical signs of pain, and no systemic compromise. Among the testes evaluated post-treatment, 57.5% were firmer within the first 24 hours, 65% showed increased sensitivity within the first 2 hours, and 85% presented scrotal erythema within the first 4 hours. These alterations were no longer observed from day 7 onward. A statistically significant reduction in absolute testicular weight was observed on day 180 compared to the control group. Testicular volume increased significantly on day 7 due to peritesticular inflammation, followed by a marked decrease on day 180. Azoospermia was observed in 80% of the treated animals. Histological analysis revealed substantial damage to the architecture of seminiferous tubules and epididymides in both phases, depending on the intensity of the inflammatory process and the presence, quantity, and proximity of nanoparticle-like material. The presence of nanoparticles was associated with cellular damage, particularly in areas of higher accumulation, leading to diffuse necrosis of testicular tissue. These findings indicate the potential of the proposed method as a non-surgical alternative for sterilization in male cats.

KEYWORDS: Nanoparticle mediated hyperthermia, neutering, testicles, seminiferous tubules, sterilization.

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1- Animais Errantes.....	9
2.2- Gatos e sua população.....	10
2.3- Controle populacional de animais errantes	11
2.4- Fisiologia da reprodução do gato macho.....	12
2.4.1-Aparelho reprodutor do gato macho.....	12
2.4.2- Espermatogênese.....	15
2.5- Método de Esterilização cirúrgica e Método Captura-Esterilização-Devolução (C.E.D)	16
2.6 - Métodos Alternativos para Castração não-cirúrgica.....	17
2.6.1- Terapias Hormonais.....	17
2.6.2- Agentes quimioesterilizantes.....	18
2.6.3 – Métodos Térmicos.....	20
2.7 – Nanotecnologia.....	21
2.7.1— Nanopartículas Magnéticas (NPMs).....	22
2.7.2 - Nanopartículas de óxido de ferro.....	23
2.7.3 - Magnetohipertemia	24
2.8 – Nanocastração.....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. OBJETIVOS DO EXPERIMENTO.....	28
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1- Animais.....	29
5.2- Nanopartículas Magnéticas.....	29
5.3- Procedimento de MHT testicular.....	30
5.4- Delineamento Experimental e Avaliações.....	31
5.5- Avaliações realizadas	34
5.6. Análise Estatística.....	37
6. RESULTADOS	38
7. DISCUSSÃO.....	55
8. CONCLUSÃO.....	61
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
10.ANEXO 1 (CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA).....	77

1- INTRODUÇÃO

Animais errantes são um problema de saúde pública para grande parte do mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta a existência de mais de 30 milhões de animais abandonados no Brasil, entre cães e gatos.

A facilidade com que gatos urbanos se organizam em colônias favorece o crescimento exponencial das populações e desafia todos os métodos de controle conhecidos. Características reprodutivas específicas incluindo maturidade sexual precoce, poliestria e gestações múltiplas contribuem para a natureza prolífica do *Felis catus*. Os gatos domésticos errantes representam riscos para a saúde humana e animal como um reservatório de patógenos, além de causarem impacto negativo na fauna regional por predação de espécies nativas (PURSWELL & KOLSTER, 2006; LEVY, 2011)

Durante muitos anos o controle populacional de animais errantes era realizado com a captura e eutanásia em massa desses animais. Como essas ações não foram satisfatórias e considerando os aspectos éticos e legais, esta prática vem sendo substituída por outros métodos de controle desta superpopulação. Acredita-se hoje que a ação direta sobre a reprodução com técnicas focadas em esterilização somadas a ações de educação para guarda responsável são a chave para o controle populacional (MENDES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; MOUTINHO *et al.*, 2015).

Apesar da esterilização de ambos os sexos ser o ideal, cada macho fértil é capaz de engravidar várias fêmeas, sendo importante focar na esterilização destes. O método de castração cirúrgica para gatos machos, a orquiectomia, que é a retirada total dos testículos, é uma técnica segura e eficiente, porém consiste em um procedimento demorado e dispendioso quando praticado em larga escala (KUTZLER & WOOD, 2006). Desde 1980, vários de métodos de esterilização não cirúrgicos vêm sendo investigados. No entanto nenhum deles se mostrou eficiente e seguro para ser adotado como alternativa à castração cirúrgica até o presente momento.

Em mamíferos, um aumento na temperatura dos testículos, que se localizam fora da cavidade abdominal dentro da bolsa escrotal, leva a redução na produção e na motilidade dos espermatozoides e a um aumento na quantidade de espermatozoides anormais (HANSEN, 2009), podendo levar à infertilidade temporária ou definitiva. Sabendo disso, a hipertermia mediada por nanopartículas aplicada diretamente aos testículos aparece como uma alternativa para induzir a infertilidade em animais machos.

Dentro da nanotecnologia, a capacidade de nanopartículas magnéticas em gerar calor na região onde estão localizadas por efeito da interação dos momentos magnéticos com um campo magnético alternado é chamado de magneto-hipertermia (WANG *et al.*, 2010; CAZARES-CORTES *et al.*, 2018).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a magneto-hipertermia testicular em ratos resultou em dano aos túbulos seminíferos e atrofia testicular a curto prazo, até 56 dias, sem efeitos colaterais (JIVAGO *et al.*, 2021). Em outro trabalho demonstrou-se que o uso da magneto-hipertermia testicular em ratos acompanhados por 12 meses após o tratamento, promoveu infertilidade definitiva nos animais, com atrofia testicular e queda da testosterona sérica a níveis basais, além de não ter causado efeitos colaterais à saúde dos animais a longo prazo (BRITO *et al.*, 2025).

Assim, como a magneto-hipertermia testicular já se mostrou efetiva e segura em ratos, este trabalho visa a utilização desta técnica em gatos para avaliação e observação se os resultados serão semelhantes nesta espécie. Além das diferenças fisiológicas, é comum observar diferenças na reação a tratamentos entre espécies, especialmente no que diz respeito a tolerância à dor e à toxicidade de substâncias. Por este motivo é necessário que estudos detalhados sejam realizados nas diferentes espécies de interesse antes de transpor uma técnica desenvolvida em uma espécie animal para outra.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Animais errantes

O vínculo entre o homem e os animais é um fenômeno de caráter global e corresponde a um convívio que data de milênios e constitui uma relação que impacta fortemente sobre a saúde das pessoas e dos animais (FORTALEZA, 2006). Um sistema social é formado entre o elo entre humanos e animais. Por um lado, há os animais inseridos no contexto familiar e sua interação com o núcleo e os benefícios que sua relação acarreta, e em outro extremo, há como esses animais são cuidados e manejados. Muitas vezes, são deixados soltos nas ruas causando um impacto direto na dinâmica das populações causando desequilíbrio na promoção da saúde da família e da comunidade como um todo (GARCIA, 2009).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2019, o Brasil contava com pelo menos 54 milhões de cães e 24 milhões de gatos em lares brasileiros (MMA, 2023). O IPB (Instituto Pet Brasil) levantou que houve crescimento do número de animais em condições de vulnerabilidade, passando de 3,9 milhões em 2018 para 8,8 milhões, no início da pandemia em 2020 - um aumento de 126%. Do total da população de animais vulneráveis, os cães representam 69,4% (6,1 milhões), enquanto os gatos correspondem a 30,6% (2,7 milhões) (IPB, 2022). Organizações de bem-estar animal européias indicam que existam milhões de gatos abandonados na Europa todos os anos. As estimativas indicam que na Espanha, o número de gato abandonados anualmente é em torno de 150 mil (LUZARDO *et al.*, 2023). A quantidade de gatos soltos nos Estados Unidos é estimada em dezenas de milhões (MILLER *et al.*, 2014).

Animais errantes são um problema de saúde pública para grande parte do mundo (ALONSO *et al.*, 2013). Estima-se que, somente nos Estados Unidos, no ano de 2018, foram eutanasiados aproximadamente 733 mil cães e gatos (SPEHAR & WOLF, 2020). Além dos impactos sociais e éticos, há um gasto elevado para os cofres públicos com a captura, a guarda e a eutanásia desses animais. Além disso, em 2021 no Brasil, foi promulgada uma Lei Federal que proíbe a eutanásia de cães e gatos pelos órgãos de controle, com exceção nos casos de males, doenças graves ou enfermidade infectocontagiosas incuráveis que coloquem em risco a saúde humana e de outros animais (LEI FEDERAL Nº 14228/2021).

Para prevenir e controlar as zoonoses e outros impactos que os animais de companhia podem acarretar para os seres humanos, medidas de saúde são necessárias e estas estão intimamente ligadas com o grau de desenvolvimento da população em que esses animais estão inseridos, o nível de urbanização, fatores socioeconômicos, culturais entres outros (OMS, 1998; GARCIA, *et al.*, 2018).

2.2 - Gatos e sua população

O gato (*Felis catus*) ou gato doméstico é uma espécie encontrada no mundo todo. São animais extremamente adaptáveis e que mesmo em sua evolução sendo um animal de companhia, manteve características de semi ou total independência em relação ao homem (VILELA & LAMIM-GUEDES, 2014). Os gatos podem ser classificados em quatro categorias: domiciliados (possuem tutor e não têm acesso a rua), semi-domiciliados (tem tutor, mas possuem acesso livre a rua); comunitários ou de vizinhança (não possuem tutor fixo e são cuidados e alimentados por diversas pessoas) e errantes ou ferais (totalmente independentes para se abrigar e se alimentar) (DIAS *et al.*, 2013).

Quando de vida livre, a facilidade com que gatos domésticos se organizam em colônias favorece o crescimento exponencial das populações e desafia todos os métodos de controle conhecidos. Os gatos geralmente preferem ambientes semiurbanos, onde se agrupam em bandos e perambulam em áreas urbanas a procura de abrigo e comida, pulverizando urina, sofrendo e causando acidentes e atacando espécies vulneráveis, impactando fortemente na saúde pública e no meio ambiente (LUZARDO *et al.*, 2023).

No meio urbano, o aumento desenfreado da população de gatos pode promover um grande impacto sobre a população de espécies selvagens locais. Além da atividade predatória, esses animais podem transmitir doenças para várias espécies animais e humanos, sendo vetor de vários agentes etiológicos (KERBER, 2017). A presença de gatos ferais no ambiente urbano, vem se tornando uma grande preocupação na saúde pública, pois somente uma pequena parte dessa população é vacinada e castrada (PEREIRA *et al.*, 2020).

Características reprodutivas específicas incluindo maturidade sexual precoce, dominância de macho alfa, reprodução sazonal poliestral e gravidezes múltiplas contribuem para a natureza prolífica do gato doméstico (PURSWELL & KOLSTERP, 2006; LEVY, 2011). A taxa de reprodução destes animais é enorme. Uma única gata, por exemplo, pode gerar cerca de 781 mil descendentes diretos e indiretos no curto período

de 7 anos (BEAVER, 2003). O crescimento desordenado de sua população e o aumento no número de abandono desses animais acarreta um grande impacto para o meio ambiente onde esses animais estão inseridos (PEREIRA *et al.*, 2020).

No Brasil, Fernando de Noronha considerada patrimônio humano da Unesco é um exemplo de local onde a grande quantidade de gatos errantes provoca problemas de saúde pública e danos ambientais. A população de gatos estimada foi de aproximadamente 1300 gatos e está entre as mais altas já registradas em uma ilha (DIAS *et al.*, 2017). A grande quantidade desses animais causa danos diretos a fauna do local com a predação de espécies nativas e ameaçadas de extinção. Em um estudo realizado em 2019, foi constatado um aumento médio de 41,1% dessa população de felinos sugerindo a necessidade urgente de controle e erradicação populacional desta espécie para promover a conservação da vida selvagem nativa, neste importante *habitat* de reprodução de aves marinhas ameaçadas, bem como de diversas espécies endêmicas (FONSECA *et al.*, 2021).

2.3- Controle Populacional de Animais Errantes

Durante muitos anos, o controle populacional de animais errantes era realizado com a captura e eutanásia em massa desses animais. Porém, essas ações nunca foram satisfatórias e considerando os aspectos éticos e legais, esta prática vem sendo substituída por outros métodos de controle desta superpopulação. No Brasil, a lei federal 13.426/2017 dispõe sobre a política de controle de natalidade de cães e gatos e dá outras providências e em seu art 1º cita: “O controle de natalidade de cães e gatos em todo território nacional será regido de acordo com o estabelecido nesta Lei, mediante esterilização permanente por cirurgia, ou por outro procedimento que garanta eficiência, segurança e bem-estar animal.”. Em muitos países, ao longo dos anos, o controle reprodutivo e a posse responsável vêm se mostrando muito mais eficiente e menos onerosa que a eutanásia (INSTITUTO PASTEUR, 2000). A Holanda tornou-se o primeiro país livre de cães abandonados após a execução de políticas públicas de conscientização, multas por abandono e castrações (SAWBRIDGE, 2020). Hoje, acredita-se que a ação direta sobre a reprodução com técnicas focadas em esterilização somadas a ações de educação para guarda responsável e legislação apropriada são a chave para o controle populacional

(MENDES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; MOUTINHO *et al.*, 2015).

Quando se fala sobre o controle populacional nas colônias de felinos errantes, onde a grande maioria dos gatos apresenta um comportamento feral, a eliminação de uma parcela desses animais com a eutanásia, remoção para abrigos ou adoção não é eficiente para o controle populacional (SPEHAR & WOLF, 2020). Esse fato se deve ao efeito vácuo, um fenômeno natural que ocorre quando a remoção de gatos de uma área leva à substituição desses indivíduos por outros provenientes de uma região próxima, não havendo diminuição da população desta colônia e algumas vezes notando-se até um aumento no número de indivíduos (LUZARDO *et al.*, 2023).

2.4- Fisiologia da reprodução do gato macho.

2.4.1 - Aparelho Reprodutor do gato macho

O sistema reprodutor do gato macho é constituído pelo pênis, dois testículos, escroto ou bolsa escrotal, próstata, glândulas bulbouretrais e ductos deferentes (Figura 1). Os testículos nos filhotes de gatos machos devem ser palpáveis na bolsa escrotal com 6 a 8 semanas de vida (LITTLE, 2015).

O pênis está localizado ventralmente ao saco escrotal e se direciona caudalmente, fazendo uma reversão após a ereção e se posicionando de cima para baixo (SEBASTIANI & FISHBECK, 2005). O pênis do gato contém um osso vestigial e fica revestido pelo prepúcio quando não está ereto. Parte do pênis é coberto com 120 a 150 espículas penianas, dependentes de testosterona, que em machos castrados desaparecem entre 5 e 6 semanas (LITTLE, 2015). Nos gatos domésticos a ovulação é induzida e depende totalmente da ativação de mecanorreceptores existentes no interior da vagina da gata, o que ocorre através da estimulação mecânica das espículas presentes no pênis dos gatos machos (SILVA, 2007). Antes da puberdade, o pênis é parcialmente aderido por uma prega denominada “prega balanoprepucial” e a liberação do pênis desta prega depende de hormônios andrógenos e sua porção livre tem aproximadamente 5-10mm de comprimento e 4-5mm de diâmetro na base (JOHNSON, 2022).

Os testículos estão localizados dentro da bolsa escrotal ventralmente ao ânus do animal e são ligados ao organismo através do cordão espermático formado pelo ducto

deferente, artéria e veia testicular e plexo nervoso. Os testículos dos gatos, na fase adulta, possuem em média 1,5x1x1 cm cada um (JOHNSTON *et al.*, 2001; LITTLE, 2015). A localização dos testículos dentro da bolsa escrotal localizados externamente à cavidade abdominal possibilita uma temperatura mais baixa que o restante do corpo do animal (DYCE *et al.*, 2004). Em espécies que se caracterizam pela presença dos testículos na bolsa escrotal, é necessário que a temperatura das gônadas esteja entre 4°C a 7°C abaixo da corporal para que a espermatogênese ocorra de forma adequada (REECE, 2006). Para a manutenção das alterações térmicas ambientais, os testículos possuem um mecanismo complexo de regulação térmica que incluem a pele delgada do saco escrotal, o músculo cremaster e a túnica Dartos, que agem retraindo e relaxando a bolsa escrotal, e aproximando ou afastando os testículos do abdômen, e o plexo pampiniforme que age como um mecanismo de troca de calor contracorrente nos vasos que o percorrem (LYRIO *et al.*, 2023).

As gônadas nos gatos possuem funções endócrina (secreção de testosterona) e gametogênica com a produção de espermatozoides nos túbulos seminíferos (PARAGON & VAISSAIRE, 2001). Além da testosterona, são hormônios importantes no macho felino o LH e o FSH, ambos produzidos na adeno-hipófise em resposta ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido pelo hipotálamo. Estes vão agir diretamente sobre a espermatogênese e sobre a produção de testosterona. A testosterona é essencial para o desenvolvimento das características sexuais do macho, produção de espermatozoides, libido e comportamento sexual (LITTLE, 2015).

O parênquima testicular é composto principalmente pelos túbulos seminíferos onde estão localizadas as células germinativas (espermátogônias, espermátócitos e espermátides) e as células de Sertoli que dão sustentação e suporte ao processo de espermatogênese (WHITNEY & SUTTIE, 2018). Entre os túbulos seminíferos encontram-se o tecido intersticial onde estão localizadas as células de Leydig que secretam a testosterona (TORTORA & DERRICKSON, 2010). Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos e são transportados para dentro do epidídimo através dos ductos eferentes.

Na ultrassonografia testicular, o formato do testículo no gato é mais arredondado do que oval e há a presença de uma linha hiperecótica no centro do testículo chamada mediastino. Este representa a área central dos ductos coletores que canalizam os espermatozoides produzidos e os encaminham para o epidídimo (JOHNSON, 2022).

Nos felinos, o epidídimo é dividido em cabeça, corpo e cauda. A cabeça do epidídimo fica localizada dorsocranial ao testículo e o corpo localizado na posição dorsolateral. Estes fornecem o ambiente para a maturação dos espermatozoides. A cauda, localizada na região dorsocaudal, proporciona o armazenamento das células espermáticas antes da ejaculação (REECE, 2006). A cauda do epidídimo passa medialmente sobre a superfície testicular e posteriormente dá início ao ducto deferente, que irá desembocar na uretra, permitindo assim a passagem das células espermáticas para o meio exterior na ejaculação (JOHNSTON *et al.*, 2001)

As glândulas acessórias presentes no gato são responsáveis por eliminar secreções na uretra, que são misturadas com a suspensão de espermatozoides proveniente do ducto deferente. As glândulas bulbouretrais são duas pequenas estruturas circulares localizadas próximas ao base do pênis perto do arco isquiático (DYCE *et al.*, 2004). A próstata é responsável pela maior porção da produção do líquido seminal obtido de uma ejaculação e é composta por dois lobos craniais e dois caudais ao redor da uretra e próxima ao colo da vesícula urinária. A próstata é dependente de andrógenos sofrendo atrofia após a castração (JOHNSON, 2022).

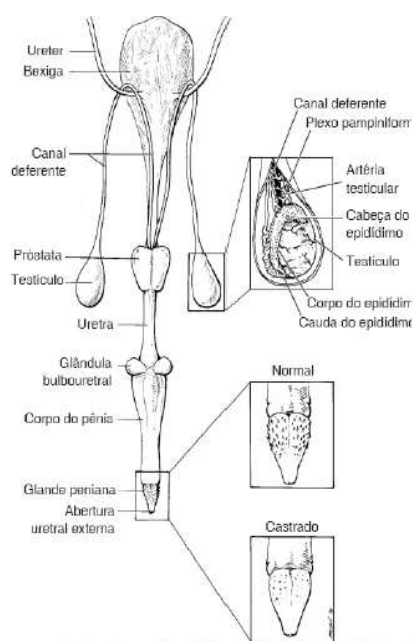


Figura 1. Anatomia do trato reprodutivo do macho felino. (Fonte: Johnston *et al.* 2001)

2.4.2- Espermatogênese

A espermatogênese ou produção espermática é um processo organizado e altamente complexo que ocorre dentro dos túbulos seminíferos e transforma uma espermatogônia em uma célula altamente diferenciada, o espermatozoide (GOBELLO, 2022). O processo da espermatogênese pode ser dividido em estágios onde as células passam por várias diferenciações, divisões meióticas e rearranjo no processo germinativo (FRANÇA & GODINHO, 2003). A espermatogênese compreende a proliferação de espermatogônias, meiose de espermatócitos e diferenciação das espermátides em espermatozoides, a chamada espermiogênese (GOBELLO, 2022). Assim, o ciclo do epitélio seminífero é a sequência de eventos que ocorrem em todos os estágios ordenados em gerações concomitantes de células que formam de quatro a cinco camadas concêntricas da base ao lúmen do túbulo seminífero. À medida que uma geração é liberada no lúmen, no mesmo instante, uma nova geração é formada em sua base. A duração de cada ciclo do epitélio seminífero no gato foi estimada como sendo de 10,4 dias, e considera-se que aproximadamente 4,5 ciclos são necessários para que o processo de espermatogênese esteja completo (FRANÇA *et al.*, 2005). Sendo assim, estima-se que a espermatogênese no gato doméstico dure em torno de 46,8 dias (FRANÇA & GODINHO, 2003).

Após a produção de espermatozoides, estes são liberados na luz dos túbulos seminíferos e transportados até o epidídimo onde ocorre o processo de maturação espermática. Durante o trânsito no epidídimo ocorrem várias alterações nas características morfológicas e funcionais dos espermatozoides. Ao longo do epidídimo, os espermatozoides adquirem motilidade progressiva através de flagelos funcionais e ocorre a remoção de espermatozoides com anormalidades por fagocitose, garantindo assim a capacidade de fecundação do ejaculado (ROBAIRE *et al.*, 2006). O trânsito dos espermatozoides no epidídimo e sua maturação requerem um adicional de 10 a 12 dias, completando todo o processo de produção espermática em um período de aproximadamente 60 dias (JOHNSON, 2022). A produção diária de espermatozoides por grama de testículos em gatos foi descrita como sendo de aproximadamente 16 milhões (FRANÇA & GODINHO, 2003).

2.5- Esterilização cirúrgica e Método Captura-Esterilização-Devolução (C.E.D.)

A esterilização cirúrgica é uma das medidas de controle populacional de cães e gatos mais eficientes e seguras. A orquiectomia, que é a retirada total das gônadas masculinas, é o método mais eficaz de esterilização de gatos machos pois interrompe totalmente e imediatamente a fertilidade e ajuda a diminuir a agressividade, a competição por fêmeas e, no caso de gatos errantes, o comportamento de sair da sua colônia a procura de outras fêmeas (NELSON & COUTO, 2010; FOSSUM, 2013, NEGREIROS *et al.*, 2015).

Atualmente, quando falamos sobre colônias de gatos com aumento populacional desenfreado, um método conhecido como Captura-Esterilização-Devolução (C.E.D.) ou *Trap-Neuter-Return* (TNR) é preconizado. Este método utiliza esterilização cirúrgica em fêmeas e machos e o retorno dos animais para seu ambiente nativo para reduzir a abundância populacional (MILLER *et al.*, 2014). Esta técnica consiste em um manejo não letal onde o animal é recolhido, esterilizado, vacinado, registrado e devolvido à sua comunidade de origem. O método baseia-se na Teoria do Efeito Vácuo, que afirma que se a população de animais permanecer em seu território, novos indivíduos não chegarão e se reproduzirão (SPEHAR & WOLF, 2020). Animais novos com condições reprodutivas e sanitárias desconhecidas tornam o ciclo descontrolado, uma vez que o local permite que estes novos indivíduos usufruam das condições ambientais de manutenção da vida ali presentes, como abrigo, água e comida (THE VACUUM EFFECT, 2019).

Vários estudos, publicados em diversas partes do mundo, demonstram que a técnica C.E.D numa área específica pode ter sucesso na redução da população de gatos ao longo do tempo, particularmente quando associada com a adoção de filhotes e adultos saudáveis que são dóceis (SWARBRICK & RAND, 2018).

Vale ressaltar que mesmo a esterilização cirúrgica sendo a base do controle populacional praticado pelo método C.E.D, a cirurgia de castração tanto do macho quanto da fêmea, requer centro cirúrgico adequado, equipamentos esterilizados, profissionais treinados, anestesia e tempo suficiente de recuperação pós-operatório antes da reintrodução do animal no seu ambiente de origem. Além de onerosa, a esterilização cirúrgica carrega riscos como qualquer procedimento cirúrgico (CATHEY & MEMON, 2010).

Quando se pensa em machos que compõe uma colônia de gatos, eles são capazes de acasalar com múltiplas fêmeas e possuem uma alta capacidade reprodutiva,

contribuindo significativamente para a reprodução descontrolada e o aumento da população de gatos errantes. Além disso, os gatos possuem comportamento territorialista e são agressivos quando disputam as fêmeas entre si, ocasionando brigas, lesões entre os gatos da colônia e perturbação dos ambientes onde as colônias estão localizadas.

Quando consideramos animais errantes, o método de castração cirúrgica para gatos machos, a orquiectomia, apesar de ser uma técnica segura, consiste em um procedimento demorado e dispendioso quando praticado em larga escala (FAGUNDES *et al.*, 2014). Por se tratar de um procedimento cirúrgico, complicações cirúrgicas e anestésicas podem ocorrer, além de complicações pós-operatórias como infecções na ferida cirúrgica (HOWE, 2006).

2.6 - Métodos Alternativos para Castração não-cirúrgica de animais machos

Desde 1960, vários métodos de controle de fertilidade não cirúrgicos vêm sendo investigados. Contraceptivos e esterilizantes não cirúrgicos podem fornecer uma alternativa humana e mais econômica à esterilização cirúrgica (MASSEI & MILLER, 2013). Como exemplo destes métodos alternativos de contracepção e esterilização temos a imunoesterilização e controle hormonal (NOVOTNY *et al.*, 2015) e a castração química, que consiste na injeção intratesticular ou intraepididimária de substâncias que podem causar infertilidade por induzir a azoospermia (PARANZINI *et al.*, 2018).

2.6.1 - Terapias Hormonais e Imunoesterilizantes

As terapias hormonais indicadas para utilização como contraceptivos em animais consistem na aplicação de agonistas do GnRH (FONTAINE, 2021; FAVRE *et al.*, 2014). Porém, esses tratamentos não conseguiram induzir infertilidade permanente, e são mais utilizados em clínicas veterinárias quando a castração cirúrgica é contraindicada por alguma razão (FESSEHA, 2019).

A terapia hormonal com aplicação de agonista GnRH resulta na dessensibilização das células hipofisárias aos efeitos estimuladores do GnRH. Após uma estimulação inicial, os implantes agonistas de GnRH de liberação lenta levam à regulação negativa dos receptores hipofisários de GnRH resultando em uma secreção significativamente reduzida de gonadotrofinas e, como consequência, em uma perda funcional da atividade gonadal (GOERICKE *et al.*, 2011). Em um estudo realizado em gatos, a utilização de um

implante agonista de GnRH (deslorelina 4,7 mg, Suprelorin®) foi bem-sucedida durante 7 meses de uso causando azoospermia. Porém, a avaliação histológica testicular dos animais demonstrou grande variabilidade individual no grau de supressão espermatogênica (NOVOTNY *et al.*, 2015). A duração do implante em gatos (machos e fêmeas) é relativamente curta e é de grande variabilidade individual (FONTAINE, 2015). Além de ser um método não permanente, estes implantes são bastante caros e sua comercialização não é autorizada em muitos países.

A imunoesterilização é uma técnica que ganhou impulso na década de 80 inibindo a fertilidade por meio de vacinas que induzem uma resposta imune impedindo a fertilidade. Os principais estudos em vacinas contraceptivas incluem a vacina contra zona pelúcida suína (PZP) em fêmeas e a vacina anti-GnRH, que pode ser utilizada em fêmeas e machos. O GnRH (hormônio liberador de gonadotropina) estimula a liberação de LH e FSH pela hipófise, que por sua vez estimulam a ovulação nas fêmeas e a espermatogênese no macho (NAZ & SAVER, 2016). Em um estudo realizado com camundongos, cães e carneiros com a aplicação de uma vacina anti-GnRH ocasionou quase nenhuma diminuição da espermatogênese e a resposta não foi mantida (FERRO *et al.*, 2004). Um outro estudo foi realizado com gatos machos que receberam duas aplicações da vacina contra GnRH disponível comercialmente para suínos (Improvac, Zoetis Belgium SA, 0,5 mL sc). Os animais foram avaliados por 24 semanas e houve diminuição de 90% no número total de espermatozoides, de 70% da motilidade e 60% da viabilidade. Além disso, houve diminuição da testosterona e do volume testicular, corroborando com estudos anteriores de curto prazo, mas sem resultados a longo prazo que comprovassem a eficácia permanente da vacina (OCHOA, *et al.*, 2022).

2.6.2 - Agentes quimioesterilizantes

Em animais machos, as injeções intratesticulares e intraepididimais de agentes esclerosantes representam métodos alternativos à esterilização cirúrgica. Uma grande variedade de agentes químicos esterilizantes para injeções intratesticulares vêm sendo estudados em várias espécies de mamíferos como: gluconato de zinco, danazol, glicerol, ácido láctico, cloridrato de ferro, sulfato ferroso, cloreto de cálcio, solução salina hipertônica, entre outras (RAFATMAN *et al.*, 2019). No entanto, todos esses agentes químicos quando aplicados no testículo causam dor, febre e até orquite, uma inflamação

grave nos testículos. Além disso, somente provocam a destruição parcial e temporária do parênquima testicular (FESSEHA, 2019) e não eliminam totalmente a produção gonadal de testosterona (KUTZLER, 2015). Um agente químico ideal para a utilização em castrações deve eliminar completamente a espermatogênese, androgênese, libido e não ocasionar toxicidade sistêmica ou efeitos colaterais (HAMED *et al.*, 2023). Na última década, os quimioesterilizantes mais comumente estudados foram o gluconato de zinco e o cloreto de cálcio (FESSEHA, 2019).

O gluconato de zinco é bastante estudado como agente químico para castração em mamíferos machos (HAMED *et al.*, 2023). O gluconato de zinco recebeu aprovação da FDA como quimioesterilizante para uso em cães machos filhotes nos EUA em 2003 (CAVALIERI, 2017; LICHTLER, 2014). Este agente promove infertilidade devido à esclerose do tecido testicular (LEVY *et al.*, 2008). Estudos anteriores em cães relataram que a injeção intratesticular de gluconato de zinco afetou a espermatogênese com a morte de células germinativas. A azoospermia foi relatada em 80% a 90% dos cães após o tratamento com gluconato de zinco (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A utilização desse quimioesterilizante ocasionou dano da barreira hematotesticular e a liberação de antígenos que foram responsáveis pela reação inflamatória testicular relatada em um estudo realizado com gatos machos (FAGUNDES *et al.*, 2014). Em outro estudo realizado em gatos, os efeitos do gluconato de zinco causaram azoospermia em 73% (8/11) dos animais tratados por mais de dois ciclos espermatogênicos (120 dias) com uma única aplicação do quimioesterilizante, mas as concentrações de testosterona permaneceram normais durante o tempo de tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Embora a aplicação de gluconato de zinco cause danos nos aspectos reprodutivos, muitos efeitos adversos são relatados como dor nos pós procedimento, lesões escrotais, inflamação dos testículos, edema e ulcerações no local da aplicação (KUTZLER & WOOD, 2006). Além disso, não há comprovação da irreversibilidade do método.

O cloreto de cálcio em solução (CaCl_2) é um agente esclerosante que tem sido utilizado de forma promissora para castração química e seus estudos incluem as mais variadas espécies (FESSEHA, 2019). Em estudos anteriores, foi relatado que a injeção intratesticular bilateral de solução de cloreto de cálcio, com ou sem adição de anestésico local, promoveu a esterilização em ratos, bodes e cães machos, através da degeneração testicular juntamente com a diminuição significativa e dependente da dose na concentração de testosterona, sem imposição de qualquer dor aparente, resposta geral ao estresse, toxicidade metabólica ou efeitos colaterais tóxicos e indesejáveis em um período

de 60 dias (JANA & SAMANTA, 2011). A ação do cloreto de cálcio para esterilização ocorre através de danos oxidativos no tecido testicular causado através da produção de espécies reativas de oxigênio (JANA & SAMANTA, 2006). Um estudo mostrou que uma única injeção intratesticular bilateral de CaCl_2 em etanol 95% foi um método eficaz para indução de castração química em cães machos. A abordagem mostrou eficácia a longo prazo (9 meses) e reduziu o comportamento sexual (LEOCI *et al.*, 2019). Em gatos machos, foi relatado que uma única aplicação de cloreto de cálcio contendo cloridrato de lidocaína a 1%, com avaliação 60 dias pós aplicação, foi responsável por causar azoospermia e diminuição da testosterona através da destruição das células germinativas e células de Leydig (JANA & SAMANTA, 2011).

Até o momento, uma formulação comercial de CaCl_2 aprovada para uso em animais domésticos não está disponível e a irreversibilidade do procedimento ainda não está comprovada. A maioria dos estudos são baseados em formulações manipuladas (CAVALIERI, 2017).

2.6.3 – Métodos Térmicos

O uso de calor proveniente de diversas fontes, como água quente, luz infravermelha, micro-ondas e ultrassom, aplicados aos testículos também é relatado como forma de abordagem de castração não cirúrgica (FAHIM *et al.*, 1975) e pode levar a infertilidade em machos com resultados variáveis (TSURUTA *et al.*, 2012). Em mamíferos, um aumento na temperatura dos testículos, leva a redução na produção e na motilidade dos espermatozoides e a um aumento na quantidade de espermatozoides anormais (HANSEN, 2009). Considerando as referências bibliográficas disponíveis pode-se afirmar que o estresse térmico testicular leva a subfertilidade ou infertilidade dependendo da temperatura e da duração da exposição. O tempo de estresse térmico impacta as células espermatogênicas resultando nas reduções de motilidade, da morfologia normal e na produção de espermatozoides (ROBINSON, *et al.*, 2022).

Em estudo realizado em camundongos, a imersão da bolsa escrotal em água a 42°C por 30 minutos causou uma redução de 50% na produção de espermatozoides entre 7 e 60 dias quando comparados ao grupo controle em que os animais foram submetidos à água a temperatura de 33°C (PÉREZ-CRESPO *et al.*, 2008). Em um estudo realizado com cães através da hipertermia testicular com a utilização de uma almofada térmica elétrica aplicada diretamente na bolsa escrotal, o estresse térmico diminuiu imediatamente a

qualidade do sêmen. A qualidade espermática foi prejudicada, mas os efeitos foram imediatos e transitórios (LYRIO, *et al.*, 2023).

As primeiras pesquisas sobre o uso do ultrassom para supressão da espermatogênese relataram que este método era eficaz devido aos seus efeitos térmicos e mecânicos combinados, mas dependiam da dosagem, frequência e duração do tratamento (FAHIM *et al.*, 1975). Estudos de curto prazo demonstraram que uma curta exposição ao ultrassom terapêutico induz perda reversível de fertilidade, mas são necessários estudos de longo prazo para determinar se esse método causa uma perda progressiva de espermatogônias resultando no esgotamento das reservas de espermatozoides do epidídimo (TSURUTA *et al.*, 2012). Apesar dos estudos com esta técnica serem promissores, ainda não foi identificado um tratamento padrão e eficaz para produzir contracepção durável e com uma única aplicação (LEOCI *et al.*, 2015).

Apesar das inúmeras tentativas de desenvolvimento de um método não cirúrgico para causar infertilidade em animais machos, até o momento não há nenhum método capaz de causar esterilidade definitiva e permanente com uma única aplicação e sem causar efeitos adversos onde seja possível uma atividade de esterilização em massa de animais errantes auxiliando no controle do crescimento populacional desenfreado.

2.7 - Nanotecnologia

A nanociência é o estudo dos princípios e propriedades dos materiais de tamanho nanométrico (entre 1-100nm). A produção desses materiais em nanoescala e a realização de manipulações desses nanomateriais é chamada de nanotecnologia. Os nanomateriais são únicos, pois fornecem uma grande área de superfície e pequeno volume (SIM & WONG, 2021; BUZEA *et al.*, 2007). As características únicas desses nanomateriais possibilitam inúmeras aplicações considerando que estes possuem propriedades diferenciadas, sejam elas elétricas e/ou magnéticas, químicas, físicas, mecânicas etc. (ROSA *et al.*, 2020).

A nanotecnologia é uma realidade na área tecnológica mundial compondo a engenharia de nanomateriais e sistemas funcionais em escala molecular ou atômica. Ela abrange a síntese de novos nanomateriais e aplicações na saúde humana e animal, com aplicações nas mais diversas áreas de atuação (JOANITTI *et al.*, 2022; SIM & WONG, 2021).

Da combinação e associação das propriedades e capacidades dos materiais nanoestruturados, como as nanopartículas, com biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos, nasceu o campo da nanobiotecnologia (TESSIER, 2022). O termo nanobiotecnologia significa a união entre a nanotecnologia e a biologia. Entre suas áreas estão envolvidas qualquer aplicação da nanotecnologia em pesquisas biológicas, como a área da nanomedicina que utiliza tecnologias em nanoescala e suas técnicas para prevenir, diagnosticar, monitorar e tratar doenças, incluindo técnicas de imagem, sistema de administração de fármacos, engenharia de tecidos, implantes e terapêutica farmacêutica (DUTT *et al.*, 2023; SIM & WONG, 2021).

Uma área de grande potencial na utilização de nanomateriais são os diversos estudos de nanopartículas metálicas utilizadas como atrativo para sinais eletromagnéticos permitindo o aquecimento local (BALL, 2013). Na área médica, além das pesquisas no tratamento de câncer, estudos realizados com aplicação testicular de nanopartículas com ou sem aquecimento têm mostrado resultados promissores para causar infertilidade em machos (LI *et al.*, 2013; JIVAGO *et al.*, 2021). Aplicações de nanopartículas de prata intratesticular em ratos foram estudadas a fim de desenvolver um agente contraceptivo nanotecnológico para animais machos, o que resultou em efeitos tóxicos na espermatogênese, porém agudos e reversíveis (BRITO *et al.*, 2021).

2.7.1 - Nanopartículas Magnéticas (NPMs)

Em 1970, a importância do magnetismo na medicina já era uma realidade na medicina diagnóstica, mas outras aplicações só foram desenvolvidas com a implementação da nanotecnologia. Com a introdução da nanotecnologia na década seguinte e o desenvolvimento das nanopartículas magnéticas (NPMs) com seu tamanho e superfície e sua capacidade de reagirem a um campo magnético, estes materiais passaram a ser usados para marcação de células e moléculas, produzindo tecidos e outros sistemas com propriedades magnéticas importantes (STUEBER *et al.*, 2021).

As nanopartículas magnéticas são uma classe importante de nanopartículas metálicas fabricadas de metais puros (Fe, Co, Ni, etc), ligas (FeCo; γ -Fe₂O₃) e óxidos (Fe₃O₄) com magnetização de alta saturação (WU *et al.*, 2019). Porém, as aplicações que utilizam metais puros, que apresentam o maior nível de magnetização de alta saturação, estão sendo abolidos da engenharia biomédica devido a seu maior grau de toxicidade e

instabilidade. In vivo, os óxidos metálicos são mais estáveis e mais biocompatíveis, sendo mais empregados nas aplicações médicas (FARZIN *et al.*, 2020).

As nanopartículas magnéticas podem ser usadas em vários campos da biomedicina. Suas particularidades como suas propriedades físico-químicas, área de superfície, elevada capacidade de funcionar a nível molecular e a fácil adaptação dessas propriedades aos requisitos das aplicações na área da saúde, as fizeram materiais com grande potencial biomédico (MONTESERIN *et al.*, 2021).

Com o avanço da síntese e funcionalização de superfície, principalmente o revestimento das nanopartículas magnéticas (NPMs) com materiais orgânicos e inorgânicos resultando em uma estrutura de *core-shell*, houve a melhora da compatibilidade e proteção dos núcleos magnéticos da oxidação e corrosão (ZHANG & JIANG, 2023). Assim, as NPMs passaram a exibir um comportamento magnético e paramagnético, e por seguirem as leis de Coulomb, podem sofrer um efeito de transferência de energia do campo magnético para si mesmas, tendendo a se agregar na presença de um campo magnético externo e dispersar após a remoção da fonte magnética, tendo seu uso em desenvolvimento como agentes térmicos, quimioterápicos e radioterápicos (SARGENTELLI & FERREIRA, 2010; VALLABANI *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019).

Atualmente, as nanopartículas magnéticas são utilizadas em diversas áreas como a separação magnética, administração de medicamentos, ressonância magnética e hipertermia mediada por nanopartículas. No campo da hipertermia, nanossistemas que podem ser aquecidos vêm sendo desenvolvidos para serem usados para tratamento de tumores (LAURENT *et al.*, 2011) e como método alternativo de contracepção de animais machos (JIVAGO *et al.*, 2021).

2.7.2 - Nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas superparamagnéticas mais amplamente utilizadas na pesquisa e atuação biomédica são as nanopartículas de ferritina produzidas com óxido de ferro e seus vários polimorfismos cristalinos, entre eles o γ -Fe₂O₃ (maghemita) e Fe₃O₄ (magnetita). A utilização desta NPMs é uma ferramenta promissora em diversas áreas como hipertermia, administração de fármacos e exames de diagnóstico por imagem e se baseia em seu comportamento paramagnético, alta biocompatibilidade, estabilidade

coloidal e química em condições fisiológicas, baixa toxicidade e baixo custo (WU *et al.*, 2019; ZHANG & JIANG, 2023).

As NPs de ferritina apresentam maior suscetibilidade magnética quando comparada a materiais superparamagnéticos normais, baixa coercividade e retentividade trazendo a oportunidade de utilização para diversas aplicações biomédicas (ISLAM *et al.*, 2020). Geralmente a superfície das nanopartículas de ferritina são revestidas com surfactantes, sílica, silicones ou ácido fosfórico resultando no aumento da estabilidade e a difusão de fluidos (ZHANG & JIANG, 2023). Além disso, podem ser incorporadas ou conjugadas em sistemas poliméricos como: hidrogéis, esferas, lipossomas e micelas, a fim de guiar magneticamente as nanopartículas até o local desejado ou para liberar um medicamento de maneira controlada após deformação ou hipertermia através em um campo magnético (KIM *et al.*, 2015).

As nanopartículas de óxidos metálicos, como as NPs derivadas de ferritina de espinélio funcionalizadas (MnFe_2O_4 , MgFe_2O_4 , CoFe_2O_4 , ZnFe_2O_4 , Fe_3O_4) estão sendo estudadas e aplicadas para termoterapia de câncer, agentes de contraste de ressonância magnética e ferramentas de esterilização (ISLAM *et al.*, 2020; JIVAGO *et al.*, 2021). As NPs de ferritina de manganês (MnFe_2O_4) podem ser facilmente sintetizadas com tamanhos e morfologias desejáveis e combinam as vantagens de materiais à base de Fe e Mn (AKHLAGHI & NAJAFPOUR-DARZI, 2021). Estas NPs são interessantes pois apresentam uma alta biocompatibilidade, que está associada a presença de íons manganês, possuem propriedade magnéticas ajustáveis, temperaturas de transição mais altas e estabilidade química em temperatura ambiente (ISLAM *et al.*, 2020).

2.7.3 - Magneto-hipertermia

A magneto-hipertermia (MHT) é a capacidade das nanopartículas magnéticas em converter energia magnética em calor. Este aquecimento é alcançado no local onde as NPMs estão localizadas através da interação dos momentos magnéticos e um campo magnético alternado (BRANQUINHO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010). Esta técnica foi relatada experimentalmente em 1957, quando partículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de 20-100nm foram expostas a um campo magnético de 1,2 MHz. A partir daí, várias pesquisas foram realizadas utilizando diversos materiais magnéticos, modificados ou não, com várias frequências e intensidades de campos magnéticos (LAURENT *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, a MHT vem sendo desenvolvida como uma alternativa terapêutica contra o câncer e nos últimos 10 anos, como método alternativo na contracepção masculina. Esta modalidade de tratamento consiste em aumentar a temperatura da região desejada para entre 42°C e 45°C, através da geração de calor pela ativação nas NPMs sob um campo magnético alternado, com a finalidade de inibir os processos regulatórios e de crescimento das células cancerígenas, promover a apoptose celular ou torná-las mais susceptíveis a outros tratamentos (KIM *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2022).

2.8 – Nanocastração

Pesquisadores de nanocontracepção, que trabalham no desenvolvimento de um método contraceptivo simples, não cirúrgico, controlável, mais eficaz e mais barato, têm estudado a utilização de hipertermia mediada por nanopartículas aplicada aos testículos como uma opção viável e permanente na contracepção masculina. No campo da esterilização, métodos de hipertermia mediada por nanopartículas consiste em aplicar as NPMs por via intratesticular e aplicar uma fonte de energia eletromagnética, promovendo o aquecimento dos testículos à faixa de 43 °C a 45°C e mantendo esse aquecimento por 15 minutos, causando a destruição do tecido testicular e a interrupção completa da espermatogênese, considerando que este processo depende de temperaturas mais baixas para ocorrer.

O aquecimento dos testículos utilizando a injeção intratesticular de nanobastões de ouro associada à aplicação de irradiação infravermelha causou infertilidade temporária e permanente em camundongos machos e foi associada à intensidade do laser (LI *et al.*, 2013). Utilizando a tecnologia de laser NIR (*near infrared*) para aquecimento de nanocristais de sulfeto de cobre aplicados intratesticularmente em camundongos, foi demonstrada uma nova plataforma para a esterilização permanente masculina através da tecnologia fototérmica (LIU *et al.*, 2015).

Em MHT, um estudo do nosso grupo de pesquisa utilizando a hipertermia magnética testicular mediada por nanopartículas de MnFe_2O_4 funcionalizadas com citrato foi eficaz em causar infertilidade em ratos machos em período de até 56 dias pós-procedimento com poucos efeitos colaterais agudos na saúde geral do animal (JIVAGO *et al.*, 2021). Resultado semelhante foi encontrado em um estudo que comparou a aplicação endovenosa e intratesticular de nanopartículas de óxido de ferro (SPION)

estabilizadas com ácido cítrico e a hipertermia magnética testicular, causando esterilização permanente dos animais tratados (DING *et al.*, 2021). Estudos subsequentes de nosso grupo demonstraram que o uso da MHT testicular em ratos acompanhados por 12 meses após o tratamento foi capaz de promover infertilidade definitiva nos animais, com atrofia testicular e queda da testosterona sérica a níveis basais, sem causar efeitos colaterais à saúde dos animais a longo prazo (BRITO *et al.*, 2025).

Dessa forma, a técnica de hipertermia magnética (MHT) mediada por nanopartículas, quando aplicada aos testículos com finalidade contraceptiva permanente, apresenta potencial como estratégia eficaz para o controle populacional de animais errantes. No entanto, apesar dos resultados promissores observados em estudos com roedores, ainda não há investigações conduzidas em espécies de interesse, como cães e gatos.

3- JUSTIFICATIVA

Animais errantes são um problema de saúde pública para grande parte do mundo. A reprodução desenfreada de gatos de rua representa um problema multifacetado em ambientes urbanos em todo o mundo. Esses animais se organizam em colônias favorecendo o crescimento exponencial de suas populações e desafiando os métodos conhecidos de controle populacional como a castração. Os gatos domésticos errantes são uma ameaça à saúde animal e humana sendo vetores de zoonoses. Além disso, podem causar efeitos prejudiciais aos ecossistemas locais que habitam com a predação de espécies ameaçadas de extinção. O controle populacional de felinos errantes é um desafio complexo que requer a colaboração entre autoridades locais, organizações de proteção animal, profissionais de saúde veterinária e membros de comunidade.

Programas de esterilização para felinos errantes menos onerosos e com diminuição dos recursos médicos necessários podem levar a economias significativas a longo prazo. Reduzir o número de animais abandonados e controlar sua população pode resultar em menos casos de doenças transmitidas, menos conflitos com a comunidade e menos gastos com resgate, tratamento e eutanásia destes animais em situação de rua.

Métodos alternativos de castração com a utilização de nanotecnologia, especialmente hipertermia mediada por nanopartículas, oferecem a possibilidade do desenvolvimento de uma técnica mais eficiente, segura e menos invasiva para esterilização de animais machos, trazendo benefícios para estes e para as comunidades em que estão inseridos. Apesar dos estudos em roedores mostrarem resultados promissores, nenhum estudo nos animais de interesse (gatos e cães) foi realizado ainda. Como a translação de metodologias envolve adaptações e, às vezes, resultados diferentes, pesquisas utilizando as espécies de interesse precisam ser conduzidas. Assim, este projeto propõe investigar os efeitos da magneto-hipertermia mediada por nanopartículas aplicada diretamente aos testículos com o intuito de promover a esterilidade em gatos machos.

4- OBJETIVOS DO EXPERIMENTO

Objetivo Geral

- Investigar os efeitos a curto e a longo prazo da aplicação de magneto-hipertermia em testículos de gatos como indutor de infertilidade.

Objetivos Específicos

- **Fase 1:** Avaliar os efeitos a curto prazo nos parâmetros reprodutivos dos animais tratados e fazer avaliação da dor possivelmente causada pelo procedimento de magneto-hipertermia testicular mediada por nanopartículas magnéticas;

- **Fase 2:** Avaliar os efeitos a longo prazo da magneto-hipertermia testicular mediada por nanopartículas magnéticas sobre a fertilidade e a saúde dos animais tratados.

5 – MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade de Brasília, SEI número 23106.018229/2022-31 (ANEXO 1).

No total das duas fases foram utilizados 20 gatos machos entre 6 meses e 1 ano de idade, sem raça definida, saudáveis e FIV/FELV negativos. Os gatos participantes do estudo foram oriundos de resgate por protetores independentes ou de tutores que concordaram em inseri-los no estudo mediante termo de consentimento livre esclarecido.

Os animais foram submetidos à exame físico completo, sorologia de FIV e FELV (ELISA), vermifugação e análise sanguínea (hemograma completo, perfil renal e hepático) para constatação de boa saúde antes de serem inseridos no experimento.

Os animais experimentais foram mantidos no gatil no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, soltos, em área fechada e aberta totalmente telada, com alimentação de ração premium e água *ad libitum*.

O trabalho foi dividido em 2 fases: Avaliação de curto prazo- Fase 1: (N=11 gatos) e avaliação de longo prazo - Fase 2 (N=9 gatos).

Epidídimos e testículos de gatos de idade e peso semelhantes submetidos à orquiectomia eletiva foram coletados para servir como controle (n = 4) para as análises *ex vivo*.

5.2- Nanopartículas Magnéticas

Em ambas as fases, as nanopartículas magnéticas (NPMs) utilizadas foram sintetizadas de acordo com Branquinho et al. (2013) no Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica, Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás (UFG) e são compostas de ferrita de manganês (MnFe_2O_4) funcionalizadas com citrato, com diâmetro médio de 9,8nm ($\pm 3,2$) na forma de um fluido magnético na concentração 80-95 mg NP/mL (FIGURA 2).

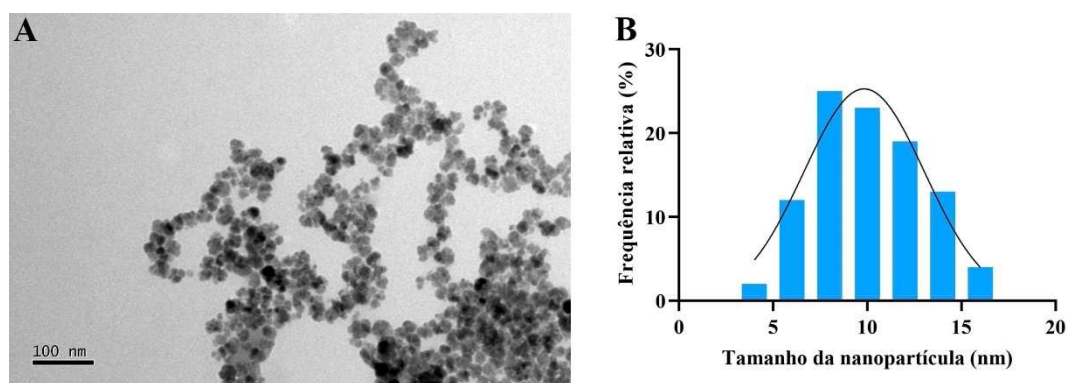


Figura 2. A) Fotomicrografia das nanopartículas utilizadas (MnFe_2O_4) ao microscópio eletrônico de transmissão. B) Distribuição do diâmetro aferido.

5.3- Procedimento de MHT testicular

Os animais experimentais foram pré-medicados com dexmedetomidina ($7\mu\text{g/kg}$, Dexmedetomidor®, Zoetis) e cloridrato de cetamina (5mg/kg , Quetamina®, Vetnil) por via intramuscular, para sedação e analgesia. Após resposta a sedação, a veia cefálica foi cateterizada com cateter 24G intravenoso e foi instituída fluidoterapia de manutenção com solução fisiológica 0,9%. A indução anestésica foi realizada com aplicação de propofol (5mg/kg , Propovan®, Cristália) por via intravenosa e a manutenção anestésica realizada em aparelho de anestesia inalatória com vaporizador calibrado de isoflurano (HB 4.3, HB Hospitalar, Brasil) com isoflurano (Isoforine®, Cristália, Brasil) em circuito aberto (Baraka). Os parâmetros vitais (frequência cardíaca, respiratória, pressão arterial não invasiva e temperatura corporal) foram monitorados com monitor multiparamétrico veterinário (SDAMONITOR 12, SDAMED, Brasil).

A seguir, nos animais de ambas as fases, foi realizada a tricotomia da bolsa escrotal, seguida de medição de ambos os testículos com auxílio de um paquímetro manual para mensuração da largura e comprimento testicular.

Os animais foram submetidos à MHT testicular seguindo o protocolo utilizado em Jivago et al. (2021), com patente: Privilégio de Inovação. N°: BR10201801517, com algumas modificações. Brevemente, foi feita antissepsia e injeção intratesticular de $150\mu\text{L}$ do fluido magnético em cada testículo, sendo este volume dividido em 2 pontos de aplicação (cranial e caudal).

Imediatamente após a aplicação do fluido magnético, os animais foram posicionados com a região dos testículos na bobina do equipamento gerador de campo magnético (Ambrell System Model EasyHeat-LI, Ameritherm, Inc., Scottsville, NY, USA) e expostos a um campo magnético alternado, conforme procedimento descrito por Jivago et al. (2021), para ativar as NPMs de modo a gerar calor (magneto-hipertermia). Durante este procedimento, a temperatura dos testículos foi monitorada por uma câmera termográfica (FLIR T-460; Teledyne FLIR, Wilsonville, Oregon, USA) e quando a temperatura de 45 °C nos testículos foi atingida, esta foi mantida por 15 minutos e em seguida o equipamento foi desligado.

Durante o tratamento, os animais receberam uma única aplicação de analgésico dipirona 25 mg/kg (Analges V®, Agener União Química, Brasil) e anti-inflamatório meloxicam 0,1 mg/kg (Flamavet®, Agener União Química, Brasil), ambos por via endovenosa.

5.4- Delineamento Experimental

O total de animais utilizados no experimento (N=20) foram divididos em duas fases:

Fase 1 – Avaliações de Curto prazo:

Os animais da Fase 1 (N= 11) passaram por orquiectomia em momentos diferentes em um curto prazo de tempo após o procedimento de MHT para avaliação histológica dos testículos e epidídimos, e foram divididos em 3 subgrupos: Grupo D7 (orquiectomia 7 dias após o procedimento, N=3); Grupo D24 (orquiectomia 24 dias após o procedimento - metade da espermatogênese, N=4), e Grupo D47 (orquiectomia 47 dias após o procedimento – espermatogênese completa, N=4). Um esquema das avaliações realizadas durante esta fase é mostrado na Figura 3.

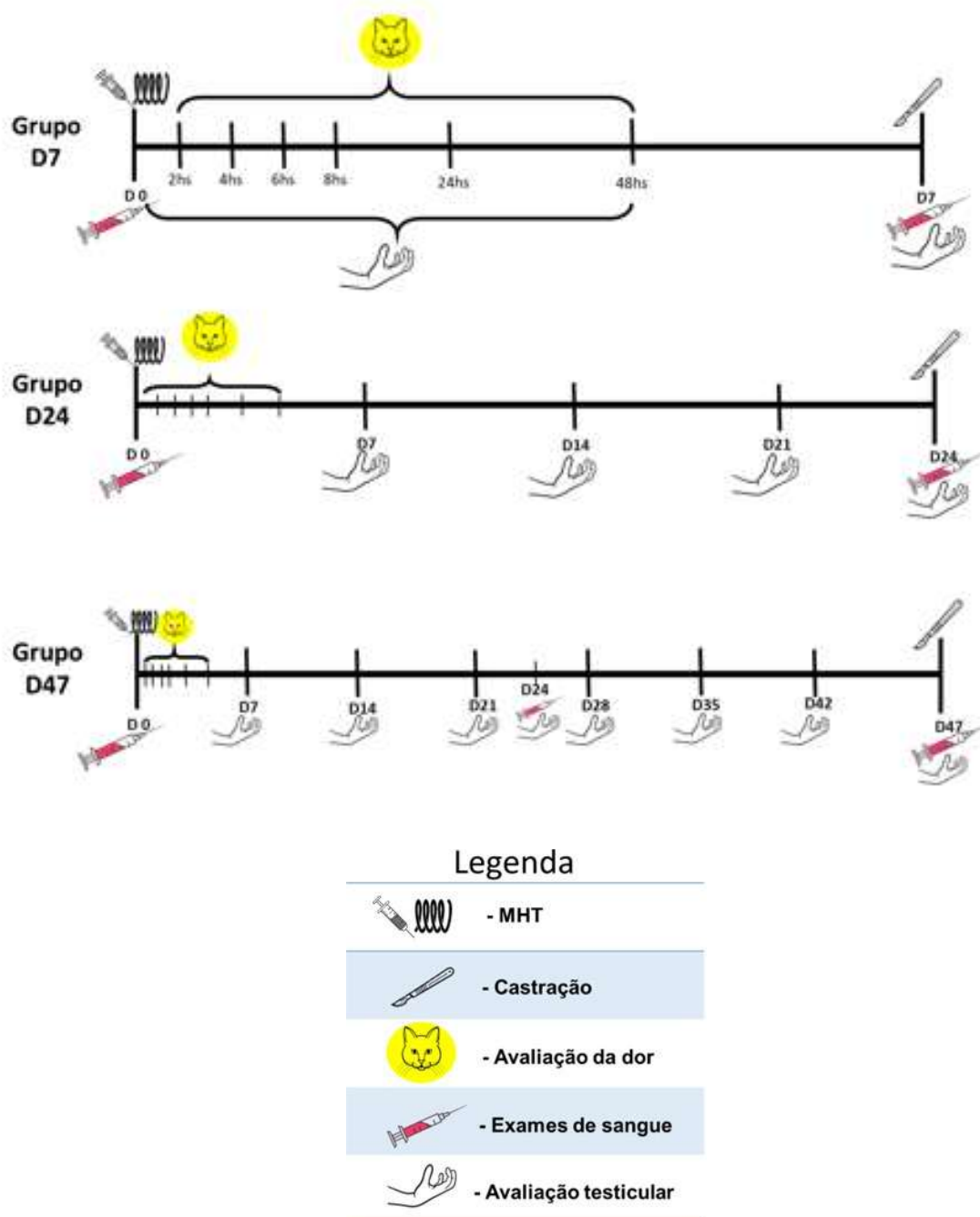


Figura 3: Delineamento experimental da Fase 1 – avaliações realizadas nos grupos de Curto prazo D7, D24 e D47.

Fase 2 – Avaliações de Longo Prazo:

Os animais da Fase 2 (N=9) passaram por orquiectomia em momento diferentes a longo prazo após o procedimento de MHT para avaliação histológica dos testículos e epidídimos e foram divididos em 3 subgrupos: Grupo D90 (orquiectomia 90 dias após o procedimento, N=2); Grupo D145 (orquiectomia 145 dias após o procedimento, N=3) e Grupo D180 (orquiectomia 180 dias após o procedimento, N=4). Um esquema das avaliações realizadas durante esta fase é mostrado na Figura 4.

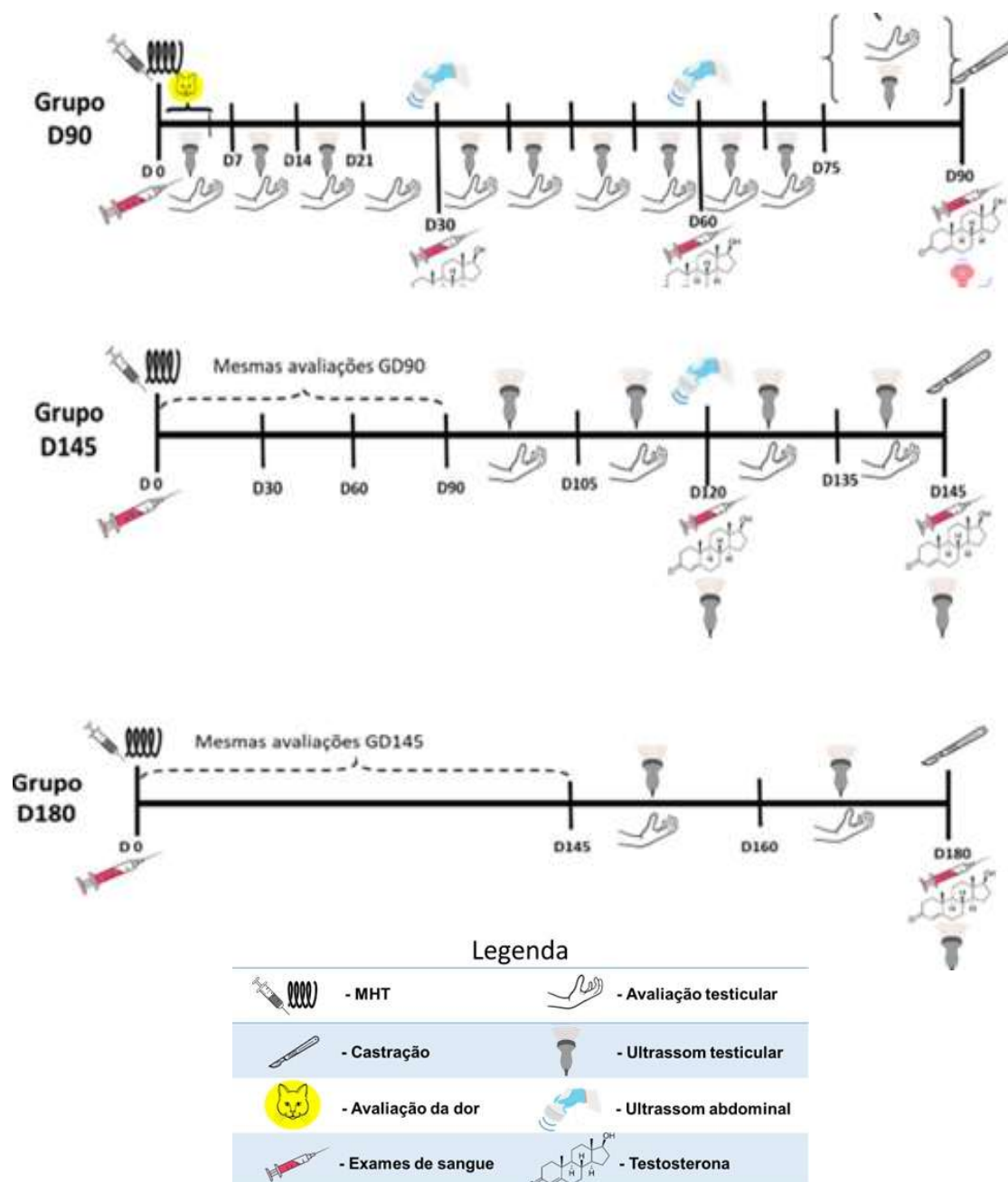


Figura 4: Delineamento experimental da Fase 2 – Avaliações realizadas nos grupos de longo prazo D90, D145 e D180.

5.5- Avaliações realizadas

- Avaliação de dor

Após o término do procedimento de MHT testicular e a recuperação anestésica, todos os 20 gatos (das Fases 1 e 2) foram avaliados quanto a manifestação de dor através das análises das expressões faciais contidas na *Feline Grimace Scale* (Evangelista et al., 2019). As avaliações foram realizadas a cada 2 horas durante as primeiras 8 horas pós-procedimento, depois com 24 e 48 horas, e aos sete dias. Ainda de acordo com a escala, foi preconizado que caso os animais apresentassem pontuação igual ou maior a 4 pontos na escala, o resgate analgésico seria realizado com aplicação de Cloridrato de Tramadol (2mg/kg) por via intramuscular.

- Avaliação testicular

A avaliação testicular dos animais foi realizada através da aferição da temperatura e análise visual e por palpação para observação da sensibilidade, consistência, mobilidade, edema, aparência e integridade da bolsa escrotal. Essas análises foram realizadas a cada 2 horas durante as primeiras 8 horas pós-procedimento, depois com 24 e 48 horas (término da avaliação da temperatura), aos sete dias, e depois semanalmente até o dia da orquiectomia na Fase 1.

Na Fase 2, a avaliação testicular foi realizada da mesma forma que a Fase 1 sete dias pós-procedimento e semanalmente até o 75º dia e após esse período quinzenalmente até o dia da orquiectomia.

Além da avaliação testicular citada anteriormente, os animais da Fase 2 passaram por ultrassonografia testicular (Mindray DP-6900Vet, China) bilateral semanalmente até o 75º dia pós procedimento e quinzenalmente após esse período até o dia da castração. Neste exame era avaliado o aspecto ultrassonográfico dos testículos e feitas medições do comprimento e largura testicular.

As medidas de comprimento e largura (cm) dos testículos avaliadas pelo exame de ultrassom testicular foram utilizadas para determinar seu volume. Para isso foi utilizada a média de duas equações matemáticas: a do cilindro $VOLC = [(LARG/2)^2 \times \Pi \times (COMP)]$; e a do prolato esferoide $VOLP = [4/3 \times \Pi \times (LARG/2)^2 \times (COMP/2)]$, conforme descrito por Louvandini et al. (2008).

- Avaliação hematológica

Os animais da Fase 1 passaram por no mínimo duas coletas de sangue, onde foi realizado hemograma completo e exames bioquímicos para função renal e hepática. A primeira coleta foi realizada no dia da MHT, antes da aplicação do tratamento, que foi considerado o D0. Para os grupos D7 e D24, a segunda coleta foi realizada no dia da castração desses animais, antes do procedimento. Para o grupo D47 houve três coletas: D0, D24 e D47.

Os animais da Fase 2 passaram por hemograma completo e exames bioquímicos mensais para avaliação do estado geral de saúde do animal. Sendo a primeira coleta realizada no dia da MHT (D0), antes da aplicação do tratamento e a última no dia da castração.

Foram avaliados na realização do hemograma os parâmetros hematológicos: hematócrito, número total de hemácias, hemoglobina, número total de leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos, plaquetas e proteína plasmática total.

A função renal e a função hepática foram avaliadas através dos valores séricos de creatinina, ureia, alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Os exames hematológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV-UnB). Para realização do hemograma foi utilizado o Analisador Hematológico Veterinário automático (Sysmex pocH – 110 iV Diff TM, Japan) além da contagem manual. Para os testes bioquímicos utilizou-se o analisador bioquímico (ChemWell-T, LabTest, Brasil).

Os valores do hemograma e dos testes bioquímicos obtidos para cada animal foram comparados com os parâmetros de normalidade para a espécie felina (MEYER & HARVEY, 2004) e relacionados entre os diferentes momentos pós-procedimento em cada animal.

Nos animais da Fase 2, também foi realizada a quantificação da testosterona sérica, utilizando o teste Testosterone Test System - EIA (USA-Diagnóstica, Brasil), em todos os momentos em que houve coleta de sangue.

- Ultrassonografia de abdômen

Os animais da Fase 2 passaram por ultrassonografia abdominal mensal após o procedimento de MHT para avaliação de topografia e aspecto de fígado, baço e rins. A ultrassonografia abdominal foi realizada por Médico Veterinário Especializado em exames ultrassonográficos com aparelho Mindray Z60 Vet (Shenzhen Mindray Animal Medical Technology Co., LTD., China), utilizando probe microconvexa com frequência de 5-8,5 MHz.

- Coleta de testículos e epidídimos e avaliações ex situ

No dia da castração (orquiectomia) todos os animais, receberam o mesmo protocolo anestésico e analgésico realizado no dia do procedimento de MHT. Os testículos foram medidos (comprimento e largura) dentro da bolsa escrotal com o auxílio de um paquímetro antes da remoção cirúrgica e após serem retirados na orquiectomia foram novamente medidos, pesados e fixados para posterior análise histopatológica.

Os epidídimos foram separados dos testículos, medidos e pesados. A cauda dos epidídimos foi macerada em 1 mL de solução fisiológica aquecida para observação de presença e motilidade dos espermatozoides, em seguida o restante da suspensão foi fixada em 1ml de formalina 10% (Dinâmica, Brasil) para avaliação morfológica dos espermatozoides e concentração espermática. A cabeça e corpo dos epidídimos foram fixados para análise histopatológica.

Para a análise histopatológica os testículos e epidídimos foram fixados em solução de Bouin por 24 horas, lavados em álcool 50% (5 banhos de uma hora) e armazenadas em álcool 70% até o dia do processamento. As amostras foram então desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica (Dinâmica, Brasil). Foram feitos cortes com espessura de 5µm de diferentes regiões dos testículos (cranial, média e caudal), os quais foram montados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse Ci-S, Japão) e fotografadas no microscópio de luz (EVOS TM FL Auto Imaging System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Nos testículos foram avaliadas: a estrutura geral do órgão, organização dos túbulos seminíferos, presença de células da linhagem germinativa, células de Sertoli, presença de espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos, integridade da lâmina basal, presença de células de Leydig, bem como quaisquer alterações no parênquima e estroma testicular.

Nos epidídimos foi avaliada a estrutura dos túbulos epididimários, seu epitélio de revestimento, presença de espermatozoides no lúmen, quaisquer alterações do estroma do órgão. A estrutura histológica dos testículos e epidídimos dos animais submetidos à MHT testicular foi comparada à de testículos e epidídimos de gatos de idade semelhante obtidos após orquiectomia eletiva (considerados como um grupo controle, N=4).

5.6. Análise Estatística

Os pesos testiculares absolutos e relativos e os volumes testiculares obtidos pelas avaliações com paquímetro e ultrassonografia testicular foram testados para normalidade com o teste Shapiro-Wilk. Os dados avaliados foram comparados entre os grupos experimentais pela análise de variância (ANOVA) e teste de médias (Tukey) utilizando o programa estatístico GraphPad prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS

Durante o procedimento de magneto-hipertermia, não houve nenhum tipo de intercorrência. A anestesia geral com isoflurano em sistema aberto (Baraka) foi realizada para que o animal se mantivesse totalmente imóvel durante a aplicação do fluido magnético intratesticular e do campo magnético. Porém, o animal foi mantido em anestesia superficial com parâmetros vitais estáveis: frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão arterial e temperatura; e não houve necessidade de resgate anestésico. A recuperação pós-anestésica foi considerada tranquila.

‘Após a aplicação do fluido magnético testicular e o posicionamento do animal, o aparelho de magnetohipertermia foi ligado com uma amperagem inicial média de $260 \pm 45,9$ mA. Acionada a amperagem, a temperatura testicular aumentava gradativamente, ultrapassando os 40°C , e o tratamento demorou um tempo médio de $6'40'' \pm 3'26''$ para iniciar. O tratamento se iniciou com a marcação dos 15 minutos e os dados médios de temperatura foram de $43,1 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ para o início da contagem e a maior temperatura atingida foi de $45,4 \pm 2,4^{\circ}\text{C}$ nos 40 testículos avaliados. Após desligado o campo magnético a temperatura caía gradativamente e chegava a 35°C em 4,6 minutos em média (Figura 5A e 5B).

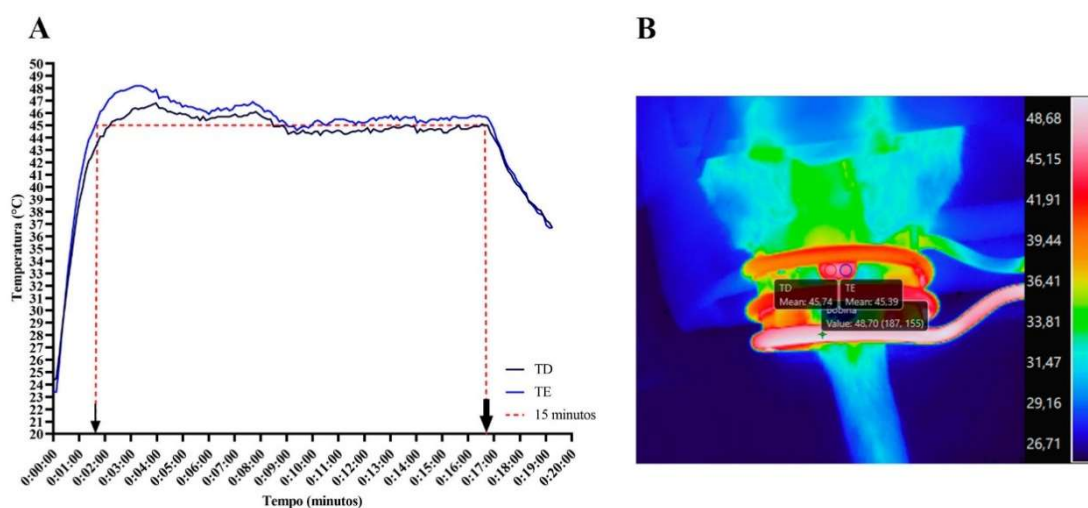


FIGURA 5. A) Gráfico ilustrativo demonstrando o aumento gradativo da temperatura testicular após o início da magneto-hipertermia (Tempo 0:00:00) até próximo de 45°C , sua manutenção durante 15 minutos (retângulo pontilhado) e o resfriamento após desligado o campo magnético (seta) com monitoramento até retorno à temperatura corporal. B) Imagem de câmera termográfica de um animal durante o procedimento de magneto-hipertermia testicular mostrando o aquecimento seletivo da região dos testículos (região marcada com círculos). Coluna à direita da figura indica o espectro de cores relacionado às temperaturas medidas.

Após a recuperação anestésica, nenhum dos 20 animais demonstrou dor nas avaliações até 24h, e a pontuação máxima obtida na escala das expressões faciais pela *Feline Grimace Scale* (FGS - Evangelista et al., 2019) foi de 2/10 observada em 8 animais. A média dos escores obtidos nos diferentes tempos de observação são mostrados na Tabela 1. Nenhum animal alcançou a pontuação exigida pela escala para necessidade de resgate analgésico (pontuação de corte ≥ 4 pontos). Após 24 horas de avaliação, todas as unidades de ação estavam ausentes (pontuação 0) em todos os animais e continuaram assim até o dia da castração.

Tabela 1: Número e porcentagem de animais que apresentaram pontuação na escala de dor *Feline Grimace Scale* (FGS) e médias ($\pm$ DP) da pontuação obtida na avaliação de dor de todos os animais (N=20) nos diferentes tempos de avaliação.

Tempo pós-MHT	Animais que pontuaram	Pontuação média de todos os animais
2 horas	11 (55%)	1,00 $\pm$ 0,73
4 horas	11 (55%)	1,00 $\pm$ 0,85
8 horas	7 (39%)	0,40 $\pm$ 0,64
24 horas	3 (15%)	0,15 $\pm$ 0,37
48 horas	2 (10%)	0,15 $\pm$ 0,48
7 dias	0 (0%)	0 $\pm$ 0

Na avaliação da temperatura testicular no período pós-MHT, considerando um total de 40 testículos, a temperatura média foi de $36,0 \pm 0,36$ °C. A temperatura mínima registrada foi de 35,2 °C, dentro dos valores normais, enquanto a máxima foi de 37,6 °C, observada na avaliação de 24 horas, sendo atribuída a um processo inflamatório leve e localizado.

No que diz respeito a avaliação dos parâmetros por observação macroscópica e palpação testicular, a sensibilidade testicular aumentada estava presente em 65% (26/40) dos testículos nas primeiras 2 horas pós-procedimento e em 5% (2/40) após 7 dias. Após esse período a sensibilidade testicular foi normalizada. A sensibilidade testicular está relacionada a processo inflamatório local, possivelmente vinculado ao procedimento.

Análises da consistência testicular ao longo do tempo revelaram alterações significativas nos diferentes momentos avaliados. Uma maior porcentagem de testículos com consistência firme foi observada nas primeiras 24 horas após a intervenção, e avaliações realizadas após 14 dias evidenciaram a presença de flacidez testicular. Na

tabela 2 encontram-se os momentos específicos em que foram registradas alterações de consistência. Durante todo o período de observação após o procedimento, a maioria dos testículos apresentava consistência normal (fibroelástica). Às 24h foi possível notar um maior percentual de testículos com consistência firme (57,5% - 23/40) em relação aos demais momentos de avaliação. Testículos com consistência flácida só foram observados a partir de 14 dias após o procedimento.

Tabela 2: Consistência testicular nos momentos de avaliação pós-MHT testicular.

Tempo	N (Testículos)	Normal (%)	Firme (%)	Flácido (%)
2/4/8 horas	40	50	50	0
24 horas	40	42,5	57,5	0
48 horas	40	60	40	0
7 dias	40	75	25	0
14 dias	34	85,7	11,7	2,5
21 dias	34	79,4	11,7	8,8
28/35 dias	26	80,7	7,7	11,5
42 dias	26	69,2	7,7	23,0
49 dias	18	72,2	0	27,7
56/63/77/90 dias	18	83,3	0	16,6
105/120/135/145 dias	14	78,5	0	21,4
160/180 dias	8	62,5	0	37,5

Em relação a integridade da bolsa escrotal, 4 animais apresentaram erosões milimétricas (Figura 6A), provavelmente por lambedura, que surgiram entre 8 e 24 horas pós MHT. Em 3 animais, a lesão sumiu em 24 horas e apenas em um animal a lesão persistiu, mas foi totalmente cicatrizada até o 14º dia sem nenhum tipo de tratamento específico e nem utilização de colar elizabetano. Eritema da bolsa escrotal (Figura 6B) foi encontrado em 85% (34/40) dos testículos avaliados nas primeiras 4 horas e a partir da avaliação de 7 dias essa alteração não foi mais encontrada nos 40 testículos avaliados.

A presença de edema foi observada em 15% (6/40) dos testículos avaliados nas primeiras 48 horas após a intervenção, enquanto aos 14 dias essa alteração foi reduzida para 2,95% (1/34) (Figura 6C). Após esse período, não houve registro de edema até o momento da castração. Quanto à mobilidade testicular, mais de 95% dos testículos analisados estavam sem aderências durante as avaliações. Nos 5% dos casos com redução de mobilidade, essa alteração foi associada à presença de edema em três animais, uma vez que não foi mais identificada na avaliação realizada no 21º dia. Apenas um animal do

grupo D47 manteve a redução da mobilidade em um dos testículos até o momento da castração, devido a um aumento de volume do testículo.



FIGURA 6. A) Testículos apresentando erosão milimétrica bilateral 12 horas após o procedimento; B) Eritema de bolsa escrotal 4 horas após o procedimento; C) Edema testicular esquerdo em um gato do grupo D47 aos 14 dias após o procedimento.

Em relação à avaliação hematológica e bioquímica sérica dos animais nenhum animal apresentou alteração relevante nos resultados dos exames sanguíneos que indicassem disfunção hematológica, lesão renal ou hepática associada ao tratamento com MHT. Esse resultado é corroborado com os exames físicos realizados e a saúde geral dos animais, que se manteve em condições satisfatórias durante todas as fases do experimento. A média ($\pm$ DP) dos parâmetros hematológicos e bioquímicos estão respectivamente demonstrados nas Tabelas 3 e 4 para a fase 1, e Tabelas 5 e 6 para a fase 2.

Na análise individual dos parâmetros bioquímicos, nenhum dos animais apresentou alterações nos níveis séricos de ureia e creatinina, indicando manutenção da função renal ao longo do tratamento. Quanto aos marcadores hepáticos, seis animais apresentavam elevações leves da fosfatase alcalina já antes da intervenção, sem alterações significativas durante o experimento. A elevação dessa enzima, nesses casos, não parece estar associada a comprometimento hepático, uma vez que os animais não apresentaram sinais clínicos compatíveis com disfunção hepática, como inapetência, perda de peso, diarreia, vômitos ou icterícia.

O exame ultrassonográfico abdominal realizado nos animais da Fase 2, mostrou que fígado, rins e baço apresentaram topografia e ecogenicidade normais. Os animais durante todo o experimento mantiveram o peso conforme o esperado para o período. A média do peso dos animais no dia da MHT na fase de curto prazo foi de $3,46 \pm 0,83$ kg e

no dia da castração foi de $3,58 \pm 0,82\text{kg}$ e na fase de longo prazo foi de $3,65 \pm 0,25\text{kg}$ e $4,07 \pm 0,28\text{kg}$ nos mesmos momentos.

Tabela 3: Hemograma (média $\pm$ DP) de todos os animais tratados com magneto-hipertermia testicular na Fase 1

	D0 (N=11)	D7 (N=3)	D24 (N=4)	D4 (N=4)	Valores de referência *
Hematócrito (%)	$31 \pm 3,2$	$27 \pm 2,5$	$33 \pm 8,5$	$33 \pm 1,5$	24 a 45
Hemoglobina(g/dL)	$11 \pm 1,5$	$9,8 \pm 0,7$	$11 \pm 2,5$	$12 \pm 1,3$	5 a 10
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$8 \pm 1,0$	$7,7 \pm 0,6$	$8,7 \pm 1,9$	$6,6 \pm 3,4$	8 a 15
Leucócitos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$14 \pm 8,1$	$14 \pm 7,5$	$15 \pm 5,6$	$13 \pm 4,2$	5,5 a 19,5
Bastonetes(/ μL)	$30,7 \pm 92,3$	0 ± 0	65 ± 183	0 ± 0	0 a 300
Segmentados($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$10,2 \pm 5,12$	$9,10 \pm 3,65$	$9,89 \pm 4,4$	$8,34 \pm 4,1$	2,5a 12,5
Linfócitos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$3,2 \pm 2,7$	$3,4 \pm 0,9$	$3,9 \pm 1,0$	$2,9 \pm 3,7$	1,5 a 7,0
Monócitos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$0,15 \pm 0,17$	$0,28 \pm 0,25$	$0,20 \pm 0,31$	$0,26 \pm 0,46$	0 a 0,85
Eosinófilos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$1,4 \pm 1,4$	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,4$	0 a 1,5
Plaquetas($\times 10^3/\mu\text{L}$)	324 ± 112	281 ± 128	313 ± 156	340 ± 654	200 a 800

* Valores de referência para gatos em ambas as tabelas (MEYER & HARVEY, 2004).

Tabela 4: Bioquímicos (média $\pm$ DP) de todos os animais tratados com magneto-hipertermia testicular na Fase 1

	D0 (N=11)	D7 (N=3)	D24 (N=8)	D47 (N=4)	Valores de referência *
Ureia (mg/dL)	46 ± 10	$54 \pm 6,5$	$57 \pm 3,7$	$55 \pm 8,5$	43 a 64
Creatinina (mg/dL)	$1,0 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1$	0,8 a 1,8
ALT (UI/L)	69 ± 40	54 ± 24	74 ± 45	82 ± 28	6 a 83
FA (UI/L)	198 ± 137	187 ± 86	125 ± 114	70 ± 49	25 a 93
PPT (g/dL)	$6,6 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,6$	$6,9 \pm 0,6$	6 a 8

* Valores de referência para gatos em ambas as tabelas (MEYER & HARVEY, 2004).

ALT – Alanina aminotransferase; FA – Fosfatase Alcalina; PPT – Proteína Total

Tabela 5: Hemograma (média $\pm$ DP) de todos os animais tratados com magneto-hipertermia testicular na Fase 2

	D0 (N=9)	D30 (N=9)	D60 (N=9)	D90 (N=9)	D120 (N=7)	D145 (N=7)	D180 (N=4)	Valores de referência a *
Hematócrito (%)	34 $\pm$ 3,2	34 $\pm$ 5,5	36 $\pm$ 2,6	42 $\pm$ 5,2	40 $\pm$ 3,4	38 $\pm$ 3,9	35 $\pm$ 3,1	24 a 45
Hemoglobina (g/dL)	8,2 $\pm$ 0,8	8,2 $\pm$ 1,1	10,5 $\pm$ 6,6	9,5 $\pm$ 1	9,1 $\pm$ 1,2	8,6 $\pm$ 1,1	8,2 $\pm$ 1,2	5 a 10
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	11 $\pm$ 1,1	11 $\pm$ 1,9	11 $\pm$ 0,9	13 $\pm$ 1,5	13,2 $\pm$ 1,2	12,7 $\pm$ 1,2	11,5 $\pm$ 2,0	8 a 15
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	12 $\pm$ 8,2	12 $\pm$ 3,6	15 $\pm$ 3,6	15 $\pm$ 3,8	14 $\pm$ 3,5	14 $\pm$ 1,6	12 $\pm$ 2,0	5,5 a 19,5
Bastonetes ($/\mu\text{L}$)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	23 $\pm$ 46	0 a 300
Segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,2 $\pm$ 3,5	5,4 $\pm$ 1,8	6,1 $\pm$ 2,3	6,2 $\pm$ 2,6	5,8 $\pm$ 3,3	5,8 $\pm$ 2,0	6,0 $\pm$ 1,0	2,5 a 12,5
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,3 $\pm$ 4,0	5,2 $\pm$ 3,3	7,5 $\pm$ 2,6	6,9 $\pm$ 1	7,2 $\pm$ 1,4	6,9 $\pm$ 1,8	5,1 $\pm$ 1,0	1,5 a 7,0
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0 a 0,85
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,0 $\pm$ 0,5	0,83 $\pm$ 0,4	0,96 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 1,2	0,8 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,2	0 a 1,5
Plaquetas ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	310 $\pm$ 70	292 $\pm$ 55	327 $\pm$ 82	355 $\pm$ 116	335 $\pm$ 47	260 $\pm$ 37	272 $\pm$ 89	200 a 800

* Valores de referência para gatos em ambas as tabelas (MEYER & HARVEY, 2004).

Tabela 6: Bioquímicos (média $\pm$ DP) de todos os animais tratados com magneto-hipertermia testicular na Fase 2

	D0 (N=9)	D30 (N=9)	D60 (N=9)	D90 (N=9)	D120 (N=7)	D145 (N=7)	D180 (N=4)	Valores de referência*
Ureia (mg/dL)	58 $\pm$ 25	53 $\pm$ 13	61 $\pm$ 18	52 $\pm$ 5,6	48 $\pm$ 13	53 $\pm$ 8,7	51 $\pm$ 8,8	43 a 65
Creatinina (mg/dL)	1,2 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,4	0,8 a 1,8
ALT (UI/L)	38 $\pm$ 6	35 $\pm$ 7,6	35 $\pm$ 6	40 $\pm$ 5,7	37 $\pm$ 11	40 $\pm$ 12	35 $\pm$ 6,7	6 a 83
FA (UI/L)	110 $\pm$ 84	70 $\pm$ 0,4	68 $\pm$ 46	67 $\pm$ 43	65 $\pm$ 40	55 $\pm$ 35	75 $\pm$ 54	25 a 93
PPT (g/dL)	7,2 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,7	7,7 $\pm$ 0,3	8,2 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,4	7,6 $\pm$ 0,8	7,4 $\pm$ 0,5	6 a 8

* Valores de referência para gatos em ambas as tabelas (MEYER & HARVEY, 2004).

ALT – Alanina aminotransferase; FA – Fosfatase Alcalina; PPT – Proteína Total

Após a castração, na análise do lavado epididimário, dos 11 animais castrados até 47 dias pós-MHT, os lavados de todos os epidídimos estavam azoospermicos. Dos 9 animais castrados a partir dos 90 dias pós-MHT os 2 epidídimos de um gato do D90 continham apenas espermatozoides mortos; dos 3 animais castrados aos 145 dias, os lavados de 5 epidídimos estavam azoospermicos e 1 apresentou espermatozoides e dos 4 castrados aos 180 dias, 3 epidídimos não puderam ser separados dos testículos devido a aderências, e dos 5 epidídimos lavados, 3 mostraram azoospermia e 2 tinham espermatozoides. No grupo controle foi observada a presença de espermatozoides viáveis em todos os testículos avaliados (Tabela 7).

TABELA 7. Avaliação do lavado da cauda do epidídimo dos gatos Controle e submetidos à MHT testicular e castrados a partir de 90 dias pós-tratamento.

Grupo	Animal	Epidídimo	Classificação e Concentração (espermatozoides x 10 ⁶ /mL)		Motilidade espermática
Controle	Gato 1	D	normospermia	80	100%
		E	normospermia	80	100%
	Gato 2	D	normospermia	122,5	100%
		E	normospermia	32,5	100%
D90	Gato 1	D	azoospermia		-
		E	azoospermia		-
	Gato 2	D	oligospermia		0%
		E	oligospermia		0%
D145	Gato 1	D	azoospermia		-
		E	azoospermia		-
	Gato 2	D	oligospermia	0,08	100%
		E	azoospermia		-
	Gato 3	D	azoospermia		-
		E	azoospermia		-
D180	Gato 1	D	azoospermia		-
		E	não foi feito *		-
	Gato 2	D	oligospermia	0,35	80%
		E	azoospermia		-
	Gato 3	D	azoospermia		-
		E	oligospermia	0,15	100%
	Gato 4	D	não foi feito *		-
		E	não foi feito *		-

* Epidídimo muito aderido ao testículo, não pôde ser separado

Normospermia: concentração normal de espermatozoides (valor normal em lavado epididimário para gatos domésticos: 77,9-127 x10⁶/mL, de acordo com Hay and Goodrowe, 1993)

Azoospermia: ausência de espermatozoides

Oligospermia: baixa concentração de espermatozoides

Em relação à avaliação do peso testicular após a orquiectomia (Figura 7), o peso testicular absoluto e relativo do grupo 180 dias foi significativamente ($P<0,05$) menor quando comparado ao grupo controle.

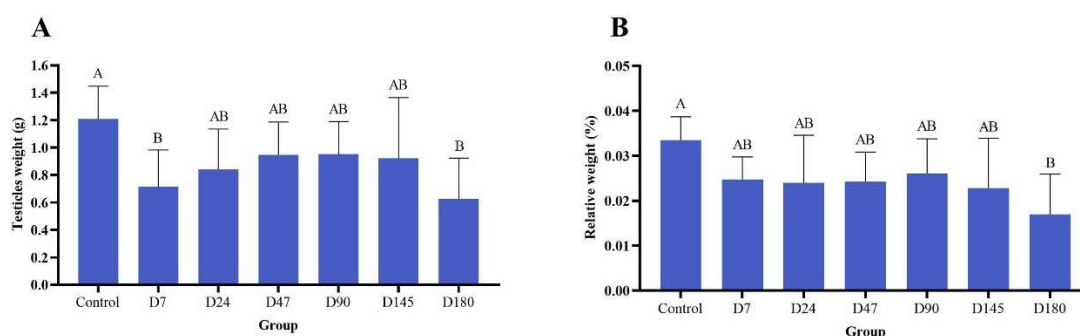


Figura 7. Peso absoluto (A) e relativo (B) dos testículos extraídos dos gatos submetidos a magneto-hipertermia testicular nos diferentes dias pós-procedimento.

A,B: Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P<0,05$) * $P=0,06$; ** $P=0,09$

O volume testicular foi avaliado através das medidas dos testículos no dia da magneto-hipertermia e no dia da castração, ainda dentro da bolsa escrotal e fora da bolsa escrotal (Figura 8). No grupo D7 houve um aumento significativo ($P<0,05$) no volume testicular do dia da MHT para o dia da castração na medida dentro da bolsa escrotal, porém sem diferença quando o testículo foi medido fora da bolsa escrotal, sugerindo aumento de volume das estruturas peritesticulares nos primeiros 7 dias pós-MHT. Essa alteração não foi observada nos outros grupos, onde só foi observada diferença estatística quando comparados o volume dentro e fora da bolsa escrotal no dia da castração.

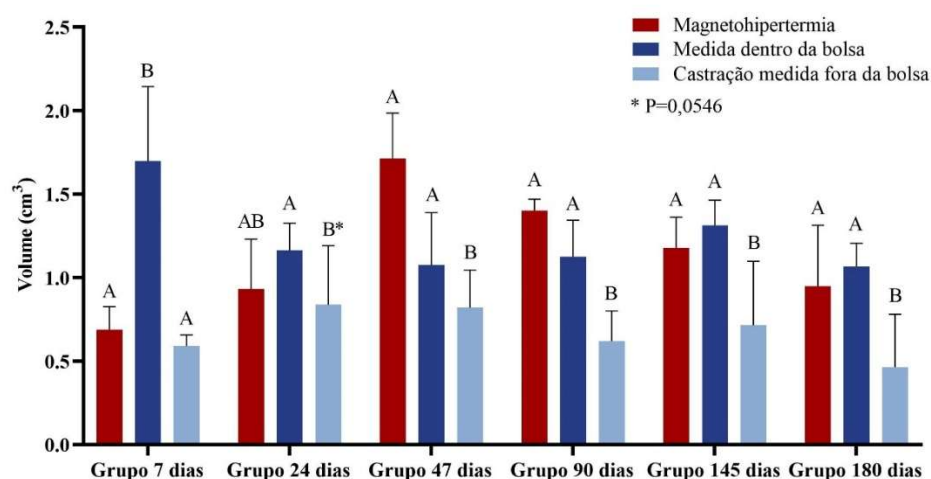


Figura 8. Volume testicular calculado a partir das medidas feitas com paquímetro imediatamente antes do procedimento de magnetohipertermia testicular (barras vermelhas) e no dia da orquiectomia, tanto antes da remoção, dentro da bolsa escrotal (barras azul-escuras) como após a remoção (barras azul-claras).

A,B: Letras diferentes indicam diferença estatística dentro de cada grupo ($P<0,05$).

O volume testicular calculado a partir das medições realizadas por ultrassonografia testicular (Figura 9) nos animais da fase longo prazo, apresentou um aumento significativo ($P < 0,0001$) 7 dias pós-MHT, com posterior redução para volume semelhante ao dia da MHT na segunda semana. Após esse período, foi observada uma diminuição sutil e gradual (não significativa estatisticamente). Este aumento se acentuou na semana 26, culminando com uma drástica redução no volume testicular, que apresentou diferença estatística em relação ao volume inicial e às outras semanas ($P < 0,01$).

A avaliação ultrassonográfica mostrou testículos elipsoides com ecogenicidade discreta e mediastino bem visível antes do procedimento de MHT (Figura 10A). Após 7 dias, os testículos no geral se apresentavam arredondados, aumentados de volume e com ecogenicidade grosseira e heterogênea (Figura 10B). Já aos 180 dias, os testículos se apresentavam diminuídos de tamanho, hipoecoicos e sem contornos definidos (Figura 10C).

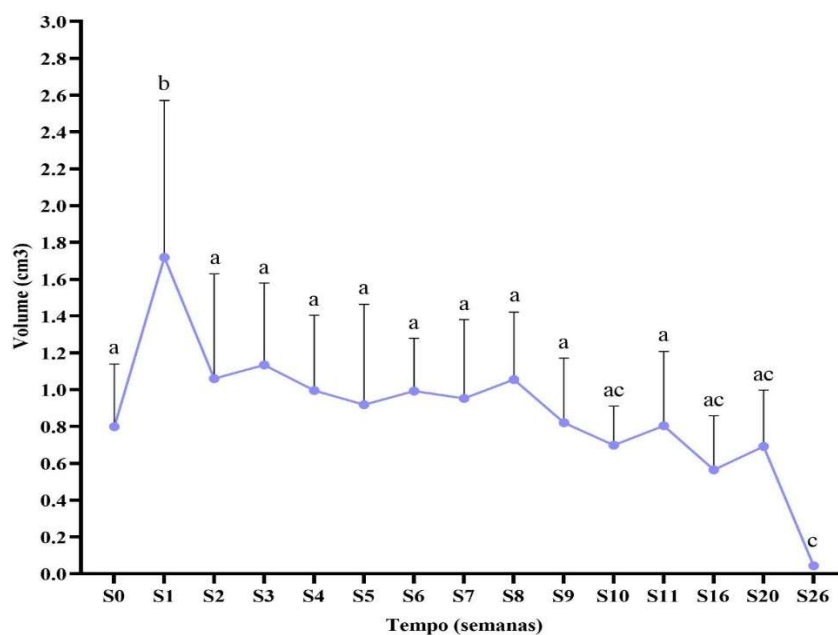


Figura 9. Volume testicular obtido pela avaliação ultrassonográfica semanal dos animais da fase 2 (estudo de longo prazo).

a,b,c: Letras diferentes indicam diferença estatística entre as semanas ($P < 0,01$).

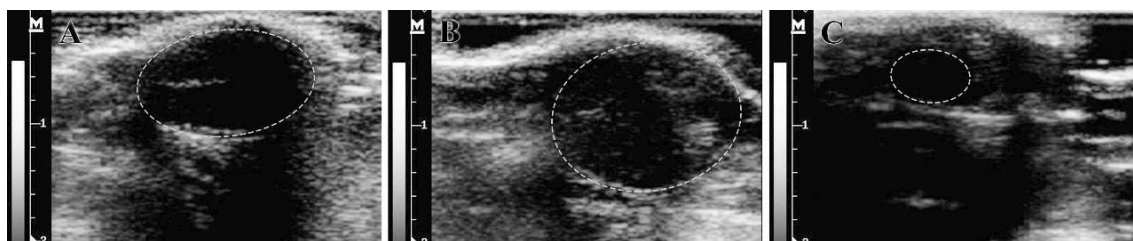


Figura 10. Aparência ultrassonográfica de testículos dos animais da fase 2 (estudo de longo prazo): A) testículo antes do procedimento de MHT, com formato elipsoide e ecogenicidade homogênea. O mediastino é visível. B) Testículo aumentado 7 dias pós-MHT, com formato arredondado e ecogenicidade irregular. C) Testículo 180 dias pós-MHT, diminuído de tamanho e hipoeicoico.

Na análise histológica, avaliando os testículos dos animais utilizados como controle, foi possível visualizar a estrutura intacta dos túbulos seminíferos, delimitados por lâmina basal e com epitélio seminífero contendo células de Sertoli, células da linhagem germinativa, e espermatozoides no lúmen de alguns túbulos seminíferos. O interstício testicular é discreto e podem ser identificados grupos de células de Leydig, além de pequenos vasos. Nos epidídimos, é possível observar os túbulos epididimários com lâmina basal preservada e com seu revestimento pseudoestratificado mantido com a presença de estereocílios e espermatozoides no lúmen (Figura 11).

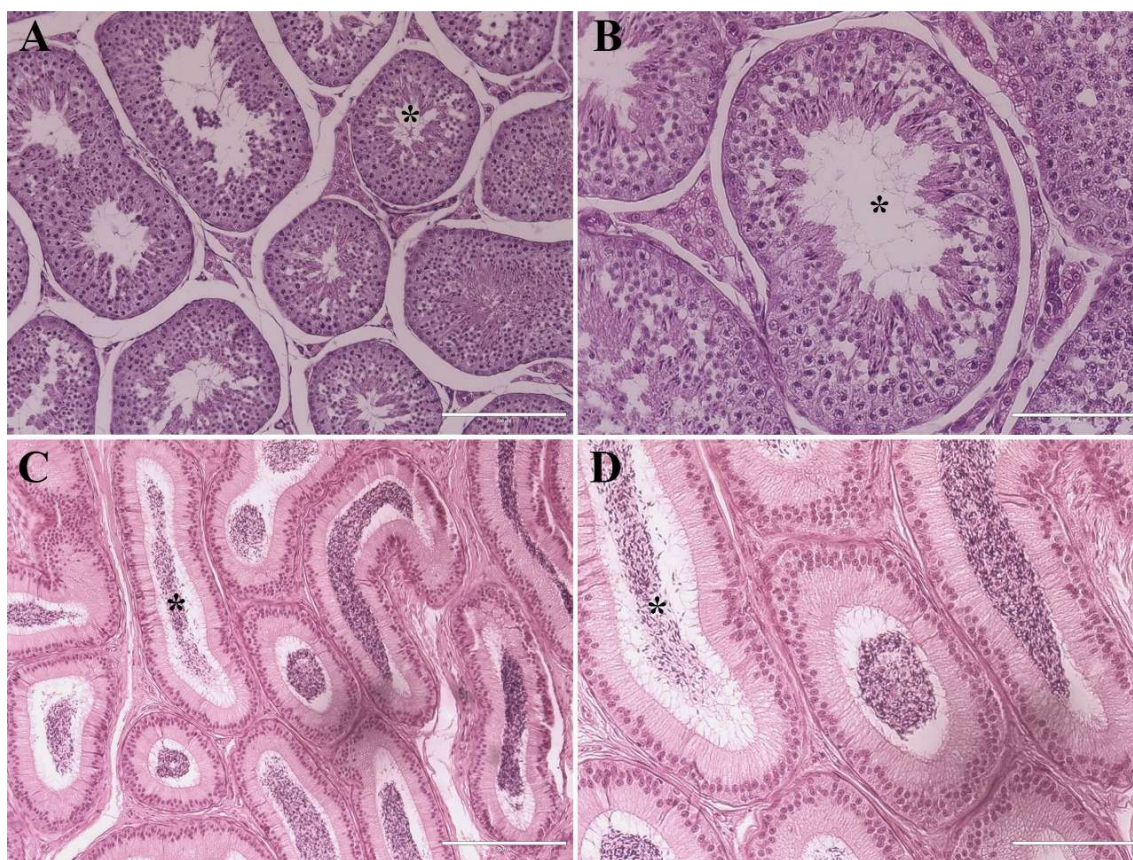


Figura 11: Fotomicrografia de testículos e epidídimos de animais do grupo controle. A: Visão dos túbulos seminíferos apresentando estrutura intacta e epitélio germinativo organizado. Barra = 200 μ m. B: Células germinativas identificadas em um túbulo seminífero com espermatozoides em seu interior (*). Barra = 100 μ m. C: Túbulos epididimários preservados com espermatozoides em seu interior (*). Barra = 200 μ m. D: Túbulo epididimário com revestimento pseudoestratificado cilíndrico ciliado preservado e espermatozoides em seu interior (*). Barra = 100 μ m.

Na avaliação histológica dos testículos de todos os animais dos grupos tratados (D7, D24 e D47) da Fase 1, foi possível identificar lesões importantes na arquitetura dos túbulos seminíferos e epidídimos.

O grupo MHT-D7 (Figura 12) apresentou alguns túbulos seminíferos degenerados, apresentando necrose coagulativa, com lâmina basal delgada ou rompida. Material amarronzado, sugestivo de aglomerados de nanopartículas, era visível no espaço intersticial, mais no centro dos testículos. Nos túbulos seminíferos degenerados, é possível observar células gigantes, vacuolização, algumas espermatogônias e células de Sertoli. Em sua luz há a presença de descamação celular e ausência de espermatozoides. Nos epidídimos é possível observar a presença de infiltrado linfocitário no interstício e ausência de espermatozoides no lúmen epididimário com a presença de células germinativas descamadas na sua luz.

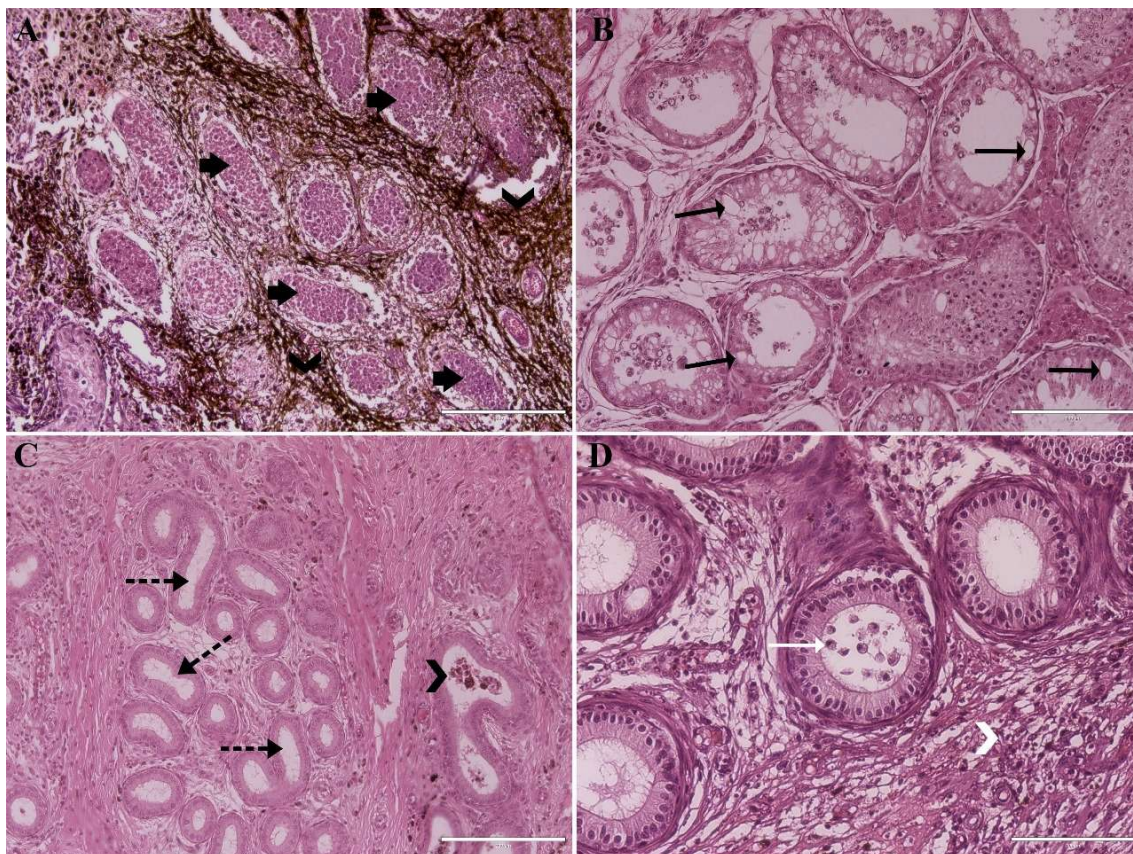


Figura 12: Imagens representativas de testículos e epidídimos de animais do grupo D7. A: Túbulos seminíferos danificados apresentando necrose coagulativa (seta preta grossa) e material amarronzado, sugestivo de aglomerados de nanopartículas, em seu interstício (cabeça de seta preta). Barra = 200 μ m. B: Vacuolização em epitélio seminífero (seta preta fina). Também é possível ver células descamadas na luz dos túbulos seminíferos. Barra = 200 μ m. C: Túbulos epididimários com ausência de espermatozoides na luz (seta preta pontilhada) e células de descamação na luz de um túbulo (cabeça de seta preta). Barra = 200 μ m. D: Descamação celular no interior de túbulo epididimário (seta branca). Infiltrado linfocitário no interstício epididimário (cabeça de seta branca). Barra = 100 μ m.

No grupo tratado D24 (Figura 13), os túbulos seminíferos ainda podem ser identificados, porém apresentam deformação e perda de limitação de sua membrana basal e o epitélio seminífero está descaracterizado e delgado. Dentro do lúmen de alguns túbulos seminíferos é possível observar a presença de células da linhagem germinativa, provenientes da descamação do epitélio seminífero, e total ausência de espermatozoides. Alguns túbulos seminíferos apresentavam células gigantes, vacuolização, algumas espermatogônias e células de Sertoli em seu epitélio. Foi notada a presença aglomerados de nanopartículas no interstício do tecido testicular. Nos epidídimos é possível observar infiltrado inflamatório acentuado no interstício com diminuição da quantidade de túbulos epididimários. Túbulos epididimários apresentando rarefação dos cílios e lúmen caracterizado por ausência de espermatozoides e presença de células provenientes da descamação do epitélio seminífero e epididimal.

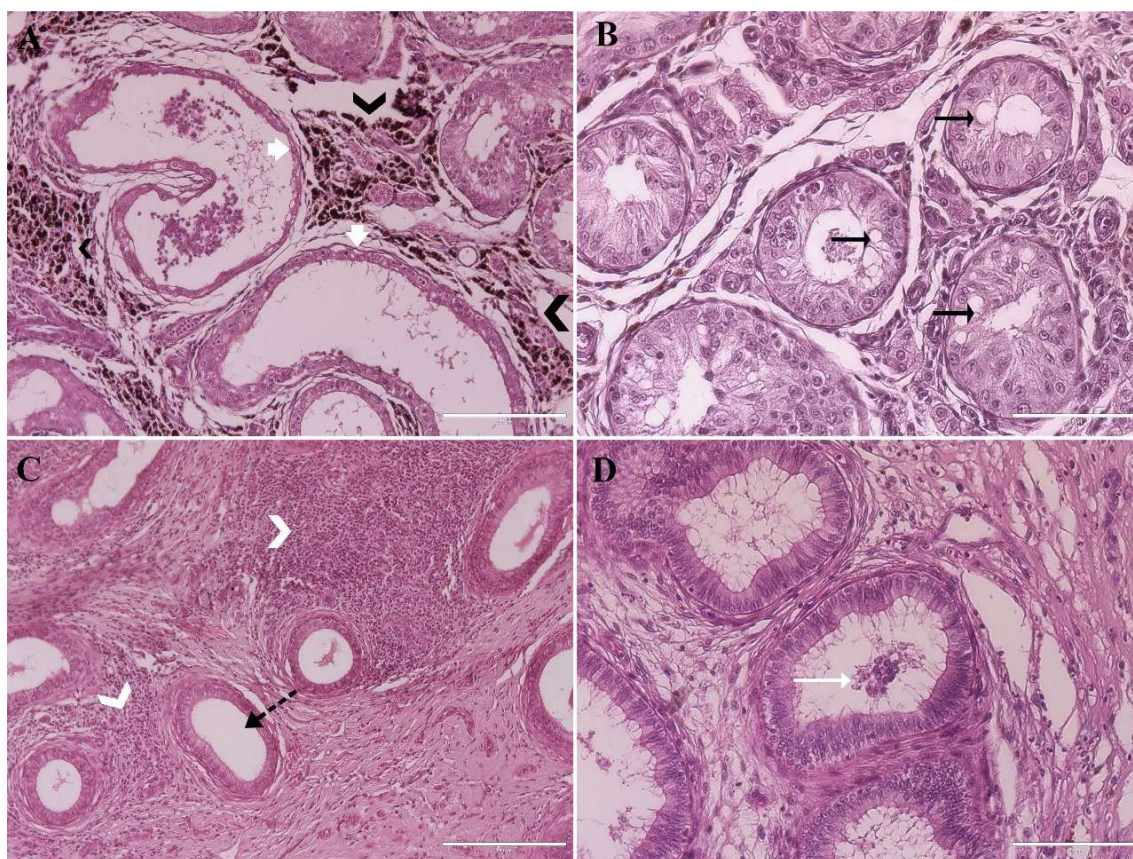


Figura 13: Micrografia de testículos e epidídimos de animais do grupo D24. A: Visão dos túbulos seminíferos apresentando perda de definição e descaracterização do epitélio seminífero (seta branca) e células de descamação em seu lúmen. Material sugestivo de aglomerado de nanopartículas no interstício testicular (cabeça de seta preta). Barra = 200µm. B: Vacuolização em túbulos seminíferos (seta preta). Barra = 100 µm. C: Infiltrado linfocitário no interstício epididimário (cabeça de seta branca) e ausência de espermatozoides no interior do túbulo epididimário (seta preta pontilhada). Barra = 200 µm. D: Túbulos epididimários com diminuição de cílios e descamação celular em seu lúmen (seta branca). Barra = 100 µm.

No grupo D47 (Figura 14), os danos nos túbulos seminíferos estavam presentes em graus diferenciados. Houve descaracterização do epitélio dos túbulos seminíferos, com ausência de células germinativas, presença de vacuolização e descamação celular intraluminal, com ausência de espermatozoides. No entanto, ainda é possível identificar células da linhagem germinativa presentes em alguns túbulos da maioria dos testículos avaliados neste grupo. No interstício é possível identificar a presença de aglomerados sugestivos de nanopartículas mais na periferia do testículo, e no centro é possível observar aumento das células de Leydig no espaço intersticial. Na avaliação histológica dos epidídimos é possível observar que a estrutura dos túbulos está preservada em sua grande maioria, e em seu lúmen não é possível visualizar espermatozoides e alguns apresentam descamação celular.

Nos animais avaliados por mais longo prazo foi possível observar que a presença de material sugestivo de nanopartículas não foi homogênea em todo o órgão. As alterações histopatológicas nos testículos se apresentaram diferenciadas dependendo da presença, quantidade e proximidade com o material sugestivo de nanopartículas (Figura 15A-D). Onde há o depósito de uma grande quantidade deste material foi possível observar a presença de necrose coagulativa (Figura 15A), degeneração total de epitélio seminífero, podendo apresentar também ruptura da lâmina basal e até a destruição total do tecido testicular com a substituição por tecido conjuntivo (Figura 15D). Nas regiões de menor acúmulo, onde foi possível visualizar pouco depósito de nanopartículas, os túbulos seminíferos se apresentavam danificados e delgados, alguns somente com lâmina basal ou com epitélio germinativo composto por apenas células de Sertoli, desconfigurados e retraídos (Figura 15B), apresentando descamação celular em seu lúmen (Figura 15C). Já nas regiões sem aglomerado visível de nanopartículas foi possível observar alguns poucos espermatozoides intraluminais em alguns túbulos (Figuras 15C e 15D). Os túbulos epididimários apresentaram morfologia normal com presença de descamação celular intraluminal e ausência total de espermatozóides em 83% dos epidídimos avaliados (Figuras 15E-G).

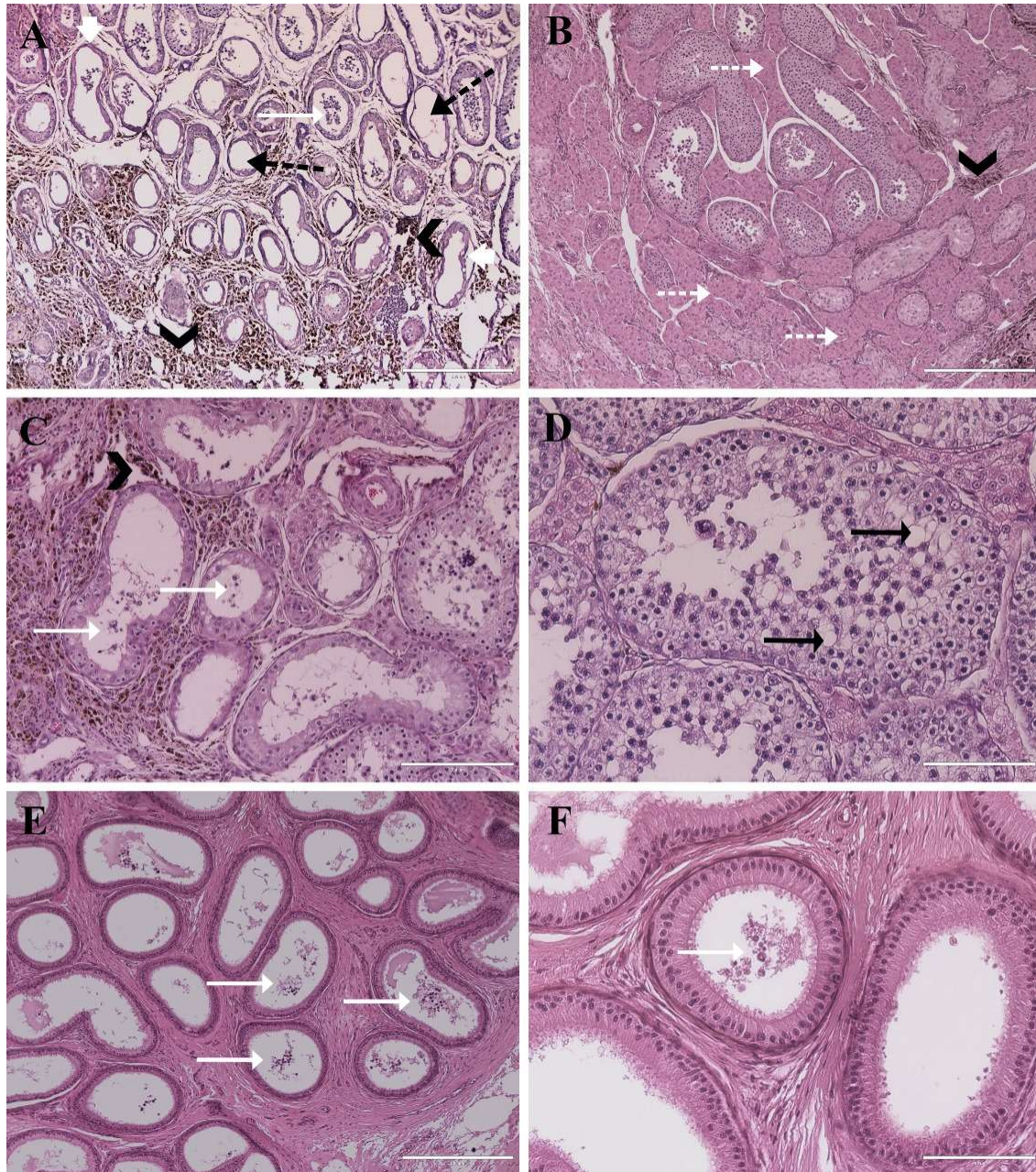


Figura 14: Fotomicrografia de testículos e epidídimos de animais do grupo D47. A: Visão geral dos túbulos seminíferos apresentando epitélio germinativo delgado (seta curta branca), aglomerado sugestivo de nanopartículas (cabeça de seta preta), ausência de espermatozoides (seta preta pontilhada) e descamação celular (seta branca longa). Barra = 400µm. B: Grupos de células de Leydig (seta branca pontilhada) e aglomerado sugestivo de nanopartículas (cabeça de seta preta). Barra = 400µm. C: Descamação celular na luz dos túbulos seminíferos (seta branca longa) e aglomerado sugestivo de nanopartículas no interstício (cabeça de seta preta). Barra = 200µm. D: Túbulo seminífero com presença de células da linhagem germinativa desorganizadas e com picnose nuclear e vacuolização (seta preta). Barra = 100µm. E e F: Túbulos epididimários apresentando descamação celular intraluminal (seta branca). E: Barra = 400µm. F: Barra = 100µm.

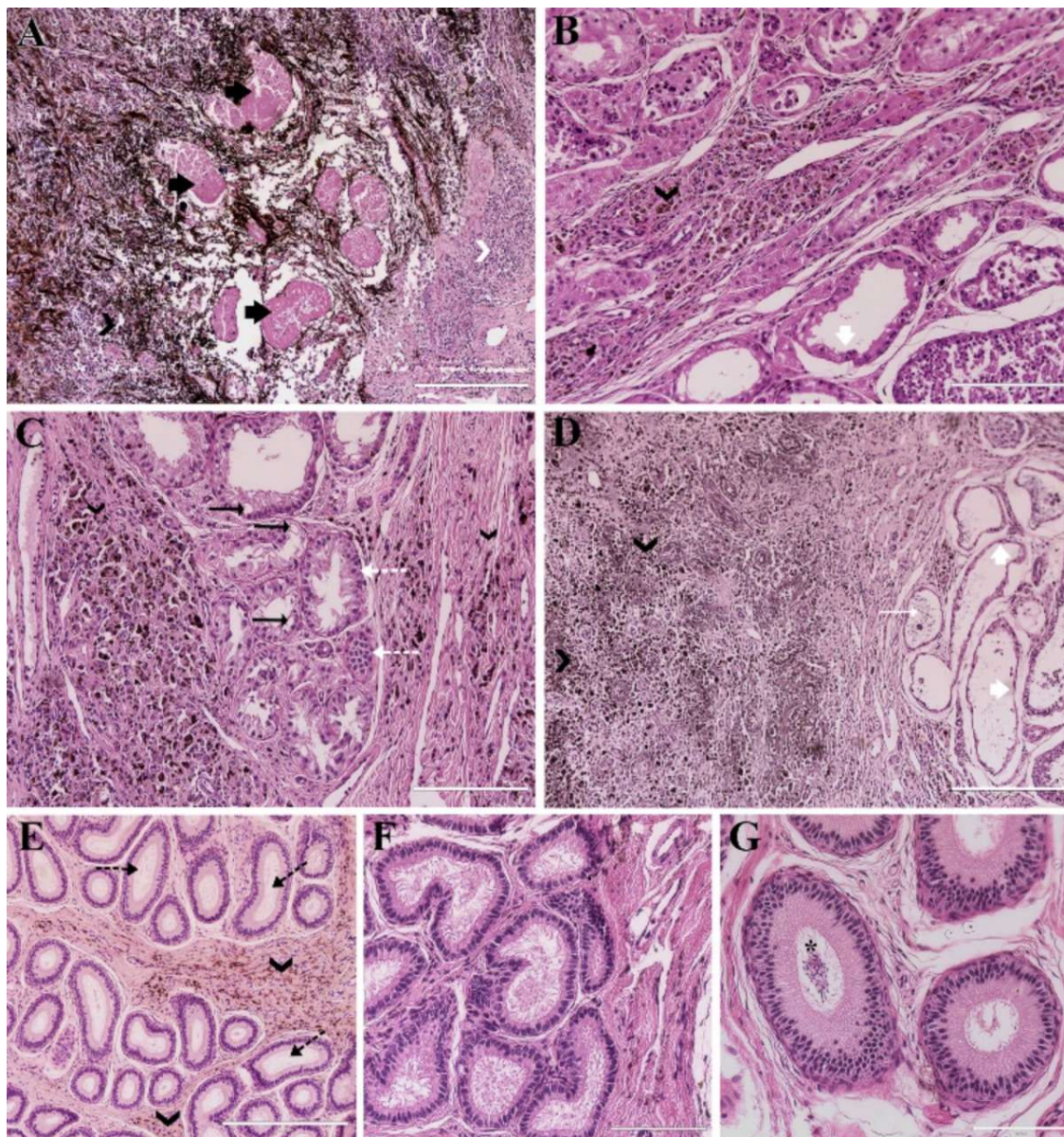


Figura 15. Aspecto histológico dos testículos e epidídimos de animais submetidos à MHT testicular nas avaliações de longo prazo (90 dias – A, B e F, 145 dias – C e G e 180 dias – D e E). Todos os testículos (A-D) apresentaram grau avançado de degeneração tecidual, porém com diferenças em relação à quantidade e proximidade dos aglomerados de nanopartículas, independente do dia de avaliação. Onde há o depósito de uma grande quantidade deste material foi possível observar extensa necrose coagulativa dos túbulos seminíferos (A; setas pretas curtas), degeneração total do epitélio seminífero, com substituição do parênquima por tecido conjuntivo (D). Nas regiões de menor acúmulo de nanopartículas, os túbulos seminíferos se apresentavam desconfigurados e delgados (B; seta branca curta), alguns com epitélio germinativo composto por apenas células de Sertoli (C; seta tracejada branca), com vacuolização (seta preta), ou somente com lâmina basal (D), apresentando descamação celular em seu lúmen (D; seta branca). Os túbulos epididimários (E-G) apresentaram morfologia normal, porém vazios (E; seta tracejada preta) com presença de descamação celular intraluminal (F), e em raros casos com espermatozoides no lúmen (G; *). Barras = 400 μ m (A, D-F), 200 μ m (B e C) e 100 μ m (G).

A dosagem de testosterona sérica, realizada mensalmente em todos os animais dos grupos de avaliação de longo prazo, mostrou valores sempre dentro dos limites de normalidade para gatos adultos e sem diferença estatística entre os dias (Figura 16).

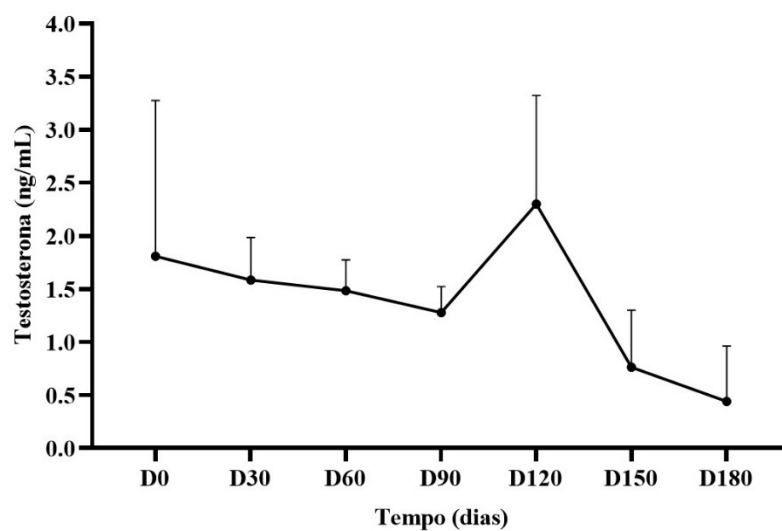


Figura 16. Dosagem de testosterona sérica dos gatos da fase 2 (estudo de longo prazo), antes do procedimento (D0) e ao longo do tempo pós-MHT testicular.

7- DISCUSSÃO

O controle populacional de animais errantes representa um problema importante de saúde pública em muitos países. No caso dos gatos, a situação é ainda mais complexa devido à sua elevada taxa de reprodução e ao comportamento de formação de colônias. A maioria dos indivíduos nessas colônias desenvolve um comportamento feral, tornando o manejo e a adoção desses animais extremamente difícil. Atualmente, a principal estratégia utilizada para o controle populacional dessas colônias é o método CED (Captura-Esterilização-Devolução), no qual os gatos são capturados, castrados cirurgicamente e devolvidos ao local de origem. No entanto, todas as etapas do CED como captura, esterilização e recuperação pós-operatória envolvem custos elevados e exigem infraestrutura adequada, tornando o manejo de gatos ferais um grande desafio (CRAWFORD et al., 2019). Nesse contexto, alternativas não cirúrgicas para a esterilização de animais podem oferecer vantagens como a eliminação da necessidade de ambiente cirúrgico e de recuperação pós-operatória, menor custo e redução de riscos associados à cirurgia. Nos últimos anos, a nanocastração tem se destacado como uma alternativa não invasiva em potencial, apresentando resultados promissores em estudos realizados com roedores (LI et al., 2013; LIU et al., 2015; DING et al., 2021; JIVAGO et al., 2021; YU et al., 2024; BRITO et al., 2025). O presente trabalho representa o primeiro estudo sobre a aplicação da nanocastração em gatos.

Os resultados mostraram que a estratégia utilizada (hipertermia testicular mediada por nanopartículas excitadas por um campo magnético - MNH) em gatos foi capaz de causar danos aos túbulos seminíferos e a espermatogênese tanto a curto prazo (de 7 a 47 dias) como a longo prazo (até 180 dias), em uma única aplicação, sem afetar a saúde geral dos animais avaliados durante todo o período experimental. Embora seja o primeiro experimento de nanocastração realizado em gatos, resultados semelhantes, quanto a danos na espermatogênese e em relação a saúde geral dos animais, foram encontrados em estudos realizados em ratos, utilizando a mesma técnica (JIVAGO et al., 2021, BRITO et al., 2025) e em estudos utilizando a aplicação de nanopartículas testiculares e aplicação de radiação infravermelha em camundongos (LI et al., 2013; LIU et al., 2015; DING et al., 2021).

O controle da temperatura testicular em mamíferos é um fator importante na manutenção da função reprodutiva em machos e métodos alternativos de contracepção utilizando o aumento da temperatura testicular vem sendo estudados há longas datas.

Estes métodos envolveram o aquecimento das gônadas por imersão em água quente, micro-ondas ou ultrassom. No entanto, os efeitos na espermatogênese foram sempre temporários e/ou necessitando de mais de uma aplicação (FAHIM et al., 1975; PÉREZ-CRESPO *et al.*, 2007; LYRIO, *et al.*, 2023), o que já não é interessante para a finalidade de controle populacional, onde se deseja um efeito permanente e com uma única aplicação. A vantagem da MNH sobre os outros métodos térmicos é que o calor gerado vem de dentro para fora, de forma homogênea e controlável (BRAVO et al., 2024). Além disso, o aquecimento é localizado e apenas quando os dois fatores estão presentes, isto é, as nanopartículas e o campo magnético. De fato, na MNH testicular realizada em gatos foi observado que apenas a região que recebeu a aplicação das nanopartículas (testículos) foi aquecida (~45 °C por 15 min) quando submetida ao campo magnético, como era esperado. E na ausência do campo magnético a temperatura testicular retornava rapidamente ao normal. O mesmo resultado foi visto nos estudos realizados em ratos e camundongos utilizando hipertermia mediada por nanopartículas (JIVAGO et al., 2021; DING et al., 2021).

Qualquer substância ou tratamento muito novo levanta questões a respeito da sua segurança para a saúde dos pacientes a ele submetidos. No presente estudo, os animais não apresentaram dor após o procedimento, não havendo necessidade de nenhuma medicação nos dias subsequentes. As avaliações sanguíneas, juntamente com as ultrassonografias abdominais realizadas nos animais acompanhados por longo prazo e dos exames físicos realizados durante todo o período, atestaram que todos os animais tratados se mantiveram saudáveis. Resultados semelhantes já haviam sido demonstrados em ratos submetidos ao mesmo procedimento de nanocastração (JIVAGO et al., 2021; BRITO et al., 2025). Além disso, a lesão na pele do escroto observada em ratos como o único efeito colateral do procedimento (JIVAGO et al., 2021; BRITO et al., 2025) não ocorreu com a mesma frequência e gravidade nos gatos, provavelmente devido a diferenças anatômicas entre as espécies. Os estudos em roedores também mostraram que as nanopartículas utilizadas não se acumulam no organismo, tendo sido detectadas sobretudo no fígado até 56 dias, o que sugere uma excreção hepática, mas sem causar nenhum dano a este órgão (JIVAGO et al., 2021). Rins e pulmões mostraram quantidade insignificante das nanopartículas de 7 até 56 dias após a aplicação (JIVAGO et al., 2021), e elas não foram mais detectadas no organismo após 12 meses (BRITO et al., 2025). Nanopartículas de óxido de ferro já são amplamente estudadas como plataformas

terapêuticas para o tratamento de tumores e são consideradas seguras pois apresentam boa biodegradabilidade (ALPHANDERY, 2010; ALPHANDERY, 2019).

A avaliação clínica dos testículos indicou processo inflamatório local de intensidade leve, transitório e autolimitante, com mais de 50% dos testículos apresentando aspecto firme à palpação nos primeiros dias pós-procedimento, mas com regressão deste quadro posteriormente. Eritema e sensibilidade testicular também foram observados de forma transitória, com normalização do quadro após 7 dias. Resultados semelhantes são observados com aplicações intratesticulares de agentes químicos em gatos (JANA & SAMANTA, 2011; OLIVEIRA et al., 2013; PARANZINI et al., 2018). A castração química também já vem sendo estudada há muitos anos, porém nunca foi de fato aplicada em grande escala, apesar de já ter havido um produto comercial aprovado pelo FDA para uso em cães filhotes utilizando o gluconato de zinco (RAFATMAH et al., 2019). Esta limitação provavelmente se deve aos efeitos colaterais causados pela injeção dessas substâncias esclerosantes, dentre os quais já foram descritos dor excessiva, inflamação exacerbada e necrose com ulceração (FESSEHA, 2019; KUTZLER & WOOD, 2006). Além disso, a maioria desses estudos não descrevem detalhadamente o acompanhamento clínico dos animais tratados (avaliação de dor, exames laboratoriais, etc).

No presente trabalho, o volume testicular mostrou aumento significativo nos primeiros 7 dias após o procedimento, retornando ao volume inicial já aos 14 dias. Este aumento de volume agudo e transitório mostrou ser devido a uma inflamação das estruturas peritesticulares, uma vez que o volume dos testículos quando removidos do escroto não estava aumentado (Figura 6 - grupo D7). Este achado não foi descrito em nenhum estudo anterior de nanocastração e é um dado importante na avaliação do tamanho testicular em tratamentos que visam a castração com injeção intratesticular, já que estudos de castração química relataram aumento testicular nas primeiras 24 horas, provavelmente ocasionado pela expansão da cápsula testicular causada pela aplicação da substância (JANA & SAMANTA., 2011; PARANZINI et al., 2018). Apesar do procedimento ter causado esta inflamação local, os animais não apresentaram alterações de comportamento ou dor em decorrência disso, e nenhum efeito na saúde geral dos animais foi evidenciado. A partir dos 14 dias pós-procedimento o volume testicular continuou reduzindo lenta e gradativamente ao longo do tempo, chegando a um volume significativamente menor que o inicial aos 180 dias. Esta redução significativa dos

testículos foi evidenciada também pela diminuição do peso absoluto e relativo das gônadas. Estes dados sugerem uma atrofia do tecido testicular, e diferem de estudos anteriores de nanocastração em roedores, onde as gônadas sofreram atrofia e até o completo desaparecimento em um período de até 60 dias (JIVAGO et al., 2021; DING et al., 2021; BRITO et al., 2025).

Vários estudos anteriores comprovaram que a hipertermia testicular ocasiona alteração na espermatogênese com lesões de graus variados em túbulos seminíferos e células espermatogênicas dependendo do tempo e da temperatura a que os testículos são submetidos (FAHIM et al., 1975; ZHAO et al., 2010; WANG et al., 2023). Na análise histológica foi possível observar áreas com lesões diferenciadas de acordo com o tempo pós-tratamento e o alcance da nanopartícula magnética no tecido testicular. Na análise do grupo D7 foi notado um processo degenerativo em alto grau com presença de epitélio seminífero completamente descaracterizado e predominância de necrose coagulativa e infiltrado inflamatório, assim como nos estudos de Jivago et al. (2021) e Madbouly et al. (2021). Nos grupos D24 e D47 alterações como túbulos seminíferos degenerados com presença de apenas uma camada de células, esfoliação intraluminal, vacuolização e dilatação cística dos túbulos seminíferos sugerem lesões irreversíveis na espermatogênese. Essa hipótese é reforçada pois ambos os grupos apresentaram túbulos epididimários vazios mostrando o comprometimento da espermatogênese e da maturação espermática. Nos grupos D90, D145 e D180, onde havia grandes aglomerados de nanopartículas no parênquima testicular é possível observar extensa lesão nos túbulos seminíferos com predominância de necrose coagulativa e fibrose, como encontrado por JIVAGO et al. (2021) e em estudos de injeções intratesticulares de agentes esclerosantes utilizando maior volume (JANA & SAMANTA, 2011; PARANZINI et al., 2018; MADBOULY et al., 2021). Nas regiões onde há pouco aglomerado de nanopartículas é possível observar danos moderados aos túbulos seminíferos, e em regiões sem presença visível de nanopartículas no interstício há ocorrência de alguns túbulos seminíferos íntegros com alguns poucos espermatozoides no lúmen. Essas alterações não foram encontradas nos estudos de nanocastração realizadas em ratos e camundongos (LI et al., 2013; LIU et al., 2015; DING et al., 2021; JIVAGO et al., 2021), e provavelmente se devem a diferenças histológicas dos testículos entre as espécies, afetando o espalhamento das nanopartículas no tecido. Isso indica que algumas adaptações ainda precisam ser realizadas para conseguir resultados de infertilidade total em todos os animais tratados,

apesar do resultado obtido em gatos já ser bastante favorável (azoospermia em 85% e oligospermia em 15% dos gatos submetidos ao procedimento).

No presente estudo, observamos que o fluido magnético não conseguiu se infiltrar de maneira homogênea em todo o tecido testicular. Nas zonas aonde o fluido não chegou, os túbulos seminíferos permaneceram intactos ou apresentaram lesões leves. O fluido magnético é levemente viscoso, dificultando o seu espalhamento no órgão. A escolha do volume de 0,15 ml injetado em cada testículo foi baseada no estudo realizado com ratos Wistar adultos (JIVAGO et al., 2021), que apresentam tamanho e peso testicular semelhantes aos de gatos adultos. Essa assimetria nos resultados pode ser devida a diferenças espécie-específicas na consistência e densidade do parênquima testicular entre roedores e gatos, dificultando a distribuição uniforme das nanopartículas nos gatos. Em estudos de castração química com injeção intratesticular de diferentes substâncias em gatos, o volume aplicado variou de 0,25 a 1 mL (OLIVEIRA et al., 2013; JANA & SAMANTA, 2011; PARANZINI et al., 2018; MADBOULY et al., 2021). Assim, uma possibilidade de melhorar os resultados na espécie felina é aumentar o volume de fluido magnético aplicado em cada testículo com a finalidade de permear todo o parênquima testicular.

Apesar dos danos ao tecido testicular observados, não ocorreu diminuição significativa dos níveis séricos de testosterona nos gatos tratados. Estes resultados divergem dos descritos para ratos submetidos ao mesmo procedimento (BRITO et al., 2025) e de estudos com castração química por aplicação intratesticular de substâncias esclerosantes (JANA & SAMANTA, 2011; LEOCI et al., 2019; FAGUNDES et al., 2013). Por se tratar de um método térmico, o dano causado pelo aumento da temperatura testicular afeta mais diretamente as células espermatogênicas, que são altamente sensíveis ao calor, mas não necessariamente compromete as células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona. Este efeito é observado em casos de criptorquidismo, onde a temperatura testicular acima da normal causa comprometimento da espermatogênese, podendo levar à infertilidade, podendo ou não interferir na produção hormonal (ALI et al., 2022).

No entanto, quando se fala em controle reprodutivo de colônias de gatos, a castração cirúrgica de machos, que provoca uma queda brusca dos níveis de testosterona, ou mesmo a remoção desses animais da colônia, pode favorecer a migração de machos férteis para o local (o chamado *efeito vácuo*). Isso gera reprodução contínua com fêmeas

não esterilizadas, além de aumento de conflitos e instabilidade social dentro da colônia (GUNTHER et al., 2011; SWARBRICK & RAND, 2018). Assim, estes novos gatos não esterilizados rapidamente repovoam a área, dificultando o controle populacional a longo prazo (LUZARDO *et al.*, 2023). Estudos sobre o comportamento social em colônias, observaram que machos castrados inseridos nessas populações apresentaram menor agressividade comparativamente a machos inteiros (VITALE, 2022). Esses dados sugerem que, em técnicas onde os níveis de testosterona se mantêm estáveis, como na nanocastração térmica, os animais continuam a exibir comportamentos sexuais e territorialistas, ao mesmo tempo que têm a espermatogênese comprometida. Essa contraposição entre comportamento sexual e infertilidade não é necessariamente ruim no contexto do controle populacional de gatos de vida livre, contribuindo para a saúde social das colônias ao mesmo tempo que reduz seu crescimento.

8- CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo mostrou que a hipertermia testicular mediada por nanopartículas de MnFe_2O_4 -citrato e ativadas por campo magnético, em uma única aplicação, afetou os parâmetros reprodutivos dos gatos com comprometimento da espermatogênese sem causar efeitos colaterais nem afetar a saúde dos animais em um período de até 180 dias. Este é o primeiro trabalho com aplicação de um método de nanocastração conduzido em uma espécie de interesse, no caso gatos domésticos. Embora os resultados tenham sido satisfatórios, mais estudos são necessários para otimizar o método, levando em consideração a espécie alvo.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R.G.D., FERREIRA, D., VELOSO, S.R.S., SANTOS-PEREIRA, C., CASTANHEIRA, E.M.S., CÔRTE-REAL, M., RODRIGUES, L.R. Synthesis and Cytotoxicity Assessment of Citrate-Coated Calcium and Manganese Ferrite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. *Pharmaceutics*. 14, 2694. 2022.
- AKHLAGHI, N., NAJAFPOUR-DARZI, G. Manganese ferrite (MnFe₂O₄) Nanoparticles: From synthesis to application -A review, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 103, 292-304. 2021.
- ALI, O.; ALI, T.; ABDULQADHR, G.; ISMAEEL, D. Clinical and histological aspects of cryptorchidism in dogs and cats. *Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences*, 15, 34-42. 2022.
- ALONSO, L.S., BARCELLOS, M.C.B.B., PINTO, J.V., GONÇALVES, S.M., SOUZA, L.M., JOFFILY, D. Medidas para o controle de animais errantes desenvolvidas pelo grupo Pet Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. *Em Extensão*, 12, 197–211, 2013.
- ALPHANDÉRY, E. Iron oxide nanoparticles for therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 25, 141–149, 2020.
- BALL, P. Nano contracepção. *Natureza Mater* 12 , 602. 2013.
- BEAVER, B.V.G. *Feline Behavior: A Guide for Veterinarians*, SAUNDERS W B Company, 2003.
- BRANQUINHO, L. C., CARRIAO, M. S., COSTA, A. S., ZUFELATO, N., SOUSA, M. H., MIOTTO, R., IVKOV, R. & BAKUZIS, A. F. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: implications for cancer hyperthermia. *Scientific Reports*, 3, 2887, 2013.

- BRAVO, M., FORTUNI, B., MULVANEY, P., HOFKENS, J., UJI-I, H, ROCHA, S., HUTCHISON, J. A. Nanoparticle-mediated thermal cancer therapies: Strategies to improve clinical translatability. *Journal of Controlled Release*, 372, 751–777, 2024.
- BRITO, J.L.M., LIMA, V. N., JIVAGO, J. L. P. R., MARANGON, A. R. M., VINÍCIUS-ARAÚJO, M., BAKUZIS, A. F., SANTOS, J. D. A. R. D., SOUZA, P. E. N., AZEVEDO, R. B., LUCCI, C. M. Achieving permanent male infertility by magnetic nanoparticle hyperthermia: a breakthrough in animal fertility management. *Pharmaceutics*, 17, 602, 2025.
- BUZEA, C., PACHECO, I.I, ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4):MR17-71. 2007.
- CAFAZZO, S., BONANNI, R., NATOLI, E. Neutering effects on social behavior of urban unowned free-roaming domestic cats. *Animals*, 9, 1105, 2019.
- CATHEY, M., MEMON, M.A. Nonsurgical methods of contraception in dogs and cats: where are we now? *Veterinary Medicine*, 105, 12–17, 2010.
- CAVALIERI, J. Chemical sterilization of animals: A review of the use of zinc- and CaCl_2 based solutions in male and female animals and factors likely to improve responses to treatment. *Animal Reproduction Science*. 181, 1-8, 2017.
- CAZARES-CORTES, E., CABANA, S., BOITARD, C., NEHLIG, E., GRIFFETE, N., FRESNAIS, J., WILHELM, C., ABOU-HASSAN, A., MENAGER, C. Advanced Drug Delivery Reviews 138, 233-246. 2018.
- CRAWFORD, H. M., CALVER, M. C., FLEMING, P. A. A case of letting the cat out of the bag—why Trap-Neuter-Return is not an ethical solution for stray cat (*Felis catus*) management. *Animals*, 9, 171, 2019.
- DIAS, R.A. ABRAHÃO, C.R., MICHELETTI, T. Prospects for domestic and feral cat management on an inhabited tropical island. *Biological Invasions* 19, 2339–2353, 2017.

DIAS, R.A. **Os donos do pedaço: caracterização das populações de cães e gatos domiciliados no município de São Paulo**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013. DOI: Disponível em: www.livrosabertos.abcd.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/book/322 . Acesso em 14 outubro. 2025.

DEPARTAMENTO DE PROTEÇÃO, DEFESA E DIREITO DOS ANIMAIS: MANEJO POPULACIONAL ÉTICO DE CÃES E GATOS. Ministério do Meio Ambiente. <https://www.gov.br/mma/pt-br/composicao/sbio/dpda>. Acesso em: 05/01/2024.

DING, W., CHEN, Z., GU, Y., ZHENG, Y., SUN, F. Magnetic Testis Targeting and Magnetic Hyperthermia for Noninvasive, Controllable Male Contraception via Intravenous Administration. *Nano Letters*. 21, 6289-6297, 2021.

DYCE, K. M., SACK, W. O., WENSING, C. J. G. O aparelho urogenital In: *Tratado de anatomia veterinária*, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 181-188.

DUTT, Y., PANDEY, R.P., DUTT, M., GUPTA, A., VIBHUTI, A., VIDIC, J., RAJ, V.S., CHANG, C.M., PRIYADARSHINI, A. Therapeutic applications of nanobiotechnology. *Journal of Nanobiotechnology*. 21, 148. 2023.

EVANGELISTA, M.C., WATANABE, R., LEUNG, V.S.Y., MONTEIRO, B.B., O'TOOLE, E., PANG, D.S.J., STEAGALL, P.V. Facial expressions of pain in cats: the development and validation of a Feline Grimace Scale. *Scientific Reports*, 9, 19128, 2019.

FAGUNDES, A.K., OLIVEIRA, E.C., TENORIO, B.M., MELO, C.C., NERY, L.T., SANTOS, F.A., ALVES, L.C., DOUGLAS, R.H., SILVA, V.A. Injection of a chemical castration agent, zinc gluconate, into the testes of cats results in the impairment of spermatogenesis: a potentially irreversible contraceptive approach for this species? *Theriogenology*. 81, 230-6, 2014.

- FAHIM, M. S., FAHIM, Z., HALL, D. G., & HARMAN, J. Heat in male contraception hot water 60C, infrared, microwave, and ultrasound. *Contraception*, 11, 549–562, 1975.
- FAHIM, M.S., WANG, M., SUTCU, M.F., FAHIM, Z., YOUNGQUIST, R.S. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception* 47, 107-122, 1993.
- FARZIN, A., ETESAMI, S.A., QUINT, J., MEMIC, A., TAMAYOL, A. Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Advanced Healthcare Materials*. 9, e1901058, 2020.
- FAVRE, R.N., BONAURA, M.C., PRADERIO, R., STORNELLI, M.C., DE LA SOTA, R.L., STORNELLI, M.A. Effect of melatonin implants on spermatogenesis in the domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Theriogenology*. 82, 851-6, 2014.
- FERRO, V.A., KHAN, M.A., MCADAM, D., COLSTON, A., AUGHEY, E., MULLEN, A. B., WATERSTON, M. M., HARVEY, M. J. Efficacy of an anti-fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) --a histological comparison in male animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 101, 73-86, 2004.
- FESSEHA, H. Non-surgical sterilization methods in male animals: A review. *Veterinary Medicine – Open Journal*. 4, 49-56, 2019.
- FONSECA, S.F., MANGINI, R.P., MELLO, J. T., ARAUJO, R., SILVA, R.C.J., MICHELETTI, T. Feral cat population rises on Fernando de Noronha archipelago: wildlife needs different cat control approaches and needs it now. *Biodiversidade Brasileira*. 11, 1-9, 2021.
- FONTAINE, C. Long-term contraception in a small implant: A review of Suprelorin (deslorelin) studies in cats. *Journal of Feline Medical Surgery*. 17, 766-71, 2015.

- FONTAINE, E. Non-surgical contraception in cats: What's new? Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2021) e VIII International Symposium on Animal Biology of Reproduction – Joint Meeting, Belo Horizonte, MG, 19 a 22 de outubro de 2021.
- FORTALEZA, C.M. Apresentação. In: SÃO PAULO. Secretaria do Estado de Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Programa de Controle de Populações de cães e gatos do Estado de São Paulo. Boletim Epidemiológico Paulista, v.6, p.9 158 p, 2006.
- FRANÇA, L. R., AVELAR, G. F., ALMEIDA, F. F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63, 300–318, 2005.
- FRANÇA, L. R., GODINHO, C. L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats. *Biology of Reproduction*, 68, 1554-1561, 2003.
- GARCIA, R. C. M. Estudo da dinâmica populacional canina e felina e avaliação de ações para o equilíbrio dessas populações em área da cidade de São Paulo, SPBrasil. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. São Paulo, 2009.
- GARCIA, R. C. M., AMAKU, M., BIONDO, A. W., FERREIRA, F. Dog and cat population dynamics in an urban area: evaluation of a birth control strategy. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38, 511-518, 2018.
- GOBELLO, C. Key aspects of domestic cat spermatogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 459-464, 2022.
- GOERICKE-PESCH, S., GEORGIEV, P., ANTONOV, A., ALBOUY, AM, WEHREND, A. Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg

deslorelin, Suprelorin, regarding suppression of reproductive function in tomcats. *Theriogenology*. 75, 803-10, 2011.

GUNTHER, I., FINKLER, H., & TERKEL, J. Demographic differences between urban feeding groups of neutered and sexually intact free-roaming cats following a trap-neuter-return procedure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238, 1134-1140, 2025.

HAY, M.A. & GOODROWE, K.L. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 47, 297-305, 1993.

HAMED, M.A., AMIN, Y.A., MOHAMED, R.H .EL-ADL, MOHAMED., BASEED, S.M., ELNEGIRY, A.A., SHAWKI, H.H., AL-LETHIE, A.A. Evaluation of chemical castration using intra-testicular injection of zinc gluconate into the testis of the male donkey versus surgical castration: antimullerian hormone as an endpoint marker. *BMC Veterinary Research* 19; 140, 2023.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 364, 3341-3350, 2009.

HOWE, L. M. Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66, 500-509, 2006.

INSTITUTO PASTEUR. Manual Técnico do Instituto Pasteur. Controle de populações – animais de estimação. São Paulo v 6, p.20, 2000.

ISLAM, K., HAQUE, M., KUMAR, A., HOQ, A., HYDER, F., HOQUE, S.M. Manganese Ferrite Nanoparticles (MnFe₂O₄): Size Dependence for Hyperthermia and Negative/Positive Contrast Enhancement in MRI. *Nanomaterials*. 10, 2297, 2020.

JAIN, K.K. Role of Nanobiotechnology in Drug Delivery. *Methods in Molecular Biology*. 2059, 55-73, 2020.

- JANA, K., SAMANTA, P.K. Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. *BMC Veterinary Research*. 7, 39, 2011.
- JANA, K., SAMANTA, P.K. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible estrogenic mode of action. *Reproduction Biology and Endocrinology*. 4, 9–22, 2006.
- JIVAGO, J.L.P.R., BRITO, J.L.M., CAPISTRANO, G., VINÍCIUS-ARAUJO, M., LIMA VERDE, E., BAKUZIS, A.F., SOUZA, P.E.N., AZEVEDO, R.B., LUCCI, C.M. New Prospects in Neutering Male Animals Using Magnetic Nanoparticle Hyperthermia. *Pharmaceutics*. 13, 1465, 2021.
- JOANITTI, G. A., MORAIS, P., AZEVEDO, R. B. Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 517 p, 2022.
- JOHNSON, A.K. Normal feline reproduction: The tom. *Journal of Feline Medical Surgery*. 24, 212-220, 2022.
- JOHNSTON, S. D., KUSTRITZ, M. V. R., OLSON, P. N. S. Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia: W. B. Saunders. 592p, 2001.
- JUNQUEIRA ANN, GALERA PD. Evaluation of Population Management Based on Trap-Neuter-Return and Trap-Neuter-Adoption Practices in a Free-Roaming Cat Colony in the Federal District, Brazil. *Animals*.14, 2478, 2024.
- KIM, H. C., KIM, E., JEONG, S. W., HA, T. L., PARK, S. I., LEE, S. G., LEE, S. J. & LEE, S. W. Magnetic nanoparticle-conjugated polymeric micelles for combined hyperthermia and chemotherapy. *Nanoscale*, 7, 16470-80, 2015.

- KUTZLER, M. A. Intratesticular and intraepididymal injections to sterilize male cats: From calcium chloride to zinc gluconate and beyond. *Journal of Feline Medical Surgery*. 17, 772-6, 2015.
- KUTZLER M, WOOD A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*. 66, 514-25, 2006.
- LAURENT, S., DUTS, S., HAFELI, U.O., MAHMOUDI, M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*. 166, 8-23, 2011.
- LEOCI, R., AIUDI, G., SILVESTRE, F., LISSNER, E.A., MARINO, F., LACALANDRA, G.M. Therapeutic Ultrasound as a Potential Male Dog Contraceptive: Determination of the Most Effective Application Protocol. *Reproduction in Domestic Animals*. 50, 712-8, 2015.
- LEOCI, R., AIUDI, G., CICIARELLI, V., BRENT, L., IARIA, C., LACALANDRA, G.M. Effects of intratesticular vs intraepididymal calcium chloride sterilant on testicular morphology and fertility in dogs. *Theriogenology*. 127, 153-160, 2019.
- LEVY, J.K., CEAWFOR, P.C., APPEL, L.D., CLIFFORD, E.L. Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 69, 140-3, 2008.
- LEVY, J.K. Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. *American Journal of Reproductive Immunology*. 66, 63-70, 2011.
- LICHTLER, J. Castração precoce em pequenos animais: técnica, vantagens e riscos e uso no controle populacional. (Monografia de Medicina Veterinária) – Porto Alegre, 2014.
- LITTLE, S.E. O gato: Medicina Interna. 1ed., Rio de Janeiro: Roca, 1332p. 2015.

- LIU, Z., LIU, X., DU, Y., REN, J., QU, X. Using Plasmonic Copper Sulfide Nanocrystals as Smart Light-Driven Sterilants. *ACS Nano*; 9, 10335–10346, 2015.
- LI, W.Q., SUN, C.Y., WANG, F., WANG, Y.C., ZHAI, Y.W., LIANG, M., LIU, W.J., LIU, Z.M., WANG, J., SUN, F. Achieving a new controllable male contraception by the photothermal effect of gold nanorods. *Nano Letters*. 13, 2477-84, 2013.
- LIMA, Vanessa Nicolau de. Fotohipertermia como possível indutora de infertilidade em ratos Wistar machos. (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2024. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/jspui/handle/10482/47438>.
- LOUVANDINI, H., McMANUS, C., MARTINS, R.D., LUCI, C.M., CORRÊA, P.S. Características biométricas testiculares em carneiros santa inês submetidos a diferentes regimes de suplementação protéica e tratamentos anti-helmínticos. *Ciência Animal Brasileira*, 9, 638-647, 2008.
- LYRIO, L.L., LAZARO, M.A, SONEGHETI, R., MOULIN, L., COSLOP, L., SARTO, C.G, LOUREIRO, B., FAVORETO, M.G. Effects of heat stress on sperm quality of French Bulldogs. *Theriogenology*. 199, 131-137, 2023.
- LUZARDO, O.P., ZALDÍVAR-LAGUÍA, J.E., ZUMBADO, M., TEAVIESO-AJA, M.D.M. The Role of Veterinarians in Managing Community Cats: A Contextualized, Comprehensive Approach for Biodiversity, Public Health, and Animal Welfare. *Animals*. 13, 1586, 2023.
- MADBOULY, H., KORANY, R., EL-SHAHAT, K., EISSA, H., FATHI, M. Efficacy of intratesticular glycerol injection as male cat contraception in comparison with two surgical approaches. *Topics in Companion Animal Medicine*, 42, 100493, 2021.
- MASSEI, G., MILLER L, A. Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: a review of products and criteria for field applications. *Theriogenology*. 80, 829-38, 2013.

- MILLER, P. S., BOONE, J. D., BRIGGS, J. R., LAWLER, D. F., LEVY, J. K., NUTTER, F. B. Simulating free-roaming cat population management options in open demographic environments. *Plos One*, 9, e113553, 2014.
- MENDES-DE-ALMEIDA, F., REMY, G. L., GERSHONY, L. C., RODRIGUES, D. P., CHAME, M. & LABARTHE, N. V. Reduction of feral cat (*Felis catus* Linnaeus 1758) colony size following hysterectomy of adult female cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13, 436-440. 2011.
- MEYER, D. J., HARVEY, J. W. *Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis*. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 351p, 2004.
- MONTESERÍN, M., LARUMBE, S., MARTÍNEZ, A.V., BURGUI, S., FRANCISCO MARTÍN, L. Recent Advances in the Development of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 21, 2705-2741, 2021.
- MOUTINHO, F. F. B., NASCIMENTO, E. R. D. & PAIXÃO, R. L. Percepção da sociedade sobre a qualidade de vida e o controle populacional de cães não domiciliados. *Ciência Animal Brasileira*, 16, 574-588, 2015.
- MURRAY, J. K., BARKER, E. N., COOK, A. J. C., BARKER, L. A., CASEY, R. A. Number and demographics of cats admitted to RSPCA shelters in England and reasons for relinquishment. *Veterinary Record*, 170, 310, 2012.
- NANOACTION. *Princípios para a supervisão de nanotecnologias e nanomateriais*, 2007.
- NAZ, R. K., SAVER, A. E. Immunocontraception for Animals: Current Status and Future Perspective. *American Journal of Reproductive Immunology*. 75, 426-39, 2016.
- NEGREIROS, A. *Felinos:Um guia para o controle ético e eficaz de populações felinas*. Rio de Janeiro, 2015.

- NOVOTNY, R., VITASEK, R., BARTOSKOVA, A., CIZEK, P., PRINOSILOVA, P., NOVAKOVA, K. Azoospermia with variable testicular histology after 7 months of treatment with a deslorelin implant in toms. *Theriogenology*. 83, 1188-93, 2015.
- OCHOA, J.S., FAVRE, R.N., GARCIA, M. F., STORNELLI, M. C., SANGACHE, W. C., REARTE, R., DE LA SOTA, L., STORNELLI, M. A. Immunocontraception of male domestic cats using GnRH vaccine Improvac. *Theriogenology*. 198, 211-216, 2023.
- OBERDORSTER, G., MAYNARD, A., DONALDSON, K., CASTRANOVA, V., FITZPATRICK, J., AUSMAN, K., CARTER, J., KARN, B., KREYLING, W., LAIIL, D., OLIN, S., MONTEIRO-RIVIERE, N., WARHEIT, D., YANG, H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanoparticles: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2, 1-35, 2005.
- OLIVEIRA, E.C., MOURA, M.R., DE SÁ, M.J., SILVA, V.A., KASTELIC, J.P., DOUGKAS, R.H., MARQUES, A. P. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. *Theriogenology*. 77, 1056-63, 2012.
- OLIVEIRA, E.C., FAGUNDES, A.K., MELO, C.C., NERY, L.T., REVOREDO, R.G., ANDRADE, T.F., OLIVEIRA-ESQUERRE, K., KASTELIC, J.P., SILVA, V.A. Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial of efficacy and safety. *Veterinary Journal*. 197, 307-10, 2013.
- OMS. Relatório da consulta da OMS sobre estudos de ecologia canina relacionados ao controle da raiva. Organização Mundial da Saúde, Genebra, 1988.
- PARAGON, B.M., VAISSAIRE J.P. Enciclopédia do gato (Royal Canin). Aniwa Publishing. 443 p., 2001.

- PARANZINI, C.S., SOUSA, A.K., CARDOSO, G.S., PERECIN, F.M., TRAUTWEIN, L.G.C., BRACARENSE, A.P.F.R., MARTINS, M.I.M. Effects of Chemical castration using 20% CaCl_2 with 0.5% DMSO in tomcats. Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and effectiveness of treatment. *Theriogenology* 106, 253-258, 2018.
- PÉREZ-CRESPO, M., PINTADO, B., GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development*. 75, 40–47, 2008.
- PEREIRA, G. J., SANTOS PREZOTO, H. H., NEVES DIAS, A. M., OSHIO, L. T. Estudos científicos sobre gatos ferais no Brasil. *Pubvet*, 14(05), 2020.
- PURSWELL, B. J. & KOLSTER, K. A. Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology*, 66, 510-513, 2006.
- RAFATMAH, D., MOGHEISEH, A., ESHGHI, D. Chemical sterilization with intratesticular administration of zinc gluconate in adult dogs: a preliminary report. *Basic and Clinical Andrology*. 29, 12, 2019.
- REECE, W.O. Dukes. *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 740p. 2016.
- ROBAIRE, B., HINTON, B.T., ORGEBIN-CRIST, M.C. The Epididymis. In: NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. 3ed. São Paulo: Elsevier, p.1072 - 1120, 2006.
- ROBINSON, B.R., NETHERTON, J.K., OGLE, R.A., BAKER, M.A. Testicular heat stress, a historical perspective and two postulates for why male germ cells are heat sensitive. *Biological Reviews*, 98, 603-622, 2023.
- ROSA, E., KREMER, I.S., MALDANER, S., QUADROS, G. R., FABRIS, L., CARDOSO, L. T., BOITA, J. A Perspective on the Properties and Mechanical Applications of Nanostructures. *Ciência E Natura*, 42, 2020.

- SARGENTELLI, V., FERREIRA, A.P. Nanopartículas magnéticas: o cobalto. *Eclética Química*, 35, 153-163, 2010.
- SAWBRIGDE, F. (2020). How did the Netherlands become the first country to have no stray dogs? <https://dutchreview.com/culture/how-did-the-netherlands-become-the-first-country-to-have-no-stray-dogs/>
- SEBASTIANI, A.M., FISHBECK, D.W. *Mammalian anatomy: the cat*. Colorado, Morton Publishing Company, 184p, 2005.
- The Vacuum Effect. Alley Cat Allies. <https://www.alleycat.org/resources/the-vacuum-effect-why-catch-and-kill-doesnt-work/>. Acesso em 05/01/2024.
- SILVA, T.F.P. Terapia para indução de estro em gatas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31, 84-91, 2007.
- SIM, S., WONG, N. K. Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). *Biomedical Reports* 14, 42, 2021.
- SPEHAR, D.D., WOLF, P.J. The Impact of Return-to-Field and Targeted Trap-Neuter-Return on Feline Intake and Euthanasia at a Municipal Animal Shelter in Jefferson County, Kentucky. *Animals* 10, 1395, 2020.
- STUEBER, D.D., VILLANOVA, J., APONTE, I., XIAO, Z., COLVIN, V.L. Magnetic Nanoparticles in Biology and Medicine: Past, Present, and Future Trends. *Pharmaceutics*. 13, 943, 2021.
- SWARBRICK, H., RAND, J. Application of a Protocol Based on Trap-Neuter-Return (TNR) to Manage Unowned Urban Cats on an Australian University Campus. *Animals*. 8, 77, 2018.
- TESSIER, P.M., KANE, R.S. Editorial overview: Nanobiotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 78, 102824, 2022.

- TORTORA, G. J., DERRICKSON, B. Princípios de anatomia e fisiologia. 12a. edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2010.
- TSURUTA, J. K., DAYTON, P. A., GALLIPPI, C. M., O'RAND, M. G., STREICKER, M. A., GESSNER, R. C., GREGORY, T. S., SILVA, E. J., HAMIL, K. G., MOSER, G. J. & SOKAL, D. C. Therapeutic ultrasound as a potential male contraceptive: power, frequency and temperature required to deplete rat testes of meiotic cells and epididymides of sperm determined using a commercially available system. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10, 7, 2012.
- VALLABANI, V. S. N., SINGH, S., KARAKOTI, A.A. Magnetic Nanoparticles: Current Trends and Future Aspects in Diagnostics and Nanomedicine. *Current Drug Metabolism*; 20, 457-472, 2019.
- VILELA, A. L. O., LAMIM-GUEDES, V. Cães domésticos em unidades de conservação: impactos e controle. *Holos Environment*, 14, 198–210, 2014.
- VITALE KR. The Social Lives of Free-Ranging Cats. *Animals*.12, 126, 2022.
- KAI WANG, ZHAOJIAN LI, YANSEN LI, XIAOTONG LI, YUNPENG SUO, CHUNMEI LI, Impacts of elevated temperature on morphology, oxidative stress levels, and testosterone synthesis in ex vivo cultured porcine testicular tissue, *Theriogenology*, 212, 181-188, 2023.
- WAP. World Animal Protection. Manejo Humanitário de Cães. p. 40. 2015. https://www.worldanimalprotection.org.br/sites/default/files/media/br_files/manejo_humanitario_de_caes_wap_portugues_pg2_alta.pdf>, acesso em 29 set 2021.
- WANG, J., CHEN, Y., CHEN, B. A., DING, J. H., XIA, G. H., GAO, C., CHENG, J. A., JIN, N., ZHOU, Y., LI, X. M., TANG, M. & WANG, X. M. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 861-866, 2010.

- WHITNEY, K.M., SUTTIE, A.W. Chapter 28 Testis and Epididymis. In: Boorman's Pathology of the Rat. AW Suttie (ed). Academic Press, Cambridge, 2018.
- WU, K., SU, D., LIU, J., SAHA, R., WANG, J.P. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. *Nanotechnology*. 30, 502003, 2019.
- YALLAPU, M.M., OTHMAN, S.F., CURTIS, E.T., BAUER, N.A., CHAUHAN, N., KUMAR, D., JAGGI, M., CHAUHAN, S.C. Curcumin-loaded magnetic nanoparticles for breast cancer therapeutics and imaging applications. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1761-1779, 2012.
- ZHAO, J., ZHANG, Y., HAO, L., WANG, J., ZHANG, J., LIU, S., & REN, B. Effects of a mild heat treatment on mouse testicular gene expression and sperm quality. *Animal Cells and Systems*, 14, 267–274, 2010.
- ZHANG, B., JIANG, X., Magnetic Nanoparticles Mediated Thrombolysis-A Review. *IEEE Open J Nanotechnol*. 4, 109-132, 2023.



Brasília, 29 de março de 2022.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de ensino intitulado **"HIPERTERMIA MEDIADA POR NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMO POSSÍVEL INDUTOR DE INFERTILIDADE EM GATOS MACHOS"**, SEI n.º 23106.018229/2022-31, sob responsabilidade da Professora Carolina Madeira Lucci, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 170ª reunião ordinária, realizada em 25/3/2022. Este projeto foi aprovado para utilização de *Felis catus* (33 machos), provenientes de tutores ou do Centro de Controle de Zoonoses de Brasília.

O presente certificado é válido pelo período de 15/4/2022 à 30/2/2025.



Carina Krewer
Dra. Carina da Costa Krewer
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.