

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

**INJEÇÃO INTRAOVARIANA PERCUTÂNEA GUIADA POR ULTRASSOM EM
GATAS**

Dissertação de mestrado

VITÓRIA CAROLINE AIRES SILVEIRA

Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil

2024

VITÓRIA CAROLINE AIRES SILVEIRA

**INJEÇÃO INTRAOVARIANA PERCUTÂNEA GUIADA POR
ULTRASSOM EM GATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (*Stricto Sensu*) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientadora: Maria Ligia de Arruda Mestieri

Coorientador: Diego Vilibaldo Beckmann

**Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil
2024**

VITÓRIA CAROLINE AIRES SILVEIRA

**INJEÇÃO INTRAOVARIANA PERCUTÂNEA GUIADA POR
ULTRASSOM EM GATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (*Stricto Sensu*) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Ciência Animal

Dissertação defendida e aprovada em: 22 de julho de 2024

Banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Maria Ligia de Arruda Mestieri
Orientadora
Universidade Federal do Pampa - (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Diego Vilibaldo Beckmann
Co-orientador
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita
Universidade Federal do Pampa - (UNIPAMPA)

Prof.(a) Dr.(a) Fabiana Ferreira de Souza
Universidade Estadual Paulista - (UNESP)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, e acima de tudo, agradeço aos meus pais. Obrigada pelo amor incondicional, dedicação e esforço para me proporcionarem educação, sem vocês eu não teria chegado até aqui. Aqui vai mais uma conquista dedicada a vocês, amo vocês.

Ao meu esposo Gabriel Maggi, por durante toda essa caminhada ter sido o meu ponto de apoio, tornando tudo mais leve e possível, apesar de todas as adversidades. Amo você e nossa família.

Ao bebê Martín, meu filho amado. No início do segundo ano do mestrado, a mamãe descobriu que esperava você. Foi intenso, foi desafiador, mas você me motivou e me motiva todos os dias ainda mais a buscar pela minha melhor versão. Obrigada por ter sido meu companheiro em todos os dias de experimento e em todas as noites dormidas no Huvet para que tudo desse certo. Obrigada por me escolher, a mamãe te ama incondicionalmente.

À minha orientadora Maria Lígia Mestieri, obrigada por acreditar em mim e enxergar naquela menina recém formada um potencial que talvez nem eu soubesse que tinha. Obrigada por todos os desafios, conselhos e aprendizado que me proporcionou e ainda me proporcionada desde o 6º semestre da graduação. Saiba que você tem minha admiração e você tem uma grande parcela na profissional que eu sou hoje.

Ao meu co-orientador Diego Beckmann, que por motivos de força maior não pôde estar presente fisicamente em toda a trajetória do mestrado, porém sempre esteve ali para ajudar a enxergar a melhor direção e nunca deixou de acreditar que meu projeto seria possível. Além disso, foi fundamental para a construção deste trabalho.

Aos tantos outros professores que cruzaram meu caminho nestes dois anos, sempre contribuindo para o meu crescimento e aprendizado, em especial o querido professor Paulo de Souza Júnior e professoras Ingrid Rios e Marília Oliveira.

À minha amiga fiel e escudeira Luiza Marques, que como sempre, sempre me acolheu, me escutou e não mediu esforços para ajudar com o que estivesse ao alcance. Obrigada também poder me ceder um espacinho na salinha da imagem, onde muitas vezes foi o meu refúgio e também local onde construí muito aprendizado.

À minha amada amiga Jéssica Borba, que também sempre esteve ao meu lado, não deixando esquecer que eu era capaz, e por muitas vezes aceitar ser “sequestrada” por horas e me auxiliar com os seres de luz que são os nossos queridos felinos.

Agradeço também aos meus colegas e amigos(as) Etiele, Endreo, Dimas e demais frequentantes da salinha da pós que compartilharam comigo não somente os momentos bons, mas também todos os perrengues (que não foram poucos). Obrigada por sempre ter um cafezinho e um docinho para melhorar todas as situações.

“É necessário sair da ilha para ver a ilha, não nos vemos se não saímos de nós.”

- José Saramago

RESUMO

A busca por métodos menos invasivos e eficazes de quimioesterilização em animais domésticos é crescente, impulsionada pelo aumento do número de animais errantes, principalmente em países subdesenvolvidos. Este estudo se propôs a desenvolver a técnica de injeção intraovariana guiada por ultrassonografia em gatas, para possibilitar a entrega de agentes esclerosantes com potencial quimioesterilizante. Para isso, 0,1 mL de corante azul patente a 40% (diluído em cloreto de sódio 0,9%) foi injetado nos ovários esquerdo e direito de 21 gatas através de injeção percutânea guiada por ultrassonografia. As medidas de largura, comprimento e diâmetro dos ovários foram avaliadas antes e imediatamente após a injeção para identificar parâmetros indicativos de sucesso ou falha da aplicação e definir se a ultrassonografia seria capaz de identificar o acerto do órgão. Após as injeções, os animais foram submetidos à celiotomia e inspeção da cavidade abdominal para verificar possível extravasamento do conteúdo injetado, perfurações ou lacerações de órgãos adjacentes e identificar se o ovário havia sido corado pela injeção. Todos os animais foram submetidos à ovariectomia e coleta dos ovários, submetidos a avaliação macroscópica. Também foram verificadas associações entre o sucesso da técnica e variáveis como idade, peso, ordem de parto e fase do ciclo estral. A injeção foi bem-sucedida em 57,1% (24/42) dos ovários, com 58% de acertos no ovário esquerdo. O tempo de execução da técnica apresentou diferença estatística entre os ovários ($P < 0,05$), sendo o tempo médio de $17,36 \pm 12,53$ minutos e $29,90 \pm 12,13$ minutos para os ovários esquerdo e direito, respectivamente. Além disso, os resultados indicaram maior viabilidade da técnica em gatas no estro e interestro ($P < 0,05$). As medidas ovarianas pré e pós-injeção aferidas por ultrassonografia, evidenciaram aumento das dimensões ovarianas após a injeção ($P < 0,05$). Não foram observadas complicações durante o estudo, comprovando a segurança da técnica. Estes resultados indicam que a injeção intraovariana guiada por ultrassonografia é possível em felinas.

Palavras-chave: Quimioesterilização. Entrega de solução. Ovário. Técnica minimamente invasiva. Estro. Interestro.

ABSTRACT

The search for less invasive and effective methods of chemical sterilization in domestic animals is increasing, driven by the growing number of stray animals, particularly in developing countries. This study aimed to develop an ultrasound-guided intraovarian injection technique in female cats to facilitate the delivery of sclerosing agents with potential chemical sterilization properties. For this purpose, 0.1 mL of 40% patent blue dye (diluted in 0.9% sodium chloride) was injected into the left and right ovaries of 21 female cats via percutaneous ultrasound-guided injection. Measurements of ovarian width, length, and diameter were assessed before and immediately after the injection to identify parameters indicative of successful or failed application and to determine if ultrasound would be capable of accurately identifying the organ. Following the injections, the animals underwent celiotomy and abdominal cavity inspection to check for possible leakage of the injected content, perforations or lacerations of adjacent organs, and to confirm whether the ovary had been stained by the injection. All animals were subjected to ovariohysterectomy and collection of the ovaries, which were then subjected to macroscopic evaluation. Associations between the success of the technique and variables such as age, weight, parity, and estrous cycle phase were also examined. The injection was successful in 57.1% (24/42) of the ovaries, with a 58% success rate in the left ovary. The execution time of the technique showed statistical differences between the ovaries ($P < 0.05$), with average times of 17.36 ± 12.53 minutes and 29.90 ± 12.13 minutes for the left and right ovaries, respectively. Additionally, the results indicated greater viability of the technique in cats in estrus and interestrus ($P < 0.05$). Pre- and post-injection ovarian measurements assessed by ultrasound showed an increase in ovarian dimensions after the injection ($P < 0.05$). No complications were observed during the study, confirming the safety of the technique. These results indicate that ultrasound-guided intraovarian injection is feasible in felines.

Keywords: Chemosterilization. Solution delivery. Ovary. Minimally invasive technique. Estrus. Interstro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: (A) Imagem ultrassonográfica abdominal de felina com a seta branca indicando o polo caudal do rim e a seta amarela indicando o ovário esquerdo; (B) Agulha de calibre 22G acoplada em seringa de 1ml posicionada cranialmente e angulada 45° em relação ao transdutor; (C) Momento da injeção intraovarina com a seta branca apontando para a agulha no interior do órgão; (D) Ovário esquerdo corado, indicando o sucesso da técnica.....26
- Figura 2: Imagem de avaliação macroscópica de parênquima ovariano da espécie felina, após injeção intraovariana de 0,1ml de azul patente 40% sob orientação ultrassonográfica.....27
- Figura 3: Imagens ultrassonográficas em modo B de ovários da espécie felina em plano longitudinal com transdutor de 12MHz. (A) Medidas ovarianas antes da injeção; (B) mensurações após a injeção percutânea.....30
- Figura 4: Imagens ultrassonográficas em modo B de ovários da espécie felina em plano longitudinal com transdutor de 12MHz. (A) Parênquima ovariano antes da injeção, sem alterações dignas de nota (seta); (B) Parênquima ovariano apresentando áreas hipoeecóicas depois da injeção (seta).....31
- Figura 5: Fotografia do acesso retroumbilical para celiotomia e ovariohisterectomia de uma das gatas. Nota-se presença de corante livre na cavidade abdominal, após injeção intraovariana guiada através de ultrassonografia.....31
- Figura 6: Fotomicroscopia em aumento de 40x de amostras de citologia vaginal de felinas colhidas imediatamente antes do procedimento de injeção intraovariana guiada através de ultrassonografia. (A) amostra compatível com diestro (predominância de pequenas células intermediárias) (seta); (B) amostra compatível com estro (predominância de células cornificadas) (seta); (C) amostra compatível com interestro, (menos de 50% de células cornificadas (seta amarela) e predominância de grandes células intermediárias) (seta preta).....32
- Figura 7: Curva de aprendizado para a realização da técnica de injeção intraovariana percutânea guiada por ultrassonografia.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das mensurações ovarianas de comprimento, largura e diâmetro dos ovários puncionados, pré e pós injeção.....	30
Tabela 2: Associação entre efetividade da técnica de injeção intraovarina sob orientação ultrassonográfica, na espécie felina e fase do ciclo estral.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Anatomia ovariana na espécie felina e aspectos ultrassonográficos.....	13
2.2 Saúde pública e novos métodos de controle populacional	13
2.3 Esterilização química em fêmeas	16
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Geral	18
3.2 Específicos.....	18
4 ARTIGO CIENTÍFICO	19
5 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A superpopulação de cães e gatos abandonados é um problema de saúde pública mundial, sendo ainda mais relevante em países subdesenvolvidos (JANA; SAMANTA, 2007). Tal condição propicia alta disseminação de zoonoses, bem como possui impacto negativo no bem-estar animal.

Para o controle populacional eficiente é necessária a esterilização em larga escala (GUNTHER et al., 2022). A ovariectomia em fêmeas e a orquiectomia em machos são as técnicas mais comumente utilizadas. Todavia, são técnicas onerosas, necessitam de infraestrutura adequada, equipe veterinária e cuidados pós-operatórios, fatores que as tornam inviáveis para o controle de animais abandonados (ADIN, 2011).

Para contrapor esses obstáculos, métodos esterilizantes alternativos à castração cirúrgica estão sendo estudados nas últimas décadas, destacando-se a quimioesterilização em machos. Essa técnica consiste na injeção de diferentes substâncias via intratesticular, intraepididimal ou no ducto deferente, que culminam com a destruição das células germinativas. Assim, estudos com diferentes compostos já foram realizados, no entanto, destacam-se o uso do cloreto de cálcio (MASSEI; MILLER, 2013) e o gluconato de zinco (SEID; TEREFE, 2019). A eficácia da quimioesterilização de cães e gatos machos com cloreto de cálcio, já é comprovada em diversos estudos (JANA; SAMANTA, 2011; LEOCI et al., 2014; SOUMENDRA; DAS, 2017). Porém, em fêmeas há poucos relatos (CAVALIERI; HAYES, 2017); (MOGHEISEH et al., 2017), devido à dificuldade do acesso ovariano.

A eficácia da injeção intraovariana de gluconato de zinco para a quimioesterilização, em fêmeas caninas, já foi avaliada (MOGHEISEH et al., 2017). Os resultados indicaram que o composto é capaz de causar alterações no tecido ovariano, sem a ocorrência de alterações sistêmicas. No entanto, as injeções intraovarianas foram feitas por celiotomia. Assim, uma vez realizado o acesso cirúrgico, a ovariectomia ou ovariectomia podem ser facilmente realizadas, tornando a castração química em fêmeas, nesse formato, desvantajosa.

Em busca de uma alternativa menos invasiva, Cavalieri e Hayes (2017) avaliaram a viabilidade da injeção intraovariana de cloreto de cálcio 20% diluído em etanol 95% e de gluconato de zinco, guiada pela ultrassonografia transvaginal em fêmeas bovinas. Os resultados foram promissores, com a redução da massa ovariana durante o período do estudo. Todavia, os autores mencionaram dificuldades como a falta de padronização de doses e volumes a serem

injetados, bem como uma técnica que impossibilite o refluxo da solução quando injetada nos ovários.

Nesse contexto, o estudo realizado por Santos et al. (2022), padronizou a quantidade de quimioesterilizante a ser injetado nos ovários, a partir da volumetria ovariana. Desse modo, constatou-se que o volume adequado para gatas, é de 0,1 mL. Além disso, Gomes et al. (2021), descreveram a técnica de injeção percutânea intraovariana guiada por ultrassonografia em ratas, onde os autores injetaram com sucesso cloreto de sódio 0,9%, em todos os ovários do estudo. Ainda, Gomes et al. (2022), verificaram que o cloreto de cálcio a 20% diluído em etanol 95%, é capaz de causar lesão ovariana em ratas, podendo ter potencial quimioesterilizante também nesta espécie.

Todavia, ainda não é conhecida técnica padronizada e minimamente invasiva que facilite a entrega de medicamentos ou quimioesterilizantes aos ovários de gatas. Assim, nossa hipótese é de que seja possível realizar a injeção de soluções nos ovários de gatas, de forma percutânea, usando a ultrassonografia como guia. A espécie possui pequena profundidade de abdômen e menor diferença de dimensões nos indivíduos, se comparada com fêmeas caninas, por exemplo. Dessa forma, o objetivo deste estudo é padronizar a técnica de injeção percutânea intraovariana guiada por ultrassom para uso em gatas, averiguando a viabilidade de execução de acordo com os fatores: idade, peso, ordem de parto e fase do ciclo estral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia ovariana na espécie felina e aspectos ultrassonográficos

Ambos os ovários, esquerdo e direito, localizam-se caudais aos rins, e são suspensos no abdômen pelo ligamento suspensório do ovário (JOHNSON, 2022). Esses, são recobertos por uma fina bolsa originada da mesossalpinge e ao contrário das cadelas, não possui bursa ovariana. São irrigados pelas artérias ovarianas originadas na artéria aorta (JOHNSON, 2022). A drenagem é realizada pelas veias ovarianas, as quais desembocam na veia cava caudal (JOHNSON, 2022). O ovário direito, está localizado mais caudal que o esquerdo. Esse último, situa-se entre a parede abdominal e o cólon descendente, próximo à terceira ou quarta vértebras lombares, enquanto o direito está situado dorsalmente ao duodeno descendente (KEALY et al., 2012).

O pedículo do ovário inclui ligamento suspensor com sua artéria e veia ovariana e uma quantidade variada de gordura e tecido conjuntivo (FOSSUM, 2015). A parte medular do ovário contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras musculares e tecido conectivo, e o córtex contém estroma de tecido conectivo com grande número de folículos (TOBIAS & SPENCER, 2011). Dessa forma, levando-se em consideração o estudo proposto, as estruturas que devem ser cuidadosamente identificadas durante os procedimentos de ultrassonografia e injeção percutânea são: hilo renal, artéria e veia ovariana, bem como porções do intestino delgado e grosso.

Ao exame ultrassonográfico, segundo Gatel et al. (2020), o ovário esquerdo parece ser mais facilmente identificado quando comparado ao direito. Além disso, a abordagem dorsolateral é uma alternativa para visualizar o ovário direito quando houver acúmulo de gás no trato digestório. Os ovários devem ser diferenciados de linfonodos regionais, jejunal ou ileocólico, cuja gônadas em felinos apresentam como características ultrassonográficas formato ovalado, ecotextura variada e ecogenicidade homogênea, isoecoica ao córtex renal (KEALY et al., 2012). Os valores de referência para a mensuração ovariana nas gatas, são, em média, 7,1 x 13,9 mm, não havendo diferenças significativas entre as medidas dos ovários esquerdo e direito (GATEL et al., 2020). No entanto, vale ressaltar, que pode haver alterações nas medidas, de acordo com a fase do ciclo estral e/ou exposição à hormônios exógenos (JOHNSTON, 2022).

2.2 Saúde pública e novos métodos de controle populacional

A superpopulação de animais errantes é um problema de saúde pública a nível mundial, principalmente em países em desenvolvimento (JANA; SAMANTA, 2007). A população global de cães é estimada em 700 milhões (HUGHES; MACDONALD, 2013), sendo cerca de 400 milhões de cães domiciliados e 300 milhões cães de errantes em todo o mundo (ACC&D, 2013). O impacto negativo na saúde pública está relacionado à proliferação/transmissão de doenças zoonóticas (OIE, 2014). Dentre essas, destacam-se: raiva (GUPTA; GUPTA, 2019), esporotricose (THOMSON et al., 2023), leishmaniose (OMS, 2010) e doença de Chagas (COURA, 2015). Como forma de contrapor essa problemática, alguns países, a exemplo dos Estados Unidos, chegaram a realizar o procedimento de eutanásia em cerca de 2,7 milhões de animais saudáveis/ano, como método de controle populacional (JOHNSTON; RHODES, 2015). Entretanto, essa técnica não é mais utilizada para essa finalidade, por questões éticas (ABDULKARIM et al., 2021). Nesse contexto, a esterilização em massa de animais errantes ainda é considerada a principal solução para reduzir a superpopulação, juntamente com a conscientização da população humana (MITSUI et al., 2020; GUNTHER et al., 2022). Para essa finalidade, as técnicas usualmente empregadas são cirúrgicas compreendendo a ovariectomia em fêmeas e a orquiectomia em machos. Todavia, as técnicas cirúrgicas possuem desvantagens para aplicação em larga escala como: alto custo, tempo de execução, cuidados pós-operatórios, bloco cirúrgico equipado e necessidade de equipe capacitada (ADIN, 2011), assim limitando a real capacidade de aplicação em larga escala.

Como alternativa à esterilização cirúrgica, outros métodos estão sendo estudados nas últimas décadas, destacando-se a castração química. Essa se destaca pelo baixo custo, praticidade e a possibilidade do uso incentivado por organizações governamentais de saúde pública mesmo com recursos financeiros limitados (GARDE et al. 2016).

Dentre os novos métodos estudados, destacam-se os quimioesterilizantes utilizados em machos por injeção intratesticular, incluindo o uso de cloreto de cálcio (JANA; SAMANTA, 2007; PARANZINI et al., 2018). Contudo, devido à localização anatômica, a injeção intratesticular ou intraepididimária são mais fáceis de realizar em comparação à injeção intraovariana. Por esse motivo, a maioria dos estudos sobre a eficiência dos quimioesterilizantes foi realizada em machos, havendo a necessidade de padronização de técnicas para o uso dessa ferramenta em fêmeas.

A castração com quimioesterilizantes inorgânicos é obtida, em geral, por injeção intratecidual, que promove inflamação local e reações de peroxidação lipídica. Como resultado, ocorre degeneração irreversível dos gametas levando à infertilidade (OLIVEIRA et al., 2013).

2.3 Esterilização química em machos: quão avançado e comprovado já é?

Estudos em busca da esterilização química em machos são realizados há mais de cinco décadas (MASSEI & MILLER, 2013) e já foi comprovado ser uma alternativa viável à castração cirúrgica (JANA; SAMANTA, 2007). Para este objetivo, são utilizados compostos esclerosantes inorgânicos que promovem inflamação local e peroxidação lipídica levando à degeneração irreversível dos gametas e por consequência à infertilidade (OLIVEIRA et al., 2013). Esta técnica consiste na aplicação dos compostos via intratesticular ou intraepididimal e pela facilidade relacionada a localização anatômica dos testículos fora da cavidade abdominal, a maioria dos estudos foi realizada em machos.

Diversos compostos já foram estudados, no entanto, ganham destaque pelo número de trabalhos publicados o gluconato de zinco e cloreto de cálcio (MASSEI & MILLER, 2013; LEOCI et al., 2014). Alguns produtos comerciais a base de gluconato de zinco encontram-se disponíveis no mercado e foram alvos de estudos para esterilização em machos. O Testoblock® é composto por gluconato de zinco e arginina e quando utilizado em cães foi possível observar necrose tecidual testicular, atrofia testicular e azoospermia, levando a esterilização irreversível (OLIVEIRA et al., 2012). Nos Estados Unidos o Zeuterin® está disponível para uso em cães machos com idades entre três e dez meses. Já no México, Colômbia, Bolívia, Panamá e Turquia, a mesma fórmula recebe o nome de EsteriSol® e é usada em cães acima de três meses de idade (WEEDON et al., 2014).

No Brasil, uma fórmula semelhante (Infertile®), porém com o adicional de dimetilsulfóxido foi regularizada para uso há algum tempo (MASSEI & MILLER, 2013) e é aplicada por veterinários, em cães, com o intuito de atingir a esterilidade. O uso do gluconato de zinco também mostrou resultados promissores em gatos, promovendo azoospermia em 120 dias após sua aplicação intratesticular (FAGUNDES et al., 2014). Os sinais de desconforto após injeção, em gatos, foram mínimos em todos os estudos (FAGUNDES et al., 2014; KUTZLER, 2015; OLIVEIRA et al., 2013). Em cães, os sinais de desconforto foram classificados como moderado em poucos dias após a aplicação (LEVY et al., 2008; DIGANJI et al., 2017).

O cloreto de cálcio (CaCl₂) já foi testado como esterilizante em cães, gatos, roedores e bovinos (MASSEI & MILLER, 2013). Doses e concentrações já foram previamente estudadas e

estabelecidas (JANA & SAMANTA, 2011; LEOCI ET AL., 2014; KARMAKAR & DAS, 2017). Dessa forma sabe-se que este causa necrose e fibrose dos túbulos seminíferos, diminuição das células de leydig e por consequência, azoospermia (JANA & SAMANTA, 2007; LEOCI et al., 2019). Abu-Ahmed & Howaida (2015), alcançaram a esterilidade em cães, após a injeção intratesticular de CaCl₂ diluído em etanol 95% na dose de 1mg/kg. Além da dose mencionada anteriormente, o volume de CaCl₂ a ser injetado também pode ser determinado por meio das medidas testiculares de cães, facilitando seu uso na prática (LEOCI et al., 2014). Dessa forma, Jana & Samanta (2011) apontam o uso do cloreto de cálcio como uma alternativa viável à castração cirúrgica para uso em cães e gatos de países subdesenvolvidos.

2.4 Esterilização química em fêmeas

Como mencionado anteriormente, embora métodos para castração não cirúrgica em machos já estejam estabelecidos, faltam estudos semelhantes em fêmeas (CAVALIERI, 2017). Nesse sentido, vale ressaltar que, para se obter controle populacional efetivo, as fêmeas também devem ser esterilizadas.

Cavaliere & Hayes (2017) apontaram a localização intra-abdominal dos ovários como grande desafio para administração de quimioesterilizantes. Com isso, apenas um estudo foi encontrado referente à aplicação intraovariana de gluconato de zinco, mas através de celiotomia em cinco cadelas. Os animais passaram por avaliação ultrassonográfica durante 60 dias, sendo possível verificar a redução das medidas ovarianas. Após esse período, os animais foram castrados cirurgicamente e os ovários foram avaliados através de exame histopatológico, apresentando atresia folicular e ausência de corpos lúteos (MOGHEISEH et al., 2017). No entanto, há necessidade de estudos com técnicas minimamente invasivas que substituam a celiotomia para acesso ovariano.

Buscando por alternativa com menor grau de invasividade, Cavaliere (2017), avaliou a técnica de injeção transvaginal guiada por ultrassom para quimioesterilização de vacas. Os resultados foram promissores nos animais que receberam o tratamento com cloreto de cálcio 20%, que também não apresentaram sinais clínicos sugestivos de dor. No entanto, nesse experimento, a esterilização propriamente dita não foi atingida na maioria dos animais, existindo porções ovarianas ainda funcionais remanescentes. Os autores indicaram que doses/concentrações e volumes a serem injetados deveriam ser padronizados e que novas técnicas de administração que atinjam o órgão com maior efetividade e evitem refluxo do composto, deveriam ser testadas.

Nesse contexto, o estudo realizado por Santos et al. (2022), objetivou padronizar o volume de quimioesterilizante a ser injetado nos ovários, a partir da volumetria ovariana de cadelas e gatas. O estudo refere que o volume adequado para fêmeas de felinas domésticas é de 0,1 mL. Além disso, Gomes et al. (2021) descreveram a técnica de injeção percutânea intraovariana guiada por ultrassonografia em ratas, obtendo-se excelentes resultados. Em 2022, o estudo realizado por Gomes et al. (2022), em ratas, indica que o cloreto de cálcio a 20% diluído em etanol 95%, pode ser um agente potencial para a quimioesterilização de fêmeas, de forma minimamente invasiva. Em outro contexto, Dai et al. (2024), também demonstraram efetividade satisfatória ao criarem um modelo de injeção intraovariana guiada através de ultrassonografia, em ratas, comprovando a viabilidade e segurança da técnica. Todavia, ainda faltam estudos para padronização do procedimento de injeção ecoguiada nos ovários de gatas.

Com isso, o presente estudo apresenta relevância significativa pois visa a adaptação da técnica descrita por Gomes et al. (2021) para uso em gatas: técnica minimamente invasiva que potencialmente poderá ser utilizada em estudos futuros visando a castração em massa de fêmeas. Vale ressaltar que, estudos semelhantes não são encontrados em animais de interesse de controle populacional.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver e testar a técnica para injeção intraovariana guiada por ultrassom em gatas e verificar fatores associados ao paciente que possam facilitar a sua execução.

3.2 Específicos

1. Analisar se a metodologia proposta permite a entrega de soluções para os ovários em gatas;
2. Determinar a acurácia da ultrassonografia em predizer se houve acerto do órgão alvo (ovário) através da comparação entre as dimensões ovarianas adquiridas antes e depois da injeção;
3. Avaliar se há influência da idade, peso e fase do ciclo estral no sucesso da técnica;
4. Comparar tempo e sucesso da técnica entre os ovários direito e esquerdo e percentual de sucesso.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Standardization of technique for ultrasound-guided percutaneous intraovarian injection in queens

Vitória Caroline Aires Silveira^{1*} Etiele Maldonado Gomes¹

Endreo Alan Pail dos Santos¹ Dimas Dal Magro Ribeiro¹

Marília Tereza de Oliveira¹ Ingrid Rios Lima Machado¹

Diego Vilibaldo Beckmann¹ Maria Ligia de Arruda Mestieri¹

ABSTRACT

Chemical sterilization is well established for male dogs and cats and has been used worldwide as a low-cost method for population control. However, minimally invasive methods for ovarian access remain scarce and are necessary to advance studies aimed at inhibiting reproduction in female cats and dogs. The objective of this study is to describe and evaluate the success of percutaneous ultrasound-guided intraovarian injection in female cats. In this study, 21 domestic shorthair cats, aged between 6 months and 5 years and weighing from 1.9 to 3.5 kg, underwent sedation and abdominal ultrasonography. In dorsal recumbency, the left ovary was located, and 0.1 mL of 40% patent blue dye was injected. Ovarian width, length, and diameter measurements were assessed by ultrasound before and immediately after the injections to determine the success of the injection. The time taken for the injection was recorded. The same procedure was repeated for the right ovary. Subsequently, the animals were subjected to general anesthesia and exploratory celiotomy to detect possible leakage of the injected content and the presence of perforations and/or lacerations of adjacent organs. Ovariohysterectomy was performed, and the ovaries were collected for macroscopic evaluation. Age, weight, parity, and estrous cycle phase

were statistically investigated in association with the success of the technique. Out of 42 ovaries, 24 injections were successful. The highest success rate was observed in the left ovary, with a 58% success rate. The time required to perform the technique differed statistically between the ovaries, being more efficiently performed on the left ovary ($P < 0.05$). The results indicate that the technique is feasible, particularly in animals in estrus and interestrus phases ($P < 0.05$). Additionally, pre- and post-injection ovarian measurements demonstrated the capability of ultrasonography to assess the success of the technique, as evidenced by a significant increase in ovarian dimensions post-injection ($P < 0.001$). These findings suggest that accessing the ovaries of female cats for compound deposition without surgical intervention is possible. Furthermore, no complications were observed during the study, confirming the safety of the technique.

Key words: Minimally invasive technique; ovary; females; solution delivery; chemosterilization

RESUMO

A esterilização química está bem estabelecida para cães e gatos machos. Tem sido utilizada em todo o mundo como um método de baixo custo para controle populacional. No entanto, métodos minimamente invasivos para acesso ovariano ainda são escassos e são necessários para possibilitar o progresso de estudos que visam inibir a reprodução em gatas e cadelas. O objetivo deste estudo é descrever e avaliar o sucesso da injeção intraovariana percutânea guiada por ultrassonografia em gatas. Para o estudo, 21 gatas, sem raça definida, com idade entre 6 meses e 5 anos e pesando de 1,9 a 3,5kg foram submetidas a sedação e ultrassonografia abdominal. Em decúbito dorsal, o ovário esquerdo foi localizado e 0,1 mL de corante azul patente a 40% foi injetado. As medidas de largura, comprimento e diâmetro dos

ovários foram avaliadas por ultrassonografia antes e imediatamente após as injeções para identificar o sucesso da injeção. O tempo gasto até a injeção foi coletado. O mesmo procedimento foi repetido para o ovário direito. Subsequentemente, os animais foram submetidos à anestesia geral e celiotomia exploratória para detectar possíveis extravasamentos do conteúdo injetado e presença de perfurações e/ou lacerações de órgãos adjacentes. Foi realizada a ovariohisterectomia e os ovários foram coletados para avaliação macroscópica. Idade, peso, ordem de parto e fase do ciclo estral foram investigados estatisticamente em associação com o sucesso da técnica. De 42 ovários, 24 injeções foram bem-sucedidas. A maior taxa de sucesso foi no ovário esquerdo, com 58% de acerto. O tempo necessário para executar a técnica diferiu estatisticamente entre os ovários, sendo realizado de forma mais eficiente no ovário esquerdo ($P < 0,05$). Os resultados indicam que a técnica é viável, particularmente em animais nas fases de estro e interestro ($P < 0,05$). Além disso, as medidas ovarianas pré e pós-injeção demonstraram a capacidade da ultrassonografia de determinar o sucesso da técnica, evidenciado pelo aumento significativo nas dimensões ovarianas após a injeção ($P < 0,001$). Estes resultados mostram que é possível acessar os ovários de gatas para a deposição de compostos sem intervenção cirúrgica. Ainda, não foram observadas complicações durante o estudo, comprovando a segurança da técnica.

Palavras-chave: Técnica minimamente invasiva; ovário; fêmea; entrega de solução; quimioesterilização

INTRODUÇÃO

A entrega de medicamentos para órgãos-alvos de forma percutânea e direcionada por ultrassom, é amplamente utilizada na rotina clínica e experimental (BERGAMINO et al., 2015; HOEBER et al., 2016; THIN et al., 2020; DAI et al., 2024). Esta abordagem é conhecida por

aumentar a eficiência dos efeitos desejados dos fármacos e diminuir efeitos colaterais por direcioná-los de forma local e não sistêmica (DELANEY et al., 2022). Na reprodução, a injeção intra-ovariana é bem estabelecida para uso em humanos (CAKIROGLU et al., 2020), bovinos (MALARD et al., 2020) e equinos (GRADY et al., 2019), sendo a ultrassonografia transvaginal o meio de acesso. Recentemente, foi descrita a injeção intraovariana percutânea guiada por ultrassonografia em animais experimentais (GOMES et al., 2021; DAI et al., 2024). Esta abordagem permitiu a realização de tratamentos medicamentosos diretamente nos ovários com diferentes objetivos (DAI et al., 2024; CAKIROGLU et al., 2020; GOMES et al., 2022),

Dentro do contexto de injeção em órgãos-alvo, quimioesterilização se tornou alvo de estudos, pois a superpopulação de errantes é um desafio ao controle, principalmente em países em desenvolvimento (JANA; SAMANTA, 2007). Órgãos governamentais possuem forte interesse nestas metodologias, pois contrapõem algumas limitações da castração cirúrgica como, alto custo, montagem de bloco cirúrgico, equipe, instrumentais e necessidade de cuidados pós-operatórios (ADIN, 2011).

O uso de compostos esclerosantes com o intuito de realizar a castração química surgiu como promessa para facilitar a esterilização em larga escala e possui estudos e ampla utilização em machos (JANA; SAMANTA, 2011; KARMAKAR; DAS, 2017; LEOCI et al., 2014). Cavalieri & Hayes (2017) exploraram a castração química de fêmeas bovinas com injeção intraovariana de cloreto de cálcio e gluconato de zinco guiadas por ultrassonografia e apontaram a localização intra-abdominal dos ovários como limitação para a execução da técnica. Os autores indicaram que a volumetria ovariana e técnicas que evitassem o refluxo do composto injetado, deveriam ser estudadas para viabilizar novas pesquisas.

Nosso grupo de pesquisa abordou este tema em estudos prévios e a quantidade de volume líquido a ser injetado nos ovários de gatas foi feita pela volumetria ovariana, sendo 0,1

mL foi determinado como suficiente para a felinas (SANTOS et al., 2022). A padronização da técnica de injeção intraovariana percutânea guiada por ultrassom foi realizada previamente também por esse mesmo grupo, em ratas (GOMES et al., 2021). Posteriormente, cloreto de cálcio em diferentes concentrações foi testado por meio da injeção intraovariana ecoguiada também em animais experimentais (GOMES et al., 2022).

Contudo, ainda não existe uma técnica minimamente invasiva descrita para a entrega de soluções aos ovários de gatas. Neste estudo levantamos a hipótese de que seja possível realizar a injeção de soluções nos ovários de gatas, de forma percutânea, usando a ultrassonografia como guia. Nosso objetivo foi testar a técnica e verificar se fatores como idade, peso, ordem de parto e fase do ciclo estral tem associação com o sucesso da técnica. O estudo também investigou se o acerto do órgão poderia ser visibilizado por meio de ultrassonografia e para isso, utilizou as comparações de medidas ovarianas pré e pós-injeção. Completar com todos os objetivos do estudo aqui.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado (nº 029/2022) e seguiu as orientações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) e da Resolução Normativa nº 30/2016 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Animais e desenho experimental

O estudo foi realizado com 21 fêmeas da espécie felina, sem raça definida e clinicamente saudáveis. Os animais foram selecionados a partir de uma fila de espera para realização de ovariohisterectomia eletiva, no Hospital Universitário Veterinário (HUVet) da Universidade

Federal do Pampa (UNIPAMPA). Anterior à cirurgia, as gatas passaram por consulta clínica com anamnese, exame físico, coleta de sangue para hemograma e análises bioquímicas para avaliação das funções renais e hepáticas, e eletrocardiograma e TCLE do tutor.

Como critério de inclusão no estudo, foram selecionados apenas os animais que não apresentaram nenhuma alteração no exame clínico e nos exames complementares. Ainda, nesse momento, os seguintes dados foram compilados: peso, idade e ordem de parto. De acordo com estes dados, os animais foram divididos em categorias, sendo essas: abaixo e acima de 2,5kg; abaixo e acima de 1 ano de idade; se eram nulíparas, primíparas ou múltíparas. Ainda, após realização de citologia vaginal, as gatas também foram agrupadas de acordo com a fase do ciclo estral em que se encontravam no dia do procedimento da injeção intraovariana.

O estudo ocorreu durante os meses de abril a outubro de 2023 e preconizou-se que a avaliação ultrassonográfica e realização da punção ovariana, fosse realizada sempre pelo mesmo avaliador. Após a realização do procedimento ecoguiado, era realizada a celiotomia exploratória, ovariohisterectomia e coleta dos ovários para posterior avaliação macroscópica.

Ambientação e preparação dos animais

Os animais foram recebidos no gatil do HUVet 12 horas antes do início dos procedimentos para ambientação, sendo que para auxiliar nesse momento, previamente a chegada dos mesmos, Feliway Classic® (Ceva Saúde Animal, Paulínia, Brasil) foi borrifado no local. Um período de 8 horas de jejum alimentar foi instituído e, em sequência, com o intuito de diminuir a reatividade à manipulação respeitando o bem-estar animal, administrou-se uma cápsula de gabapentina 100 mg/animal (HAAFTEN et al., 2017; PANKRATZ et al., 2018). Assim, prosseguiu-se com a tricotomia ampla do abdômen e flanco.

Protocolo Anestésico

Todas as gatas receberam o mesmo protocolo anestésico. Este foi dividido em duas etapas: 1) protocolo para o procedimento de injeção intraovariana sob orientação ultrassonográfica e 2) protocolo para a realização de ovariectomia eletiva. O protocolo 1, consistiu na administração de butorfin® 1% (Vetnil, Louveira, Brasil) na dose de 0,15 mg/kg via intramuscular (IM); dexdomitor® (Zoetis, Campinas, Brasil) na dose de 0,0075 mg/kg (IM); Zoletil® (Virbac, Leopoldina, Brasil) na dose de 3 mg/kg (IM) (ROBERTSON et al., 2018; KREISLER et al., 2020). Já o protocolo 2, consistiu na indução dos animais à anestesia geral com propofol (Cristália, Campinas, Brasil) dose-efeito (4-8mg/kg). A seguir, foi realizado o bloqueio periglótico com 0,2ml de lidocaína 2% sem vasoconstritor (Cristália, Campinas, Brasil) e procedeu-se a intubação e manutenção do plano anestésico com isoflurano.

Citologia Vaginal

Previamente ao procedimento, um *swab* umedecido com solução salina foi direcionado craniodorsalmente na região caudal da vagina, com intuito de realizar a coleta das células epiteliais. As células foram transferidas para uma lâmina de vidro, por rolamento, e foram coradas utilizando o método Panótico Rápido® (Laborclin, Pinhais, Brasil). A análise foi realizada em microscópio óptico num aumento de 400X.

Os tipos celulares foram classificados em parabasais, pequenas intermediárias, grandes intermediárias e superficiais com núcleo e sem núcleo (JOHNSON, 2022). Baseado na proporção das células foi definida a fase do ciclo estral, podendo ser classificada em proestro, estro, interestro e diestro (JOHNSON, 2022).

Solução de corante azul patente a 40%

Previamente aos procedimentos, de forma asséptica, foi realizada a preparação da solução a ser injetada nos ovários, no momento do uso. Esta consistiu na aspiração de 0,04 mL

de corante azul patente (Bleu Patenté V®, Guerbet, Rio de Janeiro, Brasil), com o auxílio de uma agulha hipodérmica de calibre 22G (30 x 0,70mm) (Medix®, Cascavel, Brasil) acoplada a uma seringa de 1 mL. Na sequência, na mesma seringa, foi aspirado 0,06 mL de solução fisiológica NaCl 0,9%.

Ultrassonografia

Para o estudo, um aparelho de ultrassonografia equipado com transdutor linear multifrequencial de 12 MHz (GE Logiq P9, GE HealthCare, São Paulo, Brasil) foi utilizado. Foram aferidos largura e comprimento ovarianos em dois momentos: pré e pós-injeção. No momento da injeção, também foi anotado se foi possível identificar extravasamento do conteúdo injetado nos ovários para a cavidade abdominal pelo ultrassom. Além disso, imediatamente após a injeção, foi feita a avaliação criteriosa da ecotextura ovariana, assim como varredura abdominal em busca de possíveis focos de líquido livre e/ou imagens que fossem sugestivas de perfurações e/ou lacerações de órgãos adjacentes. O tempo total de procedimento e tempo total de procedimento para cada ovário também foram compilados.

Padronização da injeção intraovariana percutânea guiada por ultrassom

Inicialmente, os animais foram posicionados e mantidos em decúbito dorsal, com o auxílio de calha de espuma. A antissepsia prévia foi realizada na região ventro-lateral do abdômen com solução de clorexidina a 2% (Riohex 2%, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil) e a definitiva com solução de clorexidina alcoólica a 0,5% (PharmaVet, Uruguaiana, Brasil). Em sequência, iniciou-se o procedimento ultrassonográfico em busca dos ovários esquerdo e direito, respectivamente. A sonda foi embrulhada em filme plástico com gel de contato dentro e clorexidina 0,5% gel foi utilizada como gel de contato com a pele do animal.

Para a localização dos ovários, tomou-se como referência os polos caudais dos rins, seguindo varredura caudomedial e caudolateral, permitindo a identificação dos ovários como uma estrutura hipoeoica e de formato ovalado (Figura 1-A). Após a primeira visualização pelo avaliador, as seguintes etapas foram seguidas: (1) mensuração do comprimento e largura do ovário pré-injeção (M1); (2) a agulha acoplada na seringa de 1 mL previamente preparada, contendo 0,1 mL de corante azul patente a 40%, foi posicionada cranialmente e angulada 45° em relação ao transdutor (Figura 1-B); (3) a agulha foi direcionada em direção ao parênquima ovariano e, então, a sua introdução no órgão foi realizada até a região medular (Figura 1-C); (4) o conteúdo da seringa foi injetado no órgão; (5) o avaliador anotou se houve indício ultrassonográfico de extravasamento do composto para a cavidade abdominal; (6) imediatamente após a deposição do composto no ovário, as medidas de largura e comprimento foram compiladas novamente (M2) (Tabela 1).

O diâmetro ovariano foi estimado usando a fórmula $D = (\text{comprimento} + \text{largura}) / 2$, utilizando as medidas ovarianas obtidas ao exame ultrassonográfico (Tabela 1). Além disso, o tempo total de procedimento e o tempo individual para conseguir introduzir a agulha em cada ovário, foram cronometrados e anotados. Ressalta-se que foi padronizado o tempo máximo de 1 hora para que o procedimento fosse concluído em ambos os ovários, sendo que sempre era iniciado pelo ovário esquerdo, por conta da sua localização anatômica facilitada.

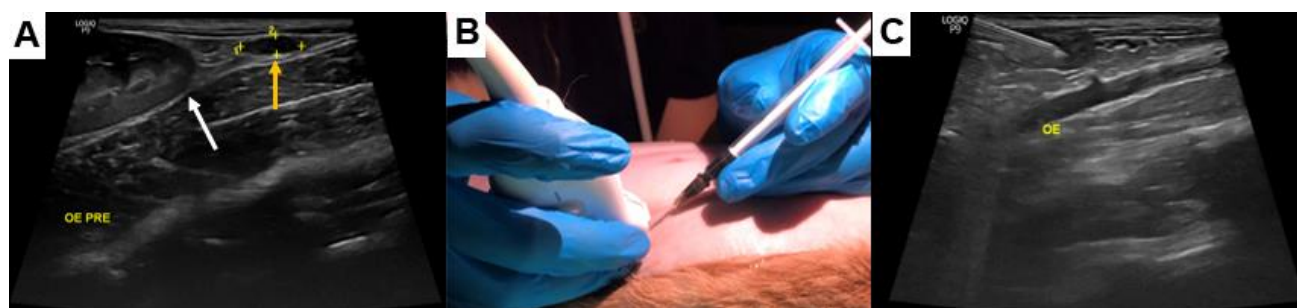


Figura 1 – (A) Imagem ultrassonográfica abdominal de gata com a seta branca indicando o polo caudal do rim e a seta amarela indicando o ovário esquerdo; (B) Agulha de calibre 22G acoplada em seringa de 1 mL posicionada cranialmente e angulada 45° em relação ao transdutor; (C)

Momento da injeção intraovarina com a seta branca apontando para a agulha no interior do órgão.

Ovariohistectomia e avaliação macroscópica

Ao término do procedimento ecoguiado, os animais foram submetidos à celiotomia exploratória, para inspeção e busca de perfurações de órgãos adjacentes aos ovários bem como a possível coloração da cavidade abdominal, indicando extravasamento do conteúdo injetado. Foi realizada ovariohistectomia, os ovários coletados, seccionados em seu eixo longitudinal e avaliados à macroscopia. A injeção foi considerada assertiva quando o parênquima ovariano estava claramente preenchido pelo corante (Figura 2).



Figura 2 – Imagem de avaliação macroscópica de parênquima ovariano da espécie gata, após injeção intraovariana de 0,1 mL de azul patente 40% sob orientação ultrassonográfica e após ovariohistectomia. A seta preta aponta para um ovário não corado e a seta amarela para um ovário corado.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software IBM SPSS Statistics (versão 20.0). As variáveis quantitativas como tempo total de procedimento, tempo total de procedimento para cada ovário, idade, peso e dimensões ovarianas foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk.

O teste t foi usado para comparar o tempo de procedimento para acertar os ovários corados esquerdo e direito. O teste de Wilcoxon foi realizado para comparar as medidas ovarianas antes e pós-injeção. Ademais, foi calculada a taxa de aumento médio das dimensões dos ovários acertados. Ainda, o teste exato de Fischer foi utilizado para avaliar a associação entre efetividade para acerto dos ovários e as seguintes variáveis: idade; peso; ordem de parto; fase do ciclo estral. O valor $P < 0,05$ foi considerado significativo para todas as análises descritas acima.

RESULTADOS

Em 24/42 ovários, a agulha foi inserida efetivamente no parênquima do órgão (57,1%), e, desses, 14/24 (58%), foram o ovário esquerdo. O tempo para conseguir acertar ambos os ovários diferiram estatisticamente ($P < 0,05$), sendo o tempo médio de $17,36 \pm 12,53$ minutos e $29,90 \pm 12,13$ minutos para os ovários esquerdo e direito, respectivamente.

As dimensões ovarianas dos ovários acertados (Tabela 1) aumentaram significativamente após a injeção quando comparadas às medidas antes da mesma ($P < 0,001$). O aumento foi equivalente a 44% do diâmetro ovariano. Já as medidas dos ovários não acertados (Tabela 1), não diferiram entre um momento e outro ($P > 0,05$). Outra característica sonográfica observada após as injeções efetivas, foi a mudança da ecogenicidade do órgão, com

formação de áreas hipoeecóicas intraparenquimatosas e irregularidade do contorno do órgão (Figura 3).

Em todos os animais foi observado no momento da injeção, indícios de extravasamento do composto para a cavidade abdominal. Isso, se confirmou à medida que era realizada a celiotomia exploratória e notava-se resquícios de corante livre na cavidade.

Tabela 1 – Descrição das mensurações ovarianas de comprimento, largura e diâmetro dos ovários puncionados, pré e pós injeção.

	Mensuração ovariana (mm)	Pré-injeção	Pós-injeção
Ovários acertados	Comprimento	9,42 ± 1,23 ^b	10,55 ± 2,10 ^a
	Largura	3,26 ± 0,61 ^b	4,13 ± 0,94 ^a
	Diâmetro	15,37 ± 3,47 ^b	21,85 ± 6,38 ^a
Ovários não acertados	Comprimento	10,07 ± 1,73	10,12 ± 1,56
	Largura	2,93 ± 0,50	3,23 ± 0,78
	Diâmetro	16,45 ± 6,11	16,62 ± 5,93

Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística. Nível significativo em $P < 0,01$.

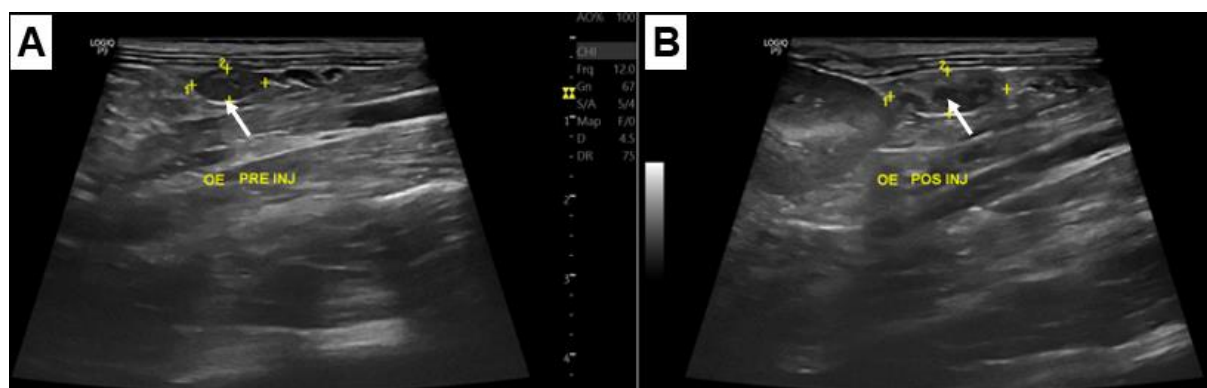


Figura 3 – Imagens ultrassonográficas em modo B de ovários de gata em plano longitudinal com transdutor de 12MHz. (A) Parênquima ovariano antes da injeção, notar que é homogêneo, hipoeecóico e com contorno regular (seta); (B) Parênquima ovariano apresentando áreas hipoeecóicas depois da injeção (seta).

A associação entre o acerto da técnica com a fase do ciclo estral mostrou-se significativa ($P < 0,05$). Todas as gatas em que os ovários não estavam corados (sem acerto) encontravam-

se em diestro. Já quando houve um ou os dois ovários corados, as gatas estavam no estro ou interestro (Tabela 2), de acordo com citologia vaginal.

Já a associação entre o sucesso do acerto dos ovários com as variáveis peso, idade e número de partos não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$).

Tabela 2 – Associação entre efetividade da técnica de injeção intraovarina sob orientação ultrassonográfica, em gatas e fase do ciclo estral.

Acerto	Fase do ciclo estral			Total
	Diestro	Interestro	Estro	
Sem acerto	5 ^a	0 ^b	0 ^b	5
Acerto em um ovário	4 ^a	3 ^a	1 ^b	8
Acerto em dois ovários	0 ^c	5 ^a	3 ^b	8
Total	9	8	4	21

Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística. Nível significativo em $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

Acredita-se que localização anatômica (LÈVY; FONTBONNE, 2007) do ovário direito tenha contribuído para o percentual de acertos nesse antímero ser menor. Ainda, tempo dispendido para a realização da técnica ser maior demonstra a dificuldade encontrada para a visibilização do ovário direito em alguns animais. Isso pode estar relacionado ao ovário direito encontrar-se mais cranialmente que o ovário esquerdo e, além disso, ser recoberto pelo arco costal (HOLUBIEV et al., 2023), dificultando a execução da técnica.

Essa dificuldade inviabilizaria a técnica proposta para o uso de compostos esclerosantes com o intuito de realizar castração química, pois é necessário que a injeção seja efetivamente realizada nos dois ovários. Levantamos a hipótese de que a apreensão dos ovários, conforme a técnica descrita por Gomes et al. (2021) em ratas, seria fundamental para maior taxa de acertos. Porém, apesar da facilidade de realizar a palpação dos órgãos abdominais, não foi possível realizartal apreensão nas gatas. Essa observação é muito relevante na prática, pois se a entrega aos ovários for necessária bilateralmente, assim como seria na quimioesterilização, a tentativa

de acerto minimamente invasivo deveria ser iniciada pelo lado direito, uma vez que tendo acertado este, a chance de conseguir ambos será maior. Apesar dessa dificuldade, ao realizar a celitomia, não foi observada nenhuma complicação oriunda da técnica, como perfurações e/ou lacerações de órgãos adjacentes.

Com relação as diferenças entre as medidas ovarianas pré e pós-injeção dos ovários acertados, notou-se que ultrassonografia foi um método eficaz para verificar o acerto do órgão e, por consequência, o sucesso da técnica na prática, conforme já foi observado também por Gomes et al. (2021) e Dai et al. (2024). Além do aumento significativo nas mensurações dos ovários injetados, a mudança na característica sonográfica, com formação de áreas hipoecóicas intraparanquimatosas e irregularidade do contorno do órgão, imediatamente após a injeção, indicou que o composto havia sido injetado no parênquima ovariano. Estas observações são consistentes com os critérios de injeção de fármacos ecoguiados (KLUNKLIN et al., 2022).

Essas observações foram validadas ao realizar a avaliação macroscópica dos ovários acertados, posterior a avaliação ultrassonográfica. Isso demonstra que, embora a injeção de compostos sob orientação ultrassonográfica sem a apreensão dos ovários em gatas seja de difícil execução, é um método seguro, pois é possível inferir se a injeção atingiu o órgão, por mensurações sequenciais e da avaliação das características sonográficas do mesmo.

Apesar disso, o extravasamento de conteúdo para a cavidade abdominal foi observado em todos os animais pela presença de coloração discreta azul, difundida pela cavidade e líquido peritoneal. Essa observação traz atenção ao tipo de compostos que será injetado nos ovários; em se tratando de substâncias esclerosantes (quimioesterilizantes) deve haver cautela no uso da presente técnica. A escolha do composto e/ou da sua concentração deve levar em conta que ele tem altas chances de se distribuir pelo peritônio e vísceras, mesmo com o acerto dos ovários, podendo ocasionar danos teciduais adjacentes como observado por Gomes et al. (2022) em algumas ratas do estudo.

Neste estudo, não foi possível afirmar se o extravasamento esteve relacionado ao volume injetado no órgão, tipo de agulha utilizado ou até mesmo erro na introdução da agulha no órgão, ultrapassando o mesmo. Acredita-se que o volume utilizado tenha sido adequado, pois essa volumetria foi previamente padronizada por Santos et al. (2022) para gatas. Dai et al. (2024) não relataram indícios e nem intercorrências oriundas de extravasamentos em seu estudo com ratas. Os autores utilizaram a mesma agulha proposta neste estudo, porém calcularam o volume a ser injetado de acordo com o peso do órgão ao invés da área, dando indícios de que volumetrias mais precisas e individualizadas são possíveis e poderão ser estudadas futuramente em outras espécies de interesse. Em estudo piloto prévio (dados não publicados), testamos a realização da injeção intraovariana por celiotomia, testando a agulha e a aplicação do corante na diluição proposta. No estudo piloto, não foi observado indícios de extravasamento no momento da injeção ou retirada da agulha.

O maior número de acertos foi em gatas durante o estro e interestro o que pode estar relacionado ao aumento do órgão, principalmente em seu comprimento e volume (CAMARGO et al., 2021) e com o aumento do fluxo sanguíneo que ocorre nesta fase, facilitando a visibilidade e diferenciação da ecotextura ovariana (VERCELLINI et al., 2022). Apesar de não haver significância estatística entre o sucesso da técnica e as variáveis peso, idade e ordem de parto, numericamente observou-se que 75% das vezes em que a técnica foi bem-sucedida, os animais possuíam idade inferior a 1 ano, pesavam acima de 2,5kg e eram nulíparas. Maiores conclusões deverão ser verificadas em estudos com maior população. Entretanto, os resultados indicam que critérios de seleção podem ser utilizados na escolha dos indivíduos em que a técnica seria aplicada para maiores chances de sucesso.

CONCLUSÃO

A técnica de injeção intraovariana, sob orientação ultrassonográfica em gatas é possível. Houve maior assertividade em animais na fase de estro e interestro e no ovário esquerdo. A ultrassonografia é capaz de prever o sucesso da técnica ao avaliar se houve aumento significativo das dimensões ovarianas como diâmetro, comprimento e largura, além de ser eficaz para visualização de possíveis extravasamentos intracavitários durante o procedimento. Apesar dos extravasamentos notados não houve perfurações e/ou lacerações em outros órgãos, evidenciando a segurança da técnica.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Os patrocinadores fundadores não tiveram nenhum papel na concepção do estudo; na coleta, análise ou interpretação de dados; na redação do manuscrito e na decisão de publicação dos resultados.

REFERÊNCIAS

ADIN, C. A. Complications of ovariohysterectomy and orchietomy in companion animals. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 41, n. 5, pág. 1023-1039, 2011.

BERGAMINO, C. et al. Developing a technique for ultrasound-guided injection of the adult canine hip. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 56, n. 4, p. 456-461, 2015.

CAKIROGLU, Y. et al. Effects of intraovarian injection of autologous platelet rich plasma on ovarian reserve and IVF outcome parameters in women with primary ovarian insufficiency. *Aging (Albany NY)*, v. 12, n. 11, p. 10211, 2020.

CAMARGO, L. S. et al. Ovarian and Oocyte Morphology During the Spring-Summer and Fall-Winter in Queens (*Felis catus*) Kept in a Tropical Climate. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 43, p. 100510, 2021.

CAVALIERI, J.; HAYES, L. Examination of the use of intraovarian administration of CaCl₂ and zinc gluconate as potential chemosterilants in *Bos indicus* heifers. **Australian veterinary journal**, v. 95, n. 11, p. 403-415, 2017.

DAI, F. et al. Model construction and drug therapy of primary ovarian insufficiency by ultrasound-guided injection. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 15, n. 1, p. 49, 2024.

DELANEY, L. J. et al. Making waves: how ultrasound-targeted drug delivery is changing pharmaceutical approaches. **Materials Advances**, v. 3, n. 7, p. 3023-3040, 2022.

GRADY, S. T. et al. Effect of intra-ovarian injection of mesenchymal stem cells in aged mares. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 36, p. 543-556, 2019.

GOMES, E. M. et al. Transcutaneous Ultrasound Guided Intraovarian Injection in Rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 60, n. 5, p. 502-505, 2021.

GOMES, E. M. et al. Calcium chloride diluted in ethanol 95% as female sterilizing agent: effect of transcutaneous delivery in rats. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2022.

HAAFTEN, K. V. A. et al. Effects of a single preappointment dose of gabapentin on signs of stress in cats during transportation and veterinary examination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 10, p. 1175-1181, 2017.

HOEBER, S. et al. Ultrasound-guided hip joint injections are more accurate than landmark-guided injections: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 50, n. 7, p. 392-396, 2016.

HOLUBIEV, O. V. et al. Advantages and difficulties of ultrasound analysis to determine the fertile period in bitches. **Theoretical and Applied Veterinary Medicine**, v. 11, n. 2, p. 14-20, 2023.

JANA, K.; SAMANTA, P. K. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. **Contraception**, v. 75, n. 5, p. 390-400, 2007.

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**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2011.

JOHNSON, A. K. Normal feline reproduction: The queen. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 24, n. 3, p. 204-211, 2022.

KARMAKAR, S. N.; DAS, S. K. Chemical and biological sciences chemosterilization induced by intratesticular injection of calcium chloride. **Internacional Journal of Pharmaceutical**. v. 7, n. 1, p. 25–35, 2017.

KREISLER, R. E. et al. Use of nalbuphine as a substitute for butorphanol in combination with dexmedetomidine and tiletamine/zolazepam: A randomized non-inferiority trial. **Journal of feline medicine and surgery**, v.22, n. 2, p. 100-107, 2020.

KLUNKLIN, K. et al. Efficacy and safety of ultrasound-guided caudal epidural steroid injection in patients with low back pain and sciatica. **Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation**, v. 35, n. 2, p. 317–322, 2022.

LEOCI, R. et al. A dose-finding, long-term study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of nonsurgical sterilization in dogs: evaluation of the most effective concentration with the lowest risk. **Acta veterinary scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2014.

LÉVY, X.; FONTBONNE, A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 1, p. 128–134, 2007.

MALARD, P. F. et al. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8018, 2020.

PANKRATZ, K. E. et al. Use of single-dose oral gabapentin to attenuate fear responses in cage-trap confined community cats: a double-blind, placebo-controlled field trial. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 20, n. 6, p. 535-543, 2018.

ROBERTSON, S. A. et al. AAEP feline anesthesia guidelines. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 20, n. 7, p. 602-634, 2018.

SANTOS, B. G. et al. Ovarian morphometry applied to the use of chemosterilant in bitches and queens. **Archives of veterinary science**, v. XX, p. x, 2022.

THIN, Z. M. et al. Stem cell delivery to kidney via minimally invasive ultrasound-guided renal artery injection in mice. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 7514, 2020.

VERCELLINI, R. et al. Ultrasonographic evaluation of ovarian morphology and blood flow in prepubertal and pubertal cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 74-78, 2018.

5 CONCLUSÃO

Este estudo investigou a viabilidade e eficácia da técnica de injeção sob orientação ultrassonográfica, para deposição de compostos nos ovários, em fêmeas de felinas domésticas. Os resultados indicam que a técnica é mais bem-sucedida em animais em estro e interestro, sugerindo uma relação entre o estágio do ciclo estral e a facilidade em visualização/manipulação ovariana. A ultrassonografia é eficiente para guiar a inserção da agulha e também medida preditiva para o sucesso da técnica. Ao avaliar as alterações do tamanho do ovário após a injeção, o exame ultrassonográfico pôde identificar efetivamente se as substâncias haviam atingido os ovários. Ainda, as imagens ultrassonográficas permitiram a detecção de qualquer extravasamento intracavitário, garantindo a segurança do procedimento.

Curiosamente, fatores como peso e idade não parecem influenciar as taxas de sucesso da injeção. Isso sugere que a eficácia da técnica é determinada principalmente pela fase do ciclo estral do animal e pela precisão ao realizar a técnica. Ao longo do estudo, não surgiram complicações decorrentes do procedimento, demonstrando a segurança da técnica para realização em gatas. No entanto, o estudo possuiu alguns fatores limitantes como, falha na constância entre um procedimento e outro, prejudicando a curva de aprendizado do operador.

REFERÊNCIAS

ABDULKARIM, A.; KHAN, M. A. K. B. G.; AKLILU, E. Stray Animal Population Control: Methods, Public Health Concern, Ethics, and Animal Welfare Issues. **World**, v. 11, n. 3, p. 319-326, 2021.

ABU-AHMED, H. M. Chemical sterilization of dogs using single bilateral intra-testicular injection of calcium chloride or clove oil. 2015.

ACC&D. Alliance for Contraception in Cats & Dogs. Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats. A Report of ACC&D, 2013. Disponível em: <https://acc-d.org/resourcelibrary/ebookOIE>.

ADIN, C. A. Complications of ovariohysterectomy and orchietomy in companion animals. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 41, n. 5, pág. 1023-1039, 2011.

BJORNVAD, Charlotte R. et al. Evaluation of a nine-point body condition scoring system in physically inactive pet cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 4, p. 433-437, 2011.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. **Brazilian journal of veterinary research**, v. 55, n. 2, p. 1-17, 2018.

CAVALIERI, J. Chemical sterilisation of animals: A review of the use of zinc-and CaCl₂ based solutions in male and female animals and factors likely to improve responses to treatment. **Animal reproduction science**, v. 181, p. 1-8, 2017.

CAVALIERI, J.; HAYES, L. Examination of the use of intraovarian administration of CaCl₂ and zinc gluconate as potential chemosterilants in *Bos indicus* heifers. **Australian veterinary journal**, v. 95, n. 11, p. 403-415, 2017.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memories of the Oswaldo Cruz Institute**, v. 110, p. 277-282, 2014.

DAI, F. et al. Model construction and drug therapy of primary ovarian insufficiency by ultrasound-guided injection. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 15, n. 1, 2024.

DIGANGI, B. A. et al. Resultados pós-operatórios de castração cirúrgica e química com gluconato de zinco em cães que se apresentam em clínicas veterinárias de campo. **The Veterinary Journal**, v. 229, p. 26-30, 2017.

FAGUNDES, A. K. F. et al. 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**, v. 81, n. 2, p. 230-236, 2014.

FOSSUM, T. W. Cirurgia de pequenos animais. 6 ed. **Elsevier Brasil**, p. 2596-3599, 2014.

FONTBONNE, A. Infertility in queens: clinical approach, experiences and challenges. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 24, n. 9, p. 825-836, 2022.

GARDE, E. et al. Effects of surgical and chemical sterilization on the behavior of free-roaming male dogs in Puerto Natales, Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 123, p. 106-120, 2016.

GATEL, L. et al. Ultrasonography of the normal reproductive tract of the female domestic cat. **Theriogenology**, v. 142, p. 328-337, 2020.

GOMES, E. M. et al. Transcutaneous Ultrasound Guided Intraovarian Injection in Rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 60, n. 5, p. 502-505, 2021.

GOMES, E. M. et al. Calcium chloride diluted in ethanol 95% as female sterilizing agent: effect of transcutaneous delivery in rats. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2022.

GUNTHER, I. et al. Reduction of free-roaming cat population requires high-intensity neutering in spatial contiguity to mitigate compensatory effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 15, p. e2119000119, 2022.

GUPTA, N.; GUPTA, R. K. Animal welfare and human health: growing conflicts over stray dogs in Chandigarh. **South Asia Research**, v. 39, n. 3, p. 339-352, 2019.

HOLUBIEV, O. V. et al. Advantages and difficulties of ultrasound analysis to determine the fertile period in bitches. **Theoretical and Applied Veterinary Medicine**, v. 11, n. 2, p. 14–20, 2023.

HAAFTEN, K. V. A. et al. Effects of a single preappointment dose of gabapentin on signs of stress in cats during transportation and veterinary examination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 10, p. 1175-1181, 2017.

HUGUES, J.; MACDONALD, D.W. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. **Biological Conservation**, v 157: 341–51, 2013.

JANA, K.; SAMANTA, P. K. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. **Contraception**, v. 75, n. 5, p. 390-400, 2007.

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**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2011.

JOHNSON, A. K. Normal feline reproduction: The queen. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 24, n. 3, p. 204-211, 2022.

JOHNSTON, S.; RHODES, L. No surgery required: the future of feline sterilization. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, n. 9, p. 777–782, 2015.

KARMAKAR, S. N.; DAS, S. K. Chemical and biological sciences chemosterilization induced by intratesticular injection of calcium chloride. **Internacional Journal of Pharmaceutical**. v. 7, n. 1, p. 25–35, 2017.

KEALY J.C. et al. Radiografia e ultrassonografia do cão e do gato. 5 ed. **Eservier Brasil**, p. 324, 2012.

KREISLER, R. E. et al. Use of nalbuphine as a substitute for butorphanol in combination with dexmedetomidine and tiletamine/zolazepam: A randomized non-inferiority trial. **Journal of feline medicine and surgery**, v.22, n. 2, p. 100-107, 2020.

KUTZLER, M. A. Intratesticular and intraepididymal injections to sterilize male cats: From calcium chloride to zinc gluconate and beyond. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 17, n. 9, p. 772-776, 2015.

KLUNKLIN, K.; SANGSIN, A.; LEERAPUN, T. Efficacy and safety of ultrasound-guided caudal epidural steroid injection in patients with low back pain and sciatica. **Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation**, v. 35, n. 2, p. 317–322, 2022.

LEOCI, R. et al. A dose-finding, long-term study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of nonsurgical sterilization in dogs: evaluation of the most effective concentration with the lowest risk. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2014.

LEOCI, R. et al. Effects of intratesticular vs intraepididymal calcium chloride sterilant on testicular morphology and fertility in dogs. **Theriogenology**, v. 127, p. 153-160, 2019.

LEVY, J. K. et al. Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. **American journal of veterinary research**, v. 69, n. 1, p. 140-143, 2008.

LÉVY, X.; FONTBONNE, A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 1, p. 128–134, 2007.

MASSEI, G., & MILLER, L. A. Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: A review of products and criteria for field applications. **Theriogenology**, v. 80, n. 8, p. 829-838, 2013.

MALANDAIN, E. et al. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1337–1346, 15 out. 2011.

MITSUI, K.; SATO, S.; KAKUMA, Y. Effects of the community cats program on population control, migration and welfare status of free-roaming cats in Tokyo, Japan. **Animals**, v. 10, n. 3, p. 461, 2020.

MOGHEISEH, A. et al. Ultrasonographic and histopathologic changes following injection of neutral zinc gluconate in dog's ovaries. **Comparative Clinical Pathology**, v. 26, n. 5, p. 1093-1098, 2017.

OLIVEIRA, E. C. S. et al. Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial of efficacy and safety. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 307-310, 2013.

OLIVEIRA, E. C. S. et al. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1056-1063, 2012.

PANKRATZ, K. E. et al. Use of single-dose oral gabapentin to attenuate fear responses in cage-trap confined community cats: a double-blind, placebo-controlled field trial. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 20, n. 6, p. 535-543, 2018.

PARANZINI, C. S. et al. Effects of chemical castration using 20% CaCl₂ with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and effectiveness of treatment. **Theriogenology**, v. 106, p. 253-258, 2018.

PASKINS, Z. et al. Clinical effectiveness of one ultrasound guided intra-articular corticosteroid and local anaesthetic injection in addition to advice and education for hip osteoarthritis (HIT trial): single blind, parallel group, three arm, randomised controlled trial. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 377, p. e068446, 6 abr. 2022.

POSNER, Lysa Pam et al. Total injectable anesthesia of dogs and cats for remote location veterinary sterilization clinic. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2020.

ROBERTSON, S. A. et al. AAEP feline anesthesia guidelines. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 20, n. 7, p. 602-634, 2018.

SANTOS, B. G. et al. Ovarian morphometry applied to the use of chemosterilant in bitches and queens. **Archives of veterinary science**, v. XX, p. x, 2022.

SEID, A. M.; TEREFE, D. A. Non-surgical castration methods to control stray dog population, a review. **Online J. Anim. Feed Res**, v. 9, n. 6, p. 233-240, 2019.

SOUMENDRA K. N. & DAS, S. K. Chemosterilization induced by intratesticular injection of calcium chloride (cacl₂) a tool for population control. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences**, v. 7, n. 1, 2017.

THOMSON, P. et al. Sporotrichosis outbreak due to *Sporothrix brasiliensis* in domestic cats in Magallanes, Chile: a one-health-approach study. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 226, 2023.
VERCELLINI, R. et al. Ultrasonographic evaluation of ovarian morphology and blood flow in prepubertal and pubertal cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 74-78, 2018.

TOBIAS, K. M.; SPENCER, A. J. **Veterinary Surgery: Small Animal: 2-Volume Set**, 1ed., 2011. Editora: ELSEVIER.

VERCELLINI, R. et al. Ovarian and uterine two-dimensional and Doppler ultrasonographic changes in the feline peri-estrus period. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 24, n. 10, p. 1053–1059, 2022.

WEEDON, G. Robert. *Zeuterin: The Non-Surgical Alternative to Neutering*. 2014.

WHO – World health organization. Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. **World Health Organization**, 2010.